

平成 21 年度 博士論文

構造多様性を創出する芳香族基質プレニルトランスフェラーゼに  
関する基礎および応用研究

熊野 匠人

# 目 次

序論.....	1
<b>第 1 章 フラキノシン生合成及び Fur7 の機能解析.....</b>	<b>15</b>
第一節 フラキノシン生合成遺伝子クラスターの機能予測 .....	16
第二節 フラキノシン生合成遺伝子クラスターの異種発現 .....	19
第三節 <i>fur7</i> 破壊株の作製と培養抽出物の解析 .....	21
第四節 Fur7 の発現と精製.....	25
第五節 Fur7 の生理的基質の同定と構造決定 .....	26
第六節 2-methoxy-3-methyl flaviolin と Fur7 の反応 .....	35
第七節 <i>fur7</i> 破壊株培養液への <i>fur</i> -P1 の添加.....	39
第八節 Fur7 の機能解析.....	42
第九節 考察.....	62
<b>第 2 章 ナフテルピンの生合成 .....</b>	<b>64</b>
第一節 ナフテルピン生合成遺伝子クラスターの機能予測 .....	65
第二節 <i>nphB</i> 破壊株、 <i>nphF</i> 破壊株の作製方法と確認 .....	68
第三節 CL190 株及び <i>nphB</i> 破壊株、 <i>nphF</i> 破壊株の生産物の比較 .....	73
第四節 <i>nphB</i> 破壊株と <i>nphF</i> 破壊株の共培養 .....	78
第五節 NphB の発現、精製.....	80
第六節 NphB 破壊株培養上清と NphB の反応.....	81
第七節 naphterpin 生合成中間体候補化合物による <i>nphB</i> 破壊株の相補.....	87
第八節 考察.....	92
<b>第 3 章 放線菌由来プレニルトランスフェラーゼを用いたプレニル化化合物合成.....</b>	<b>94</b>
第一節 NphB によるプレニル化反応.....	97
第二節 Fur7 によるプレニル化.....	105
第三節 SCO7190 によるプレニル化.....	106
第四節 プレニル化化合物の抗菌活性.....	110

第五節	考察 .....	114
<b>第 4 章</b>	<b>変異酵素の作製と解析 .....</b>	<b>116</b>
第一節	NapT8 と NapT9 の機能解析 .....	117
第二節	変異酵素の作製 .....	120
第三節	Fur7 変異酵素の機能解析 .....	123
第四節	NphB 変異酵素の解析 .....	126
第五節	考察 .....	129
<b>第 5 章</b>	<b>形質転換体植物の生産するプレニル化化合物の同定 .....</b>	<b>132</b>
第一節	序論 .....	133
第二節	形質転換ミヤコグサ抽出物の分析 .....	134
第三節	形質転換ダイズ抽出サンプルの分析 .....	145
第四節	形質転換トマト抽出物サンプルの分析 .....	154
第五節	考察 .....	158
<b>総括 .....</b>		<b>159</b>
<b>実験項 .....</b>		<b>167</b>
<b>引用文献 .....</b>		<b>190</b>
<b>謝辞 .....</b>		<b>196</b>

# 序 論

## プレニルトランスフェラーゼ

プレニルトランスフェラーゼは炭素数 5 のイソプレン単位で構成されるイソプレンユニットをもつ化合物の生合成あるいは細胞内シグナル伝達に関与している。とりわけ、カロテノイド、ステロイドホルモン、メナキノン、ユビキノン、プラストキノンといった一次代謝に必要な化合物の生合成や、低分子量 GTP 結合タンパク質のプレニル化に関与するプレニルトランスフェラーゼはよく知られている。また、近年植物からはプレニル化フラボノイドなどの二次代謝産物を生合成するプレニルトランスフェラーゼも複数同定されている[1]。

ここでは、基本的なイソプレンユニットであるイソペンテニルニリン酸 (IPP) とジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) から C10, C15, C20 といったより鎖長の長いプレニルニリン酸を生合成する鎖長伸長プレニルトランスフェラーゼ、C15 のファルネシルニリン酸 (FPP) や C20 のゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) を GTP 結合タンパク質に付加し細胞内シグナル伝達を担うタンパク質基質プレニルトランスフェラーゼ、C40 や C50 の鎖長のプレニルニリン酸を 4-hydroxybenzoate (4-HBA) や 1,4-dihydroxy naphthoate (DHNA) に付加してユビキノンやメナキンを合成する芳香族基質プレニルトランスフェラーゼについて説明する。なお、本論文ではこれらをまとめて既知のプレニルトランスフェラーゼと記述する。

鎖長伸長プレニルトランスフェラーゼは DMAPP に順次 IPP を結合し鎖長の長いプレニルニリン酸を合成する酵素である。ゲラニルニリン酸合成酵素 (GPPS) は炭素数 5 のジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) に IPP を 1 回結合し炭素数 10 のゲラニルニリン酸 (GPP) を合成する。ファルネシルニリン酸合成酵素 (FPPS) は DMAPP に IPP を 2 回結合し炭素数 15 のファルネシルニリン酸 (FPP) を合成する。炭素数 20 のゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP) やより鎖長の長いプレニルニリン酸も同様に合成される。

プレニル二リン酸を合成する鎖長伸長プレニルトランスフェラーゼは *trans* プレニル二リン酸を合成する *trans* 型と *cis* プレニル二リン酸を合成する *cis* 型に分けられる[2]。

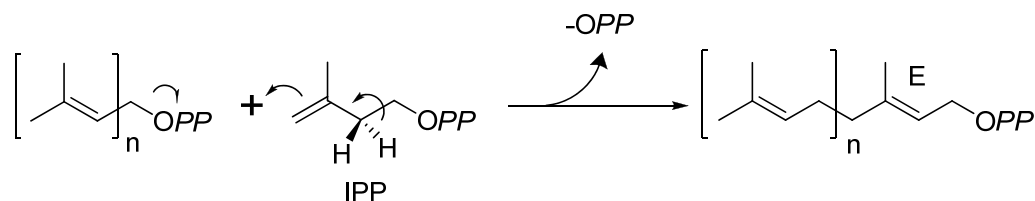


図 1 *trans*-プレニル基転移酵素によるトランス型プレニル二リン酸の合成

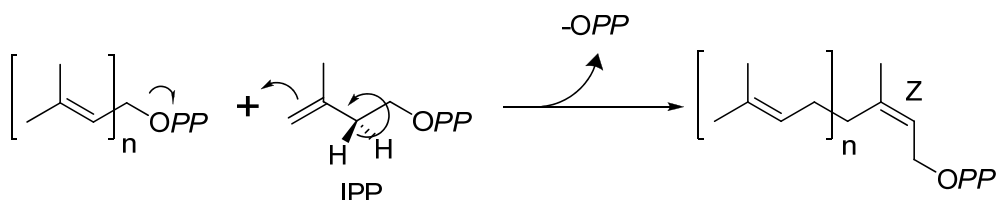


図 2 *cis*-プレニル基転移酵素によるシス型プレニル二リン酸の合成

*Trans* 型プレニルトランスフェラーゼは、*trans* 体の GPP、FPP、GGPP やさらに鎖長の長いプレニル二リン酸を合成し、これらはモノテルペン、セスキテルペン、ジテルペン、カロテノイドやステロイドの前駆体となる。

この *trans* 型プレニルトランスフェラーゼには基質であるプレニル二リン酸の二リン酸基結合モチーフとしてアスパラギン酸リッチな DDXXD モチーフが二箇所保存されている。ニワトリ由来の FPPS の結晶構造解析によると N 末側の DDXXD モチーフが GPP のリン酸と結合し、C 末側の DDXXD モチーフが IPP のリン酸と結合していた[3]。なお、DDXXD モチーフのアスパラギン酸とリン酸との結合には  $Mg^{2+}$  を必要としこれが IPP のヘテロリシスを引き起こしてアリルカチオンの生成を触媒する。そのため、 $Mg^{2+}$  は反応に必須である。

一方、*cis* 型プレニルトランスフェラーゼはトランス型のプレニル二リン酸に IPP をシス型に付加して一部がシス型のプレニル二リン酸を合成する。これらはドリコールや天然

ゴムの前駆体となる。*cis* 型プレニルトランスフェラーゼはアミノ酸配列、立体構造共に *trans* 型プレニルトランスフェラーゼとは相同性が無く、DDXXD モチーフも無い[4]。しかし反応に  $Mg^{2+}$  が必須である点は共通している。

タンパク質基質プレニルトランスフェラーゼはヘテロダイマー構造をもつ 100 kDa 程度のタンパク質で、 $Mg^{2+}$  及び  $Zn^{2+}$  依存的に低分子量 GTP 結合タンパク質である Ras スーパーファミリーの Ras タンパク質や Rab タンパク質の C 末端のシステインの硫黄原子をプレニル化する[5]。これまでに炭素数 15 の FPP を基質にし、ファルネシル基を付加する Protein FPP Transferase と炭素数 20 の GGPP を基質にし、ゲラニルゲラニル基を付加する Protein GGPP Transferase が知られている。

プレニル化された Ras タンパク質は、疎水性のプレニル基によって膜に局在する。そして受容体からの刺激により GTP が結合した活性型となって Raf キナーゼ、MAPK カスケードへと細胞内シグナル伝達を行い、細胞増殖などに関与している。その後、通常は GTP を GDP へと分解し不活性型に戻る。しかし、変異型 Ras タンパク質では GTP が分解できずに細胞増殖シグナルを出し続けるので細胞がガン化する原因になるとされている。Ras タンパクの活性発現にはプレニル化による膜への局在が必須であるため抗癌剤としてプレニル化酵素阻害剤の研究が行われている[6]。一方、プレニル化された Rab タンパク質も Ras タンパク質同様、膜に移動する。そして他のタンパク質と相互作用し、細胞内の小胞の輸送に関与するといわれている[7]。

細胞内のタンパク質の 2% がプレニル化されているという報告もあり、タンパク質基質プレニルトランスフェラーゼは細胞内で重要な働きを担っていると考えられている[8]。

芳香族基質プレニルトランスフェラーゼはユビキノンやメナキノンの生合成を行う酵素である[9]。ユビキノンは細菌では chorismate、真核生物ではチロシンから合成される 4-hydroxybenzoate (4-HBA) にプレニル基が付加し合成される。なお酵母は chorismate から 4-HBA を合成することができる[10]。また、メナキノンは 1,4-dihydroxy naphthoate (DHNA) にプレニル基が付加し合成される。これらユビキノンやメナキノンの生合成におけるプレニル化を触媒する酵素は polyprenyltransferase (PPT) と呼ばれ、大腸菌 *E. coli* の EcPPT (UbiA) [11]、酵母の ScPPT (COQ2) [12]、イネ *Oryza sativa* の OsPPT[13]、シロイヌナズナ *Arabidopsis* の AtPPT が知られている[14]。また、ユビキノン合成酵素はプレニル基供与体として炭素数 10 の GPP から炭素数 45 の solanesyl diphosphate まで様々な鎖長のプレニル二リン酸に対し広い基質特異性を示すことが知られている。

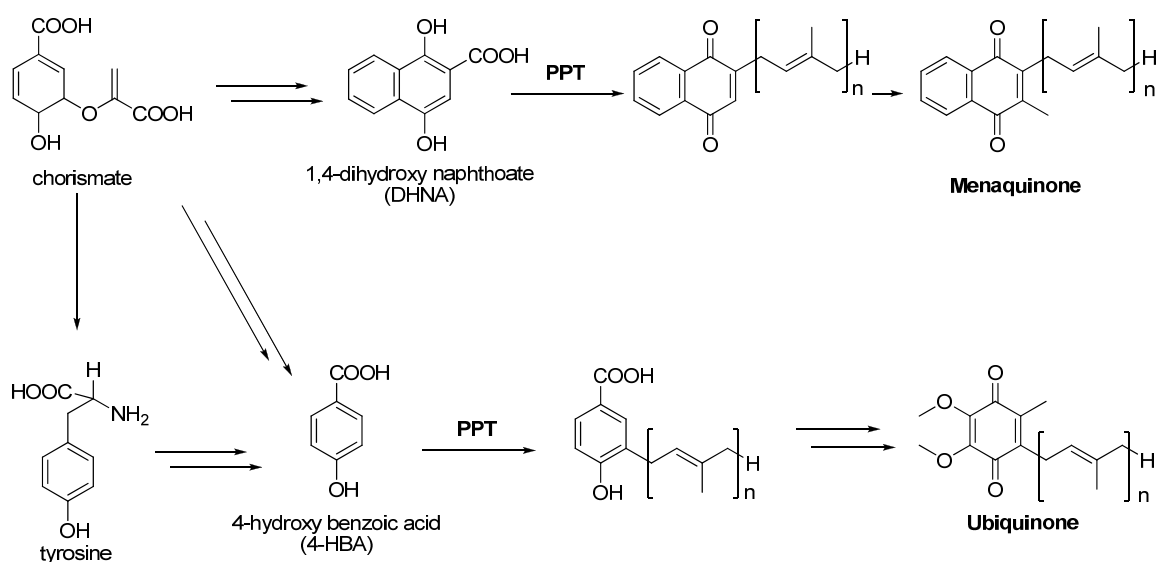


図 3 メナキノン及びユビキノン合成酵素 PPT が触媒するプレニル基転移反応



## 二次代謝にみられるプレニルトランスフェラーゼ

二次代謝生合成にみられるプレニルトランスフェラーゼは植物、カビ、放線菌から見つかっている。まず、植物では二次代謝産物として多数のプレニル化フラボノイドが見つかっており、その生物活性は抗菌、抗酸化、抗ガン、抗腫瘍など多岐にわたっている [1, 15]。これまで植物の二次代謝に関わる芳香族基質プレニル基転移酵素のクローニング例はなかったが、近年 *L. erythrorhizon* よりシコニン合成酵素遺伝子として芳香族基質プレニルトランスフェラーゼ遺伝子 *lePGT* がクローニングされた [16]。LePGT は小胞体の膜タンパクとして発現し 4-HBA に GPP 由来のゲラニル基を付加する。なお、シコニンは抗菌活性を持ちファイトアレキシンとして働く化合物である (図 4)。

また、ナリンゲニンの 8 位をジメチルアリル化する N8DT やゲニス테인の 6 位をジメチルアリル化する G6DT もクローニングされ、これまで不明であった植物由来のプレニル化フラボノイド生合成酵素についても明らかになってきている (図 5) [17]。これら植物由来のプレニルトランスフェラーゼは DDXXD モチーフを有し、活性には  $Mg^{2+}$  が必要である。

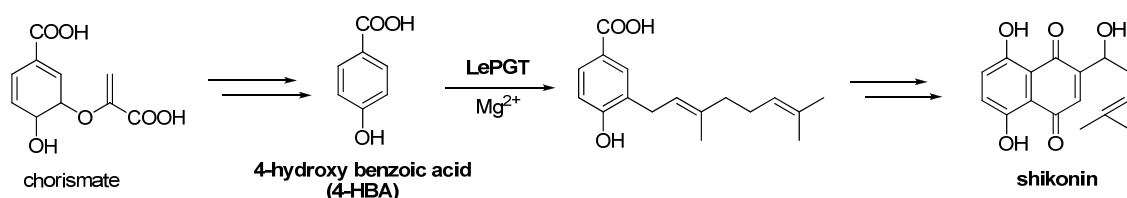


図 4 シコニンの生合成

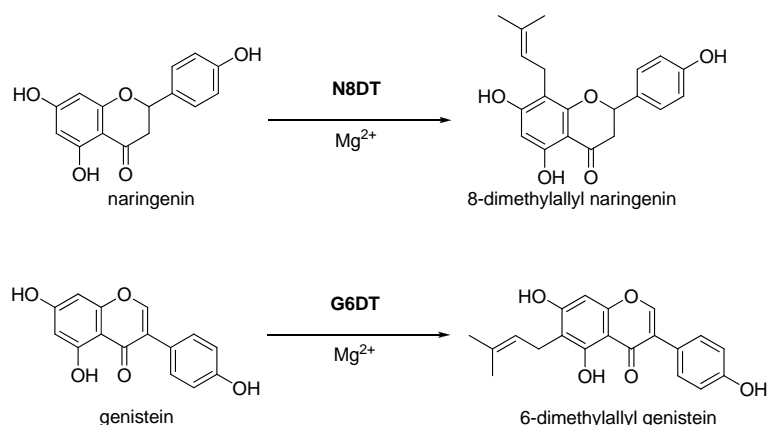


図 5 N8DT, G6DT によるプレニル化フラボノイド合成反応

また、カビからもプレニル化化合物が単離されているが、その生合成酵素に関する研究も活発に行われ、*Claviceps purpurea* 由来の *dmaW*、*Aspergillus fumigatus* 由来の *fgaPT1*、*fgaPT2* 等が知られている[18], [19]。DmaW、FgaPT2 は L-tryptophan に DMAPP 由来のジメチルアリル基を付加し、血管収縮作用や向精神作用が知られる ergot alkaloid (麦角アルカロイド) の前駆体である 4-dimethylallyltryptophan を合成する[19], [20]。カビ由来の芳香族基質プレニルトランスフェラーゼは DDXXD モチーフがない点や反応に  $Mg^{2+}$  が必要ない点が一次代謝や植物由来のプレニルトランスフェラーゼと異なっている。また、LtxC と FgaPT1 はアリルカチオンの 1 位の炭素ではなく 3 位の炭素を芳香族化合物に付加する Reverse prenyltransferase 活性を有している。

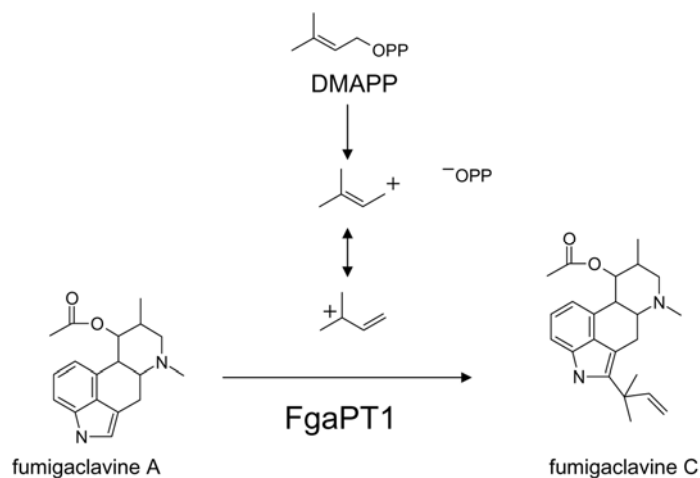


図 6 Reverse prenyltransferase FgaPT1 によるプレニル基転移反応

FgaPT1 はアリルカチオンの 3 位の炭素が反応するリバースプレニルトランスフェラーゼ活性を有している

ところが近年、これらとは相同性を示さない新規芳香族基質プレニルトランスフェラーゼが抗生物質クロロビオシン生産菌である放線菌 *Streptomyces roseochromogenes* よりクローニングされた[21]。 *S. roseochromogenes* のクロロビオシン生合成遺伝子 *cloQ* は 4-Hydroxyphenylpyruvate (4-HPP) に DMAPP 由来のジメチルアリル基を付加する活性を示す。しかし *cloQ* は既知のプレニルトランスフェラーゼと相同性がなく、活性中心に二リン酸基結合モチーフとして芳香族基質プレニルトランスフェラーゼで高度に保存されている DDXXD モチーフが存在しない。また、活性に Mg<sup>2+</sup> が必要ない点も既知のプレニルトランスフェラーゼと異なる。

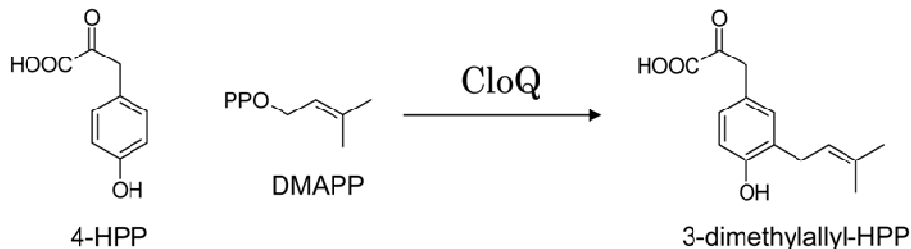


図 7 新規芳香族基質プレニルトランスフェラーゼ CloQ が触媒するプレニル基転移反応

cloQ はこれまでに知られていたプレニルトランスフェラーゼと相同性がなく、反応に  $\text{Mg}^{2+}$  も必要としなかった。

ポリケタイド-テルペノイド融合化合物と CloO ホモログ

放線菌は多様な二次代謝産物を生産し、その一部がポリケタイドとテルペノイドの融合化合物を生合成することが知られている。*Streptomyces* sp. CL190 株が生産する抗酸化物質ナフトルピン、*Streptomyces* sp. KO-3988 株が生産する抗腫瘍物質フラキノシン、*Streptomyces* sp. CNQ525 株が生産するナピラジオマイシン、*Streptomyces cinnamomensis* が生産するフラノナフトキノンがその一例である。これら融合化合物を生産する放線菌は一次代謝で利用するメチルエリスリトールリン酸 (MEP) 経路のほかに二次代謝産物生合成のためにメバロン酸経路も有しており、融合化合物の生合成遺伝子クラスターは、そのメバロン酸経路周辺に存在している。ただしフラノナフトキノンはメバロン酸キナーゼのみがクラスター中に存在する。これらの融合化合物生合成遺伝子クラスターには共通して 1,3,6,8-tetra hydroxyl naphthalene (THN) 合成酵素 *rppA* ホモログが存在しており、ポリケタイド部分は THN を経由して合成されと考えられる[22]。また、テルペノイド部分はそれぞれのクラスターに存在するポリプレニル二リン酸合成酵素によって合成されるプレニル二リン酸に由来する。これら融合化合物はテルペノイドの

鎖長や付加する位置によって構造多様性が生じるため、その反応を触媒するプレニルトランスフェラーゼが生合成の鍵酵素であると考えられる (図 8)。

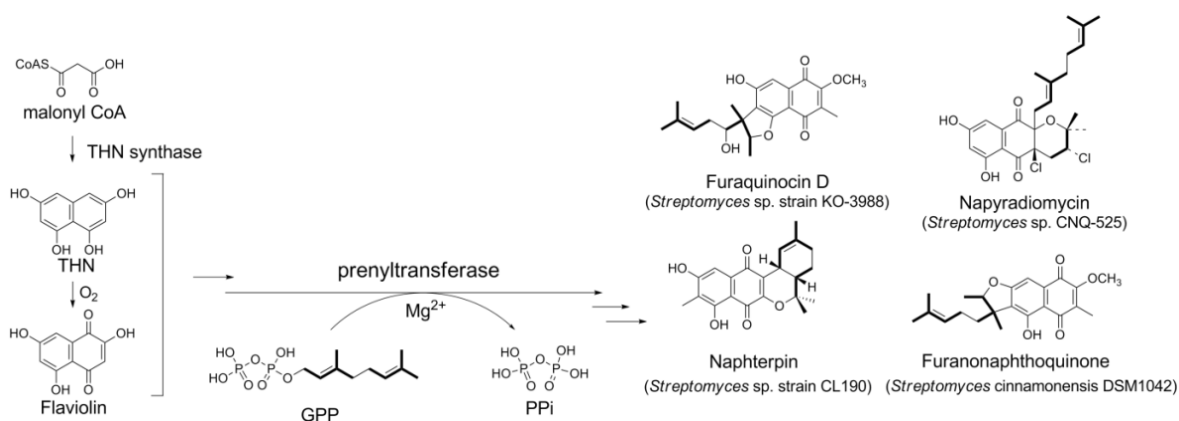


図 8 ポリケタイド-テルペノイド融合化合物

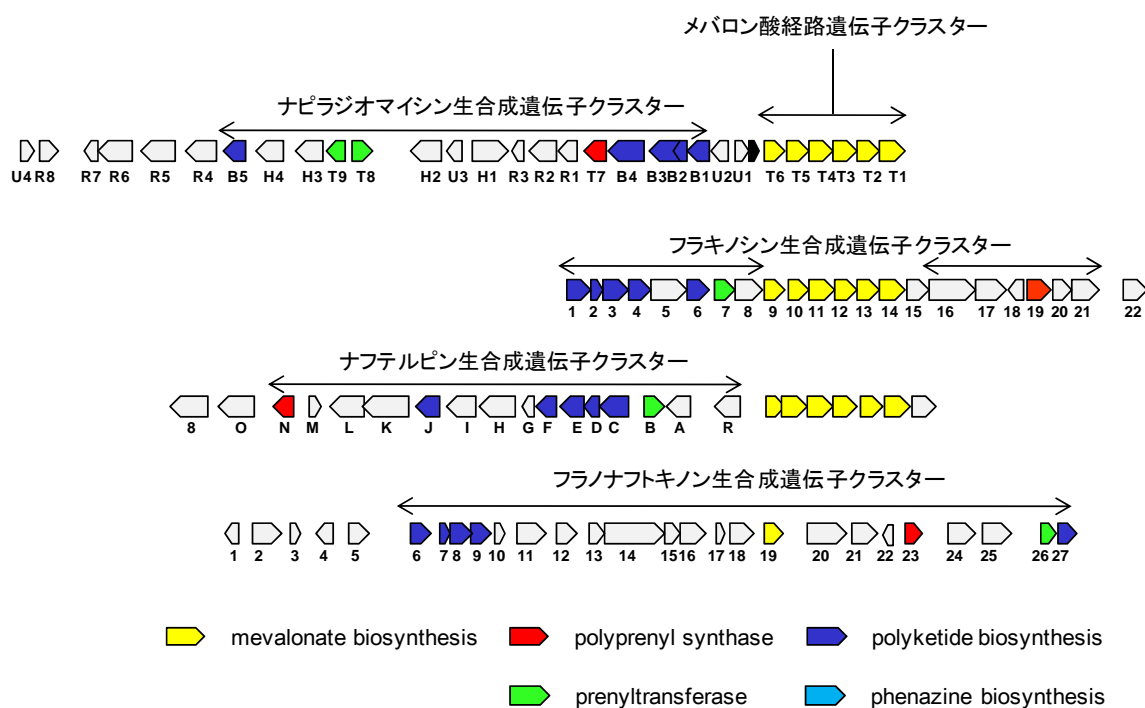


図 9 ポリケタイド-テルペノイド融合化合物の生合成遺伝子クラスター

## プレニル化化合物

プレニル化化合物の多くは植物から発見されたプレニル化フラボノイドで、その構造多様性からエストロゲン活性、チロシンキナーゼ阻害活性、抗菌活性、抗ガン活性、抗腫瘍活性、多剤耐性抑制活性など様々な生物活性を示すことが報告されている[23]。その一部を図 10 に挙げた。6-ジメチルアリルクリシンは乳がん細胞の ABCG2 という ABC トランスポーターを阻害して、乳がん細胞の薬剤排出を阻害し、抗癌剤治療の助けになると考えられている[24]。*Humulus lupulus* (ホップ)由来のキサントフモールはカルコンにジメチルアリル基が付加した構造をしており結腸がん細胞において増殖の抑制とアポトーシス誘導活性を示すことが報告されている[25]。*Sophora flavescens* (マメ科植物)由来のソホラフラバノン G はラバンダリル基というジメチルアリル基が二つ付加し、分岐した形の側鎖を持ち、エイコサノイド産生阻害活性を有する。そのためエイコサノイド産生が原因とされるアトピー性皮膚炎などの治療に期待されている[26]。ナリングениンに炭素数 10 のゲラニル基が付加した 6-ゲラニルナリングениンは脂肪の酸化を抑制する抗酸化活性を示す[27]。また、同じ位置に炭素数 5 のジメチルアリル基が付加した 6-ジメチルアリルナリングениンは抗酸化活性に加えて抗菌活性、抗腫瘍活性を示すことが報告されている[28]。また、8 位の炭素がジメチルアリル化された 8-ジメチルアリルナリングениンはさらにエストロゲン活性を示すことも知られている[29]。構造活性相関研究によりこれらの化合物の活性にはプレニル基が重要であることが分かっている。これ以外にもプレニル化化合物は多数知られているが、植物から単離できる量が微量であることもあって生理活性や作用機構の研究はあまり進んでいない。一般的にはプレニル化されることによって脂溶性が高まり細胞膜を透過しやすくなって細胞への取り込み量が増加することが原因と解釈されている[30]。

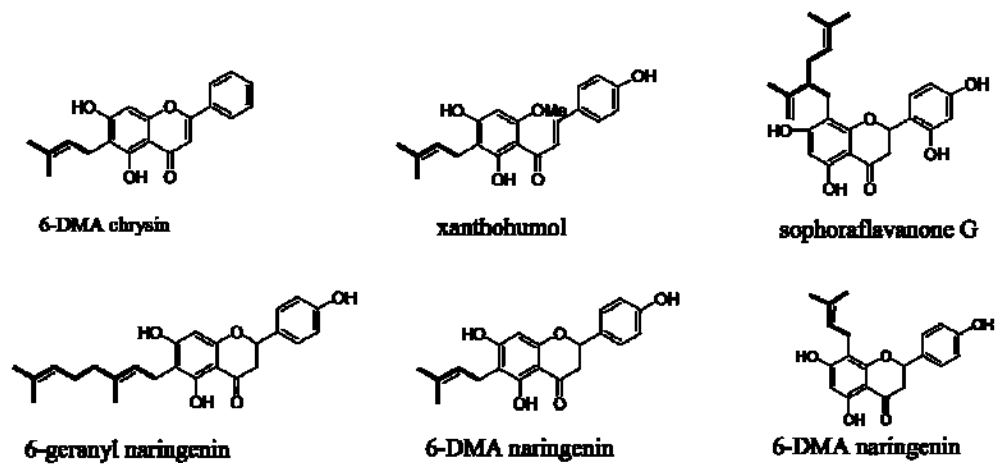


図 10 プレニル化フラボノイド

植物やカビからは多数のプレニル化化合物が単離されておりその生物活性は下表のように多岐にわたり注目されている。

表 1 プレニル化フラボノイドの生物活性

化合物名	生物活性	Ref.
6-dimethylallyl chrysin	乳がん細胞 ABC トランスポーターの阻害	[24]
xanthohumol	結腸ガンの増殖抑制とアポトーシス誘導等	[25]
sophoraflavanone G	抗炎症作用	[26]
6-geranyl naringenin	抗酸化活性	[27]
6-dimethylallyl naringenin	抗酸化作用、抗菌活性、抗腫瘍活性	[28]
8-dimethylallyl naringenin	抗酸化作用、抗菌活性、抗腫瘍活性、エストロゲン活性	[29]

## 酵素による新規化合物生産

酵素を利用して新規化合物を合成する試みは盛んに行われている。その理由は有機合成に比べて一度に多種の類縁化合物を得ることができるからであり、合成のツールとして期待されている。

酵母 *Candida utilis* にカロテノイド生合成遺伝子 *crtE*、*crtB*、*crtI* を導入し、リコペンを生産する酵母を創出した例や、ビフェニルを酸化し分解する一連の酵素遺伝子 (*bphA*、*bphB*、*bphC*、*bphD*) の全て、もしくは一部を大腸菌に導入することで最終反応産物だけでなく中間体も含めて効率よく、より多様な化合物ライブラリーを得る試みも行われている[31]。ビフェニル分解系の例では、基質特異性が高い初発酵素を DNA shuffling 技術によって基質特異性を寛容にし、ビフェニル化合物だけでなくフラボノイドや分子中にアミンやカルボキシ基を含む複素環化合物の変換も可能にしている[32]。他にも、植物由来 Type III PKS を利用し、様々な人工的に化学合成した人工基質の CoA 体をスターターにし、malonyl-CoA あるいは acetyl-CoA と縮合させることによって非天然型ポリケタイドの合成も行われている[33, 34]。



*Streptomyces* sp. CL190 株から見出されたナフトテルピン生合成遺伝子クラスターを始め、ポリケタイド-テルペノイド融合化合物生合成遺伝子クラスター中には必ず *cloQ* ホモログであるプレニルトランスフェラーゼと考えられる遺伝子が存在する。本研究ではナフトテルピン生合成中のプレニルトランスフェラーゼ NphB とフラキノシン生合成遺伝子クラスターに存在する NphB ホモログ Fur7 について、第 1 章、第 2 章で生理的基質の同定を試みると同時に、機能解析を行った。また、NphB は  $Mg^{2+}$  依存性であるが Fur7 は非依存性である。第 4 章ではこの金属イオン依存性の差を決定するアミノ酸残基の同定を行った。

さらに、第 3 章ではこれらの放線菌由来プレニルトランスフェラーゼによるフラボノイドや植物ポリケタイドのプレニル化反応を試みた。その結果、複数の基質に対して反応することが分かった。この基質特異性が寛容な放線菌由来プレニルトランスフェラーゼを利用し、天然には微量にしか存在しないフラボノイドや植物ポリケタイドのプレニル化化合物の合成に成功した。

また、植物においてプレニルトランスフェラーゼを発現させ、プレニル化化合物の生産を試みたが生成量が微量で反応産物の検出、構造決定は困難であった。そこで、第 3 章で合成したプレニル化化合物を標品にして組み換え植物抽出物に含まれるプレニル化化合物の LC-MS による同定を行った(第 5 章)。

## 第1章 フラキノシン生合成及び Fur7 の機能解析

## 第一節 フラキノシン生合成遺伝子クラスターの機能予測

フラキノシンは *Streptomyces* sp. KO-3988 株が生産する抗腫瘍活性を有するポリケタイド-テルペノイド融合化合物である。フラキノシン生合成遺伝子クラスターは川崎らにより大腸菌-放線菌シャトルベクターpWHM3 にクローニングされ、異種発現に成功している[35]。クラスターには *fur1* から *fur21* まで 21 個の ORF が含まれており、表 1-1 のように機能予測した。

それに基づいてフラキノシンの生合成経路を推定すると図 1-2 のようになった。テルペノイド部分は Fur19 により合成される GPP に由来すると考えられる。一方、ポリケタイド部分は *rppA* ホモログである Type III PKS Fur1 によって合成される 1,3,6,8-tetrahydroxyl naphthalene (THN) に由来すると考えられる。THN がさらに、Fur2 や Fur3 等による酸化や修飾を受けたのち、Fur4, Fur6 によってメチル化されてポリケタイド骨格が形成されると予想した。そしてプレニルトランスフェラーゼ Fur7 によってポリケタイド骨格にプレニル基が付加されポリケタイド-テルペノイド融合化合物となる。最後に、さらに環化や水酸化を受けてフラキノシンが合成されると考えた。

序論で述べた、ポリケタイド-テルペノイド融合化合物生合成遺伝子クラスターにはいずれもプレニルトランスフェラーゼが存在するが、その基質や反応産物は未知であったため、本研究では *fur7* 破壊株を作製し、基質を同定した。さらに、Fur7 と基質の反応産物が生合成中間体であることを証明し、Fur7 の機能解析についても行った。

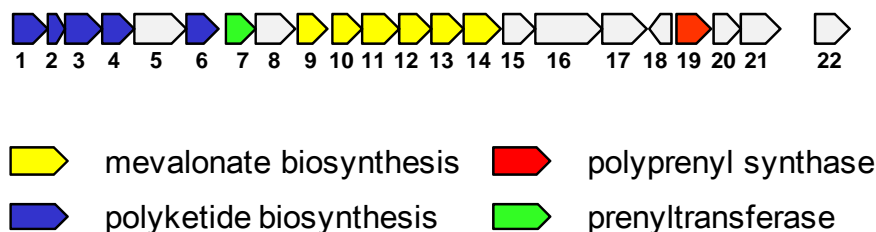


図 1-1 フラキノシン生合成遺伝子クラスター

表 1-1 フラキノシン生合成遺伝子クラスターに含まれる ORF の推定アミノ酸配列の

相同性検索結果

Gene	Amino	Proposed function	Sequence similarity	Similarity /	Protein	Reference
Product	acids (no.)		(protein, origin)	Identity (%)	accession number	
Fur1	356	TypIII polyketide syntase	RppA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	92 / 87	BAB91443	[36]
Fur2	195	quinone-forming monooxygenase	MomA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	86 / 80	BAD89290	[37]
Fur3	385	aminotransferase	NapB3, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	85 / 76	ABS50480	[38]
Fur4	331	SAM dependent O-methyltransferase	FNQ9, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	87 / 77	CAL34087	[39]
Fur5	506	fatty-acid-CoA ligase	NapB4, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	85 / 74	ABS50481	[38]
Fur6	337	SAM dependent C-methyltransferase	FNQ27, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	86 / 77	CAL34105	[39]
Fur7	307	Putative prenyltransferase	Fnq26, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	80 / 66	CAL34104	[39]
Fur8	434	P450	CypX, <i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	48 / 31	BAI44339	[40]
Fur15	324	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase	PpzT, <i>Streptomyces anulatus</i>	89 / 82	CAX48662	[41]
Fur16	652	hypothetical protein	Fnq20, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	82 / 75	CAL34098	[39]
Fur17	484	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	Fnq21, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	84 / 78	CAL34099	[39]
Fur18	209	hypothetical protein	Fnq22, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	66 / 53	CAL34100	[39]
Fur19	352	trans-polyprenyl diphosphate synthase	Fnq23, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	80 / 71	CAL34101	[39]
Fur20	282	Short-chain Z-isoprenyl diphosphate synthase	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 11379	81 / 70	ZP_04711629	
Fur21	336	SAM dependent C-methyltransferase	Fnq27, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	77 / 60	CAL34105	[39]

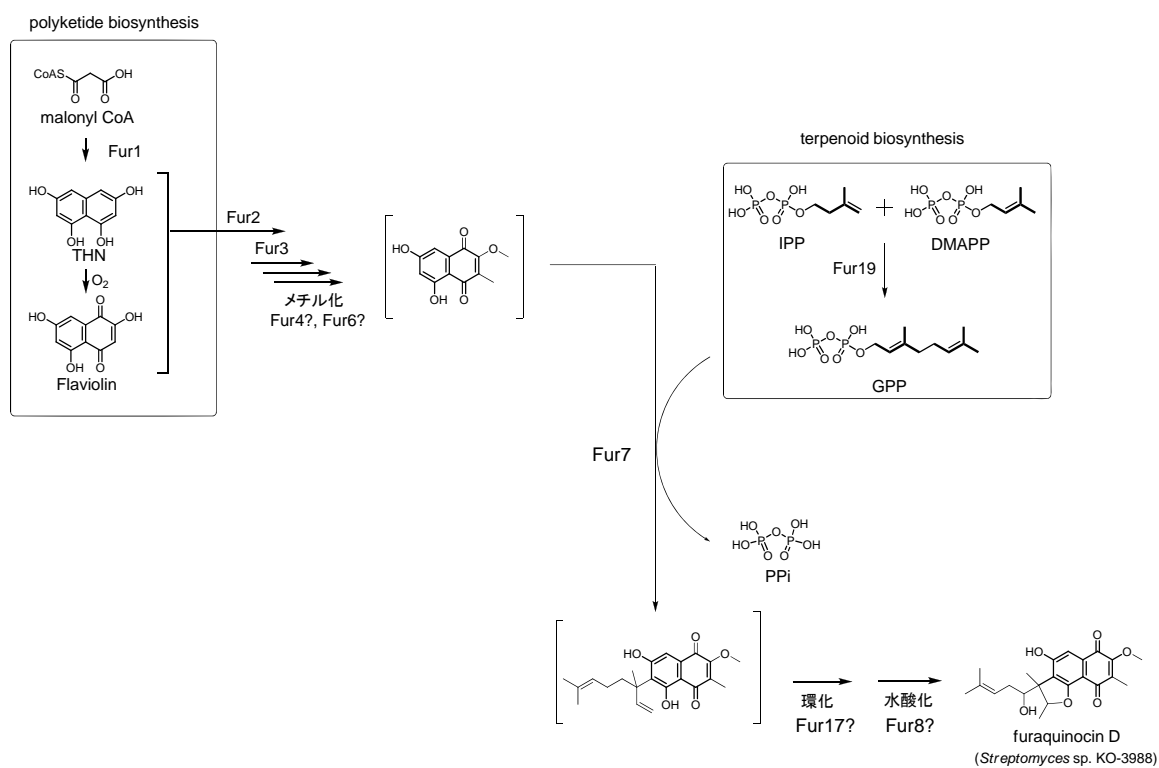


図 1-2 フラキノシン推定生合成経路

フラキノシン生合成遺伝子クラスターにみられる ORF の機能予測をもとに推定生合成経路を表した。[ ]で囲んだ化合物は単離されておらず推定構造である。

## 第二節 フラキノシン生合成遺伝子クラスターの異種発現

フラキノシン生合成遺伝子クラスター *fur1*~8 と *fur15*~21 が pWHM3 にクローニングされたプラスミド pWFQ (図 1-5) を富山県立大学の大利徹先生よりご分与いただき *Streptomyces albus* をトランスフォームした。それを培養し、アセトン抽出、酢酸エチル抽出して HPLC で分析した。

### 実験方法

*S. albus* のプロトプラストを作製し、フラキノシン生合成遺伝子クラスターがクローニングされた pWFQ でトランスフォームした。プロトプラストの調製方法、トランスフォームの手順は実験項に記した。

得られた組換え体を TSB 培地 (30 µg/ml チオストレプトンを含む) で 30°C、2 日間前培養し、30 µg/ml チオストレプトンを含む SKII 培地または NMMP 培地で 27°C、3 日間本培養を行った。培養終了後、培養液と等量のアセトンを加え、4 時間静置した。菌体をろ過して除き、アセトンをエバポレートして、残った水層に対して酢酸エチル抽出を行った。Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えて脱水後、酢酸エチルをエバポレートして残渣をメタノールに溶解し、HPLC、MS で分析した。

HPLC 条件: Column: 2 × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo)

Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate), 0.8 ml/min.  
10%-100% A over 40min, 100% A for 10 min.

Detector: Photo Diode Array (MD-2010, JASCO)

## 結果

図 1-3 のように 34.7 min にフラキノシン A、39.1 min にフラキノシン D が検出され、*Streptomyces albus* でのフラキノシン生産が確認できた。それぞれの構造を図 1-4 に示した。

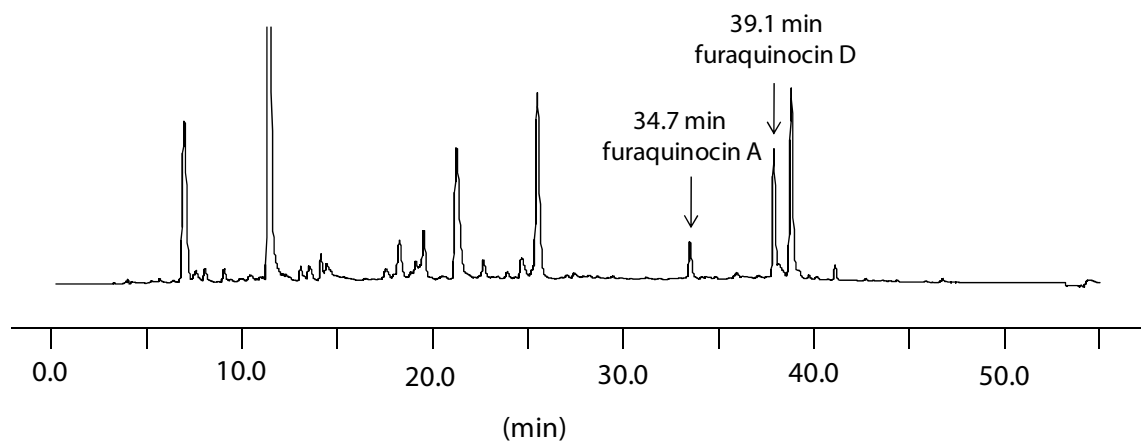


図 1-3 フラキノシン生合成遺伝子クラスターを異種発現した *Streptomyces albus* 培養抽出物の HPLC 分析 (265 nm)

培養抽出物を HPLC で分析し、265 nm でのクロマトグラムを示した。34.7 min にフラキノシン A、39.1 min にフラキノシン D を検出した。

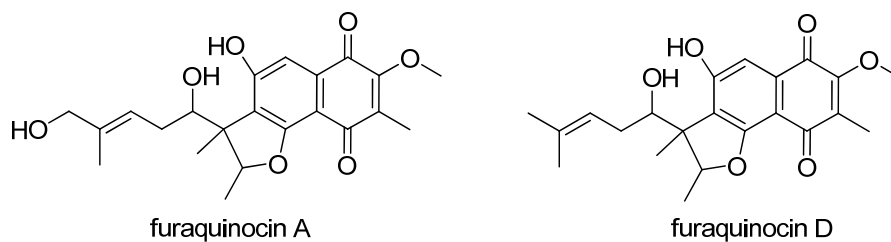


図 1-4 furaquinocin A、D の構造

### 第三節 *fur7* 破壊株の作製と培養抽出物の解析

前節で *Streptomyces albus* によるフラキノシンの生産を確認した。*fur7* 破壊株を作製し、培養すると Fur7 の基質が蓄積すると考えられるので *fur7* 破壊株の作製を行った。

#### 第一項 *fur7* 破壊株プラスミドの構築

*fur7* 破壊株を作製するためにクラスター全長が pWHM3 ベクターにクローニングされた pWFQ ベクターを用い、そこから *fur7* の一部を制限酵素処理により欠失させたプラスミドを作製した。

#### 実験方法

*fur7* 破壊株は以下のように作製した。まず、フラキノシン生合成遺伝子クラスターから切り出した *Xba*I-*Eco*RV 断片を、pET Duet ベクターにライゲーションし pEFQ1 とした。さらに pEFQ1 から *Not*I-*Eco*RV で切り出した DNA 断片を、pET28a にライゲーションし、これを pEFQ2 とした。次に、ここから *Bgl*II-*Eco*RV で DNA 断片を切り出し、pACYC にライゲーションし pAFQ とした。pAFQ を *Nru*I で制限処理したのち、セルフライゲーションして *fur7* が 646 bp 欠失したプラスミドを取得した。これを pAFQ\_d7 とした。pAFQ\_d7 から *Bgl*II-*Eco*RV 断片を切り出し pEFQ2 にライゲーションして pEFQ2\_d7 を作製したのち、*Not*I-*Eco*RV 断片を切り出して、pEFQ1 にクローニングし pEFQ1\_d7 を作製した。最後に pEFQ1\_d7 から *Xba*I-*Eco*RV 断片を切り出して pWFQ にライゲーションし *fur7* が破壊されたフラキノシン生合成遺伝子クラスター発現用ベクター pWFQ\_d7 を作製した(図 1-5)。なお、このプラスミドで *Streptomyces albus* を形質転換したものを *fur7* 破壊株とした。



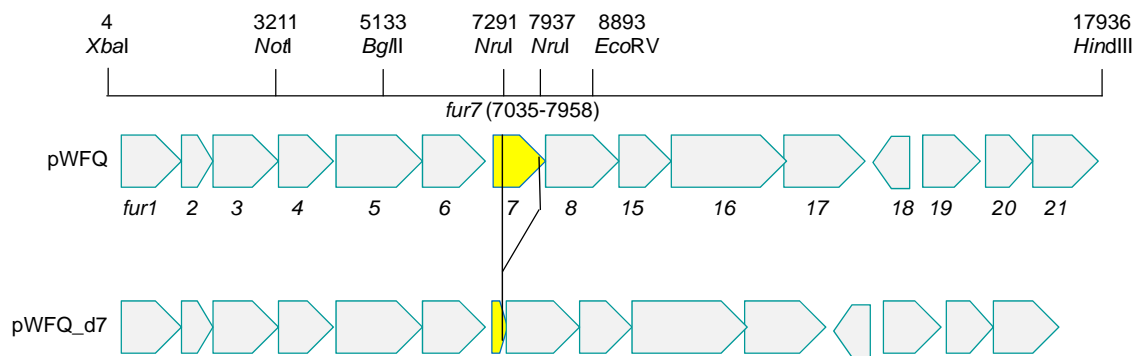


図 1-5 pWFQ\_d7 の構造

pWHM3 にフラキノシン生合成遺伝子クラスター全長がクローニングされた pWFQ から、*fur7* を *NruI*-*NruI* で 646 bp 欠失させた *fur7* 欠失プラスミド pWFQ\_7 を作製した。このプラスミドで *Streptomyces albus* を形質転換したものを *fur7* 破壊株とした。

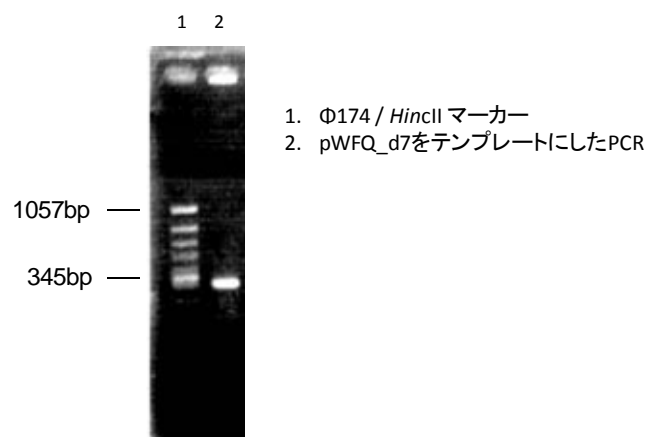


図 1-6 pWFQ\_d7 をテンプレートにした *fur7* プライマーでの PCR

*fur7* は 923bp であるが *NruI*-*NruI* が欠失したことにより約 300 bp の断片が増幅した。

## 第二項 *fur7* 破壊株培養抽出物の解析

前項で作製した、フラキノシン生合成遺伝子クラスターから *fur7* が一部欠失したプラスミド pWFQ\_d7 で *Streptomyces albus* を形質転換し、バッフル付き三角フラスコで培養したのち、培養液をアセトン抽出、酢酸エチル抽出し、HPLC で分析した。

### 実験方法

pWFQ\_d7 で *Streptomyces albus* を形質転換し、TSB 培地 (30 µg/ml チオストレプトンを含む) で 30°C、2 日間培養したのち、NMMP 培地で 27°C、3 日間本培養した。培養液をアセトン抽出し、ろ過によって菌体を除いた後、アセトンをエバポレートした。残った水層に対して酢酸エチルを等量加えて抽出し、酢酸エチルに混入した水を完全に除くために Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を適量加え、1 時間静置した。つぎに、酢酸エチルをエバポレートし、残渣をメタノールに溶解して HPLC で分析した。

HPLC 条件: Column: 4.6 × 250 mm (ODS, Senshu, Tokyo),  
Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate)  
10%-100% over 40min 100% for 10 min 0.8 ml/min,  
Detector: Photo Diode Array (MD 2010, JASCO)

### 結果

図 1-7 のようにフラキノシン D の生産は検出されなくなった。しかし、予想に反して特に蓄積している化合物は存在せず、Fur7 の基質の同定には至らなかった。

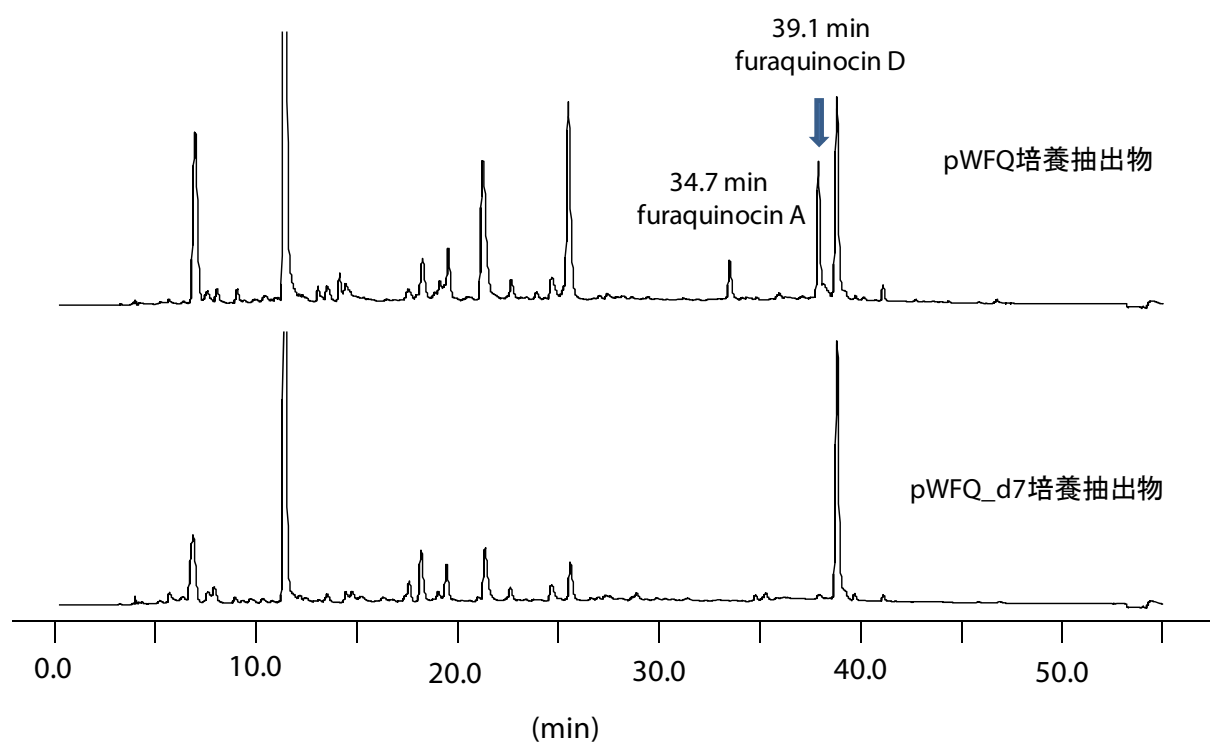


図 1-7 pWFQ と pWFQ\_d7 培養抽出物の HPLC 分析 (265 nm)

265 nm でのクロマトグラムを示した。クラスター全長を発現させた異種発現株 (上段) では 34.7 min にフラキノシン A、39.1 min にフラキノシン D が検出されたが、*fur7*破壊株培養液抽出物 (下段) にはフラキノシン生産株と比較して特に蓄積している化合物は検出されなかった。

#### 第四節 Fur7 の発現と精製

以下の実験で用いる Fur7 の組換えタンパクを大腸菌で発現し、精製した。Fur7 は N 末に *Nco*I、C 末に *Bam*HI サイトを付加した下表のプライマーで PCR により増幅し、pHis8 ベクターにクローニングした。このプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3)をトランスフォームし、組換えタンパクを得た。タンパク精製に関する実験手順は実験項に記した。酵素精製における各段階のサンプルを SDS-PAGE に供し、Elution に 33 kDa の単一のバンドが確認できた。収量は培養 1 L あたり約 50 mg であった。

表 1-2 Fur7 クローニング用プライマー配列

プライマー名	制限酵素サイト	配列
Fur7_N	<i>Nco</i> I	5'-GGG <u>CCATG</u> GCCCCGGGTACGGACGATGTCGC-3'
Fur7_C	<i>Bam</i> HI	5'-GGGG <u>GATC</u> CTCATGTCGACTCCTTGTCGCG-3'

*fur7* クローニング用プライマーの配列。下線部は制限酵素サイト。

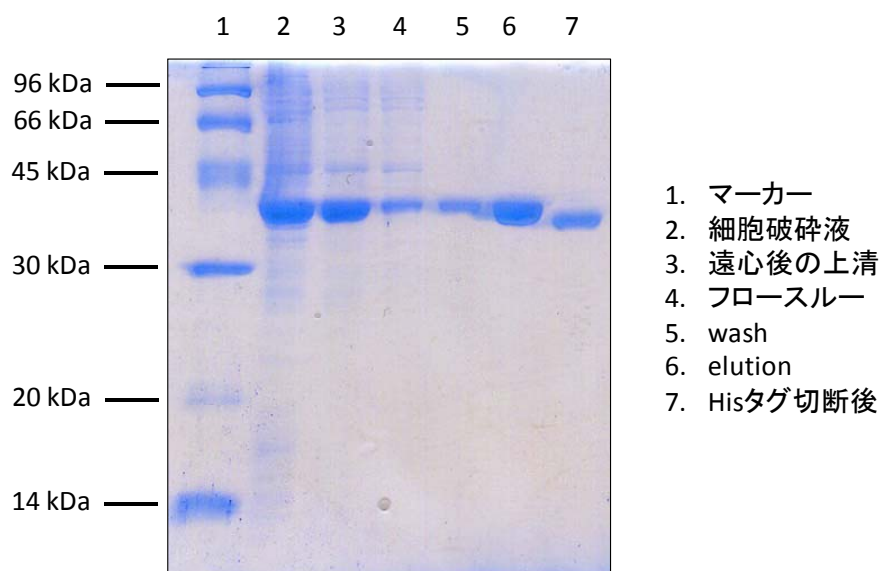


図 1-8 Fur7 精製過程の SDS-PAGE

## 第五節 Fur7 の生理的基質の同定と構造決定

### 第一項 培養液への組換え Fur7 と GPP の添加

前節で、*fur7* 破壊株培養液抽出物に Fur7 の基質となる化合物の蓄積が観察されなかった。この結果から基質が迅速に他の *S. albus* 内在性酵素等により変化してしまっている可能性を考えた。しかし、Fur7 の基質が微量でも *fur7* 破壊株の培養液中に存在していれば、Fur7 を添加することでプレニル化され、その反応産物を検出できると考えた。

### 実験方法

*fur7* 破壊株を TSB 培地 (30  $\mu$ g/ml チオストレプトンを含む) で 30°C、2 日間培養したのち、NMMP 培地で 27°C、24 時間本培養した。そこへフィルター滅菌した大腸菌組換え酵素 Fur7 を 10 mg (終濃度 0.1 mg/ml) と GPP を 3.5 mg (終濃度 0.1 mM) 加えた。その後さらに 27°C、48 時間本培養した。培養液終了後、培養液に等量のアセトンを加えて抽出し、ろ過によって菌体を除いた後、アセトン进行エバポレートした。残った水層に対して酢酸エチルを等量加えて抽出し、酢酸エチル进行エバポレートしたのち、残渣をメタノールに溶解して HPLC で分析した。

HPLC 条件: Column: 4.6  $\times$  250 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate), 1.0 ml/min  
2%-98% A over 30min, 98% A for 5 min

Detector: Photo Diode Array (MD 2010, JASCO)

## 結果

Fur7 と GPP を培地に加えて培養したものでは 34.5 min に新たなピークが検出され、UV スペクトル (220, 265, 300, 340 nm に極大吸収) からフラキノシン類縁体と考えられた。このピークを分取し、NMR で構造を決定したところフラキノシン C であった (図 1-9, 図 1-10, 表 1-3)。このことは、培地中に放出された未同定の基質が Fur7 によってプレニル化され、再度菌体に取り込まれて環化され、フラキノシン C に変換されたことを示唆している。

この結果から、培地中には大量に蓄積はしないものの、Fur7 の生理的基質が存在することが示唆されたので、次に *fur7* 破壊株を大量培養し基質の同定を目指した。

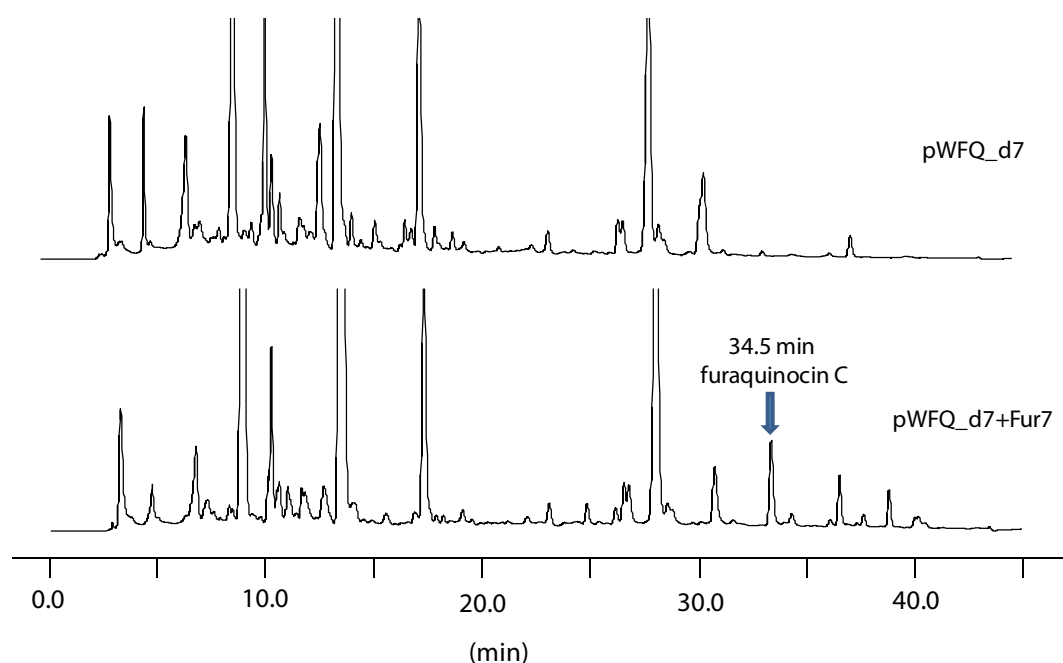


図 1-9 *fur7*破壊株、および Fur7 と GPP を添加した *fur7*破壊株培養液抽出物の HPLC による分析 (265 nm)

ここでは 265 nm でのクロマトグラムを示した。Fur7 を添加した培養液抽出物 (下段) からは 34.5 min にフラキノシン C のピークが検出された。

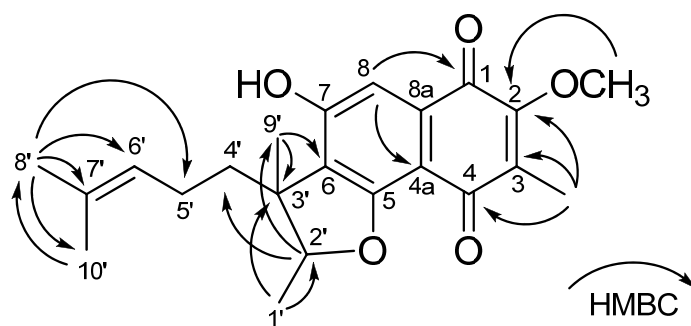


図 1-10 フラキノシン C の構造。

フラキノシン C の構造と HMBC 測定により観測された相関を矢印で示した。

表 1-3 フラキノシン C のケミカルシフト値

	$^1\text{H}$		$J_H(\text{Hz})$	$^{13}\text{C}$
1				180.8
2				156.8
2-O-Me	3.86	s		60.8
3				132.6
3-Me	1.86	s		9.7
4				182.9
4a				108.3
5				159.6
6				127.2
7				156.8
8	7.01	s		109.0
8a				133.3
1'	1.37	d	6.2	14.0
2'	4.40	q	6.2	90.8
3'				46.5
4'	1.65	m		35.1
5'	1.81	m		26.0
6'	4.95	t	6.8	124.8
7'				131.1
8'	1.53	s		25.9
9'	1.35	s		24.0
10'	1.40	s		17.9

## 第二項 *fur7* 破壊株培養上清と Fur7 の反応

前項の結果から *fur7* 破壊株培養液に Fur7 の生理的基質が存在することが示唆されたので、*fur7* 破壊株培養液から生理的基質の単離を試みたが、HPLC では確認できなかった。そこで大量培養を行う前に、UV よりも感度の良い LC-MS で Fur7 の基質および反応産物の検出を試みた。*fur7* 破壊株を NMMP 培地で 30°C、3 日間本培養し、3 日目の培養液を遠心分離によって菌体と上清に分け、上清に Fur7 と GPP を加えて反応産物および減少する化合物 (=生理的基質)を LC-MS で分析した。

### 実験方法

*fur7* 破壊株を TSB 培地 (30 µg/ml チオストレプトンを含む) で 30°C、2 日間培養したのち、NMMP 培地で 27°C、3 日間本培養した。培養液を 4000 rpm 10 min 遠心分離し菌体と上清に分け、上清を終濃度、50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.2 mg/ml Fur7, 0.2 mM GPP となるように調製し、室温で約 15 時間反応させたのち酢酸エチル抽出を行った。酢酸エチルをエバポレートしたのち、残渣をメタノールに溶解して、LC-MS で分析した(図 1-11)。

LC-MS 条件: Column: 2.0 × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, acetonitril; B, water (+0.1% acetate), 0.2 ml/min

2%-75% A over 30 min, 75%-98% A over 5 min, 98% for 5 min

Detector: MS (ESI<sup>-</sup>)



## 結果

Fur7 反応前後の反応溶液を LC-MS で比較すると、図 1-11 に示した  $m/z=233$  (M-H) の化合物が減少するとともに、 $m/z=369$  (M-H) の化合物が生成した (図 1-12)。  $m/z=233$  (M-H) の化合物にゲラニル基が付加すると  $m/z=369$  (M-H) となるのでこの化合物は Fur7 によってゲラニル化された反応産物であると予想した。

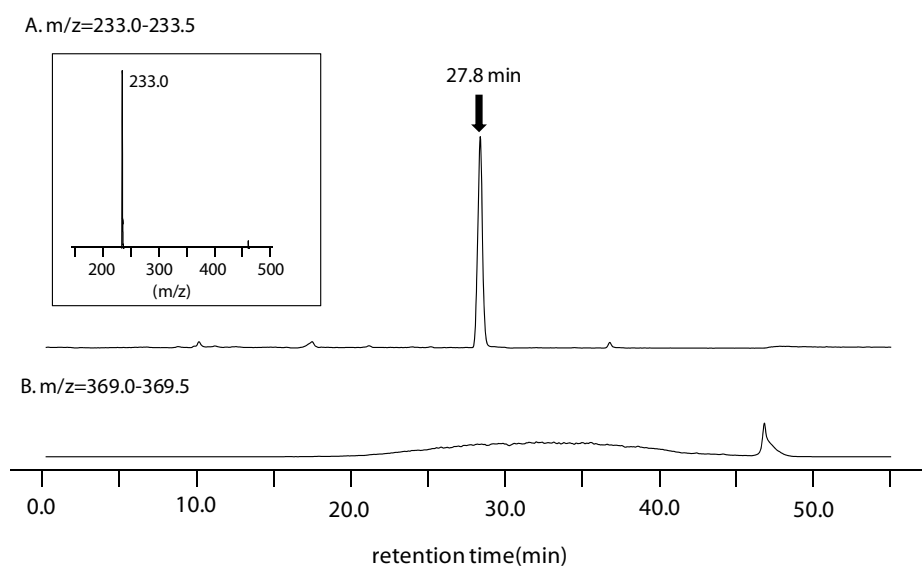


図 1-11 *fur7* 破壊株培養上清の Fur7 反応前の酢酸エチル抽出物の分析 (LC-MS)

A,  $m/z=233.0-233.5$  のマスキロマトグラム。左上に 27.8 min のピークのマススペクトルを示した。B,  $m/z=369.0-369.5$  のマスキロマトグラム。この範囲ではいずれの化合物も検出されなかった。測定は  $\text{ESI}^-$  で行った。

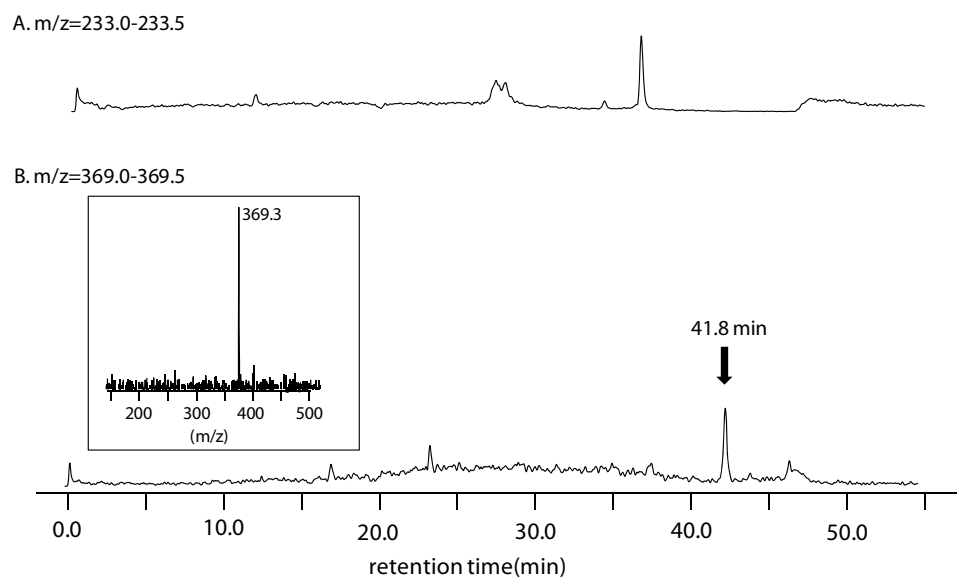


図 1-12 *fur7*破壊株上清の Fur7 反応後の酢酸エチル抽出物の分析 (LC-MS)

上段:233.0-233.5 のマスキロマトグラム。*fur7* 破壊株上清に存在した 27.8 min の化合物が減少した。下段:369.0-369.5 のマスキロマトグラム。*fur7* 破壊株上清に存在せず、Fur7 による反応産物と思われる化合物が 41.8 min に検出された。そのマスペクトルを左に示した。いずれも ESI で測定した。

### 第三項 *fur7* 破壊株大量培養と Fur7 基質の構造決定

前項で Fur7 と分子量 234 の化合物が反応することが示唆されたのでこの化合物の単離を目指して *fur7* 破壊株を 4 L 培養し、上清を酢酸エチル抽出して HPLC で分析した。

#### 実験方法

*fur7* 破壊株を TSB 培地 (30  $\mu$ g/ml チオストレプトンを含む) で 30°C、2 日間培養したのち、NMMP 培地で 27°C、3 日間本培養した。培養上清 4 L を酢酸エチル抽出し、酢酸エチルをエバポレート後、残渣をメタノールに溶解し HPLC によって分析した。分析条件は前項の LC-MS と同条件とした。

HPLC 条件: Column: 2.0  $\times$  150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate), 0.2 ml/min

2%-75% A over 30 min, 75%-98% A over 5 min, 98% A for 5 min

Detector: Photo Diode Array (MD 2010, JASCO)

#### 結果

前項の LC-MS で検出された分子量 234 の未同定化合物は 2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (flaviolin) 様の UV スペクトル (図 1-13) を示した。フラビオリンは、フラキノシンのポリケタイド骨格に構造が似ていることから、この未同定化合物が目的の生理的基質と考え、HPLC で分取し 0.4 mg を得た(図 1-14)。次に、構造決定のため、この化合物の NMR、HRMS を測定した。HR-MS の結果から分子式を  $C_{12}H_{10}O_5$  と決定し、さらに HMBC の測定から 6 位のプロトンから 5 位、7 位の水酸基

の付け根の炭素、8 位の炭素に相関が観察され、8 位のプロトンからは 6 位の炭素と 1 位の炭素に相関が観察された。一方で、メチル基からは 4 位のケトンの付け根への相関が観察されたのでメチル基の位置を 3 位、メキシ基の位置を 2 位と決定することができた。これらの結果から、この化合物の構造を 5,7-dihydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione (2-methoxy-3-methyl flaviolin)と決定した (図 1-15)。

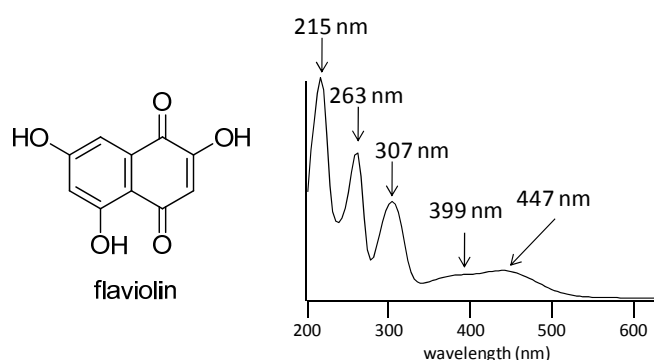


図 1-13 フラビオリンの構造と UV スペクトル

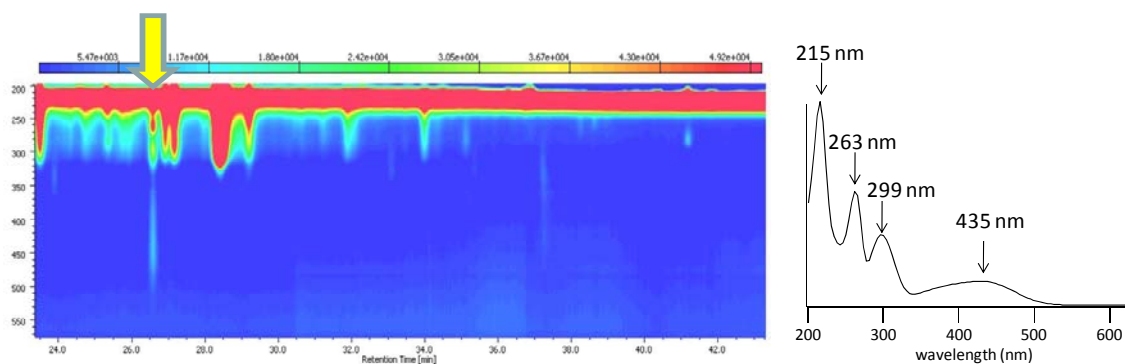


図 1-14 *fur7* 破壊株培養液上清の HPLC による分析 (Photo Diode Array)

黄色の矢印で示したピークが LC-MS で確認した分子量 234 の化合物とほぼ同じ溶出時間であった。また、右にその UV スペクトルを示したが、図 1-13 に示したフラビオリンと似た UV スペクトルを示した。これらのことからこの化合物が Fur7 の生理的基質であると考えた。

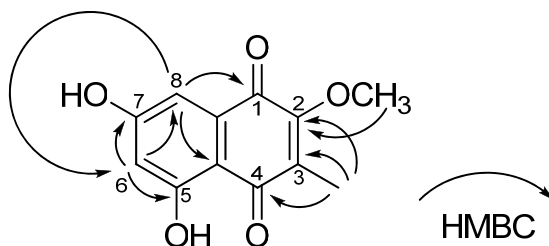


図 1-15 2-methoxy-3-methyl flaviolin の構造

HMBC の測定により 8 位のプロトンと 1 位の炭素の相関が観察された。一方でメチル基のプロトンからは 4 位の炭素との相関が観察されたのでメチル基を 3 位、メトキシ基を 2 位と決定した。

表 1-4 5,7-dihydroxy-2-methoxy-3-methylnaphthalene-1,4-dione の HR-MS 測定値、およびケミカルシフト (DMSO-*d*6)

HR-MS (ESI<sup>-</sup>) calculated for C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub> (M-H), 233.0450; found: 233.04041

position	<sup>1</sup> H		<sup>13</sup> C
1			180.8
2			156.8
2-O-Me	3.86	s	60.8
3			132.6
3-Me	1.86	s	9.7
4			182.9
4a			108.3
5			159.6
6			107.2
7			156.8
8	7.01	s	109.0
8a			133.3

## 第六節 2-methoxy-3-methyl flaviolin と Fur7 の反応

Fur7 の生理的基質であると考えられる 2-methoxy-3-methyl flaviolin を得ることができたので、次に 2-methoxy-3-methyl flaviolin と Fur7 の in vitro での反応を試みた。

### 実験方法

以下のような反応溶液を調製し 2-methoxy-3-methyl flaviolin と Fur7 の反応を試みた。25°C で 6 時間反応後、反応溶液を酢酸エチル抽出し、酢酸エチルをエバポレートした後、残渣をメタノールに溶解し HPLC で分析した。

表 1-5 2-methoxy-3-methyl flaviolin と Fur7 反応溶液組成

試薬	volume
1 M Hepes pH 7.5	500 $\mu$ l
0.1 M MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	500 $\mu$ l
0.1 M GPP	100 $\mu$ l
10 mM 2-methoxy-3-methyl flaviolin	500 $\mu$ l
Fur7	10 mg
milliQ water	
total	10ml

### 結果

HPLC で分析した結果、二つの反応産物が 10 : 1 で生成していた(図 1-16)。これらを fur-P1、fur-P2 とし、HPLC で分取して NMR、HR-MS を測定した。HR-MS の結果から fur-P1、fur-P2 の分子式は C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>O<sub>5</sub> であると決定した。fur-P1 はプロトンの測定結果から特徴的な 6.2 ppm のダブルダブレットが観察されたのでゲラニル基が 3 位で付加していることが判明した。HMBC の結果から、8 位のプロトンから 1 位のカルボニルの付け根

の炭素への相関が観察されたので 6 位に付加していることが証明された。fur-P2 はゲラニル基の 1 位のダブルレットが 4.66 ppm に観察されたので水酸基に付加していることが判明した。そして HMBC の測定により 7 位の水酸基にゲラニル基が付加していることが示された。その構造は(図 1-17) の通りであり、主生成物である fur-P1 の構造はフラキノシンの構造との比較からフラキノシン生合成中間体になりうる構造であった。

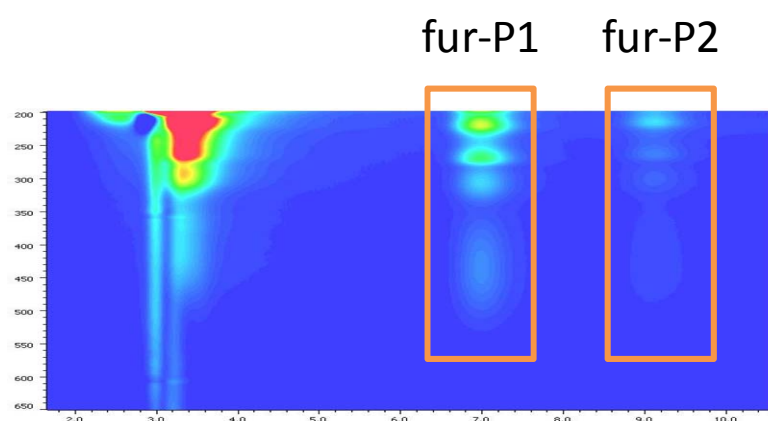


図 1-16 2-Methoxy 3-methyl flaviolin と Fur7 の反応産物の HPLC 分析 (photo diode array)

2-methoxy-3-methyl flaviolin と Fur7 を反応させた結果二つの反応産物 fur-P1, fur-P2 が検出された。

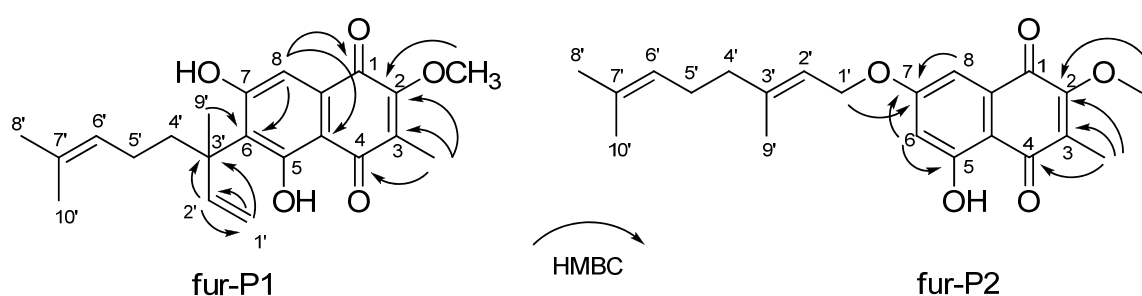


図 1-17 fur-P1、fur-P2 の構造と HMBC 相関

表 1-6 fur-P1 の HRMS の値とケミカルシフト (DMSO-*d*6)

HR-MS (ESI<sup>-</sup>) calculated for C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub> (M<sup>-</sup>), 369.1702; found:369.1733

	<sup>1</sup> H		<i>J<sub>H</sub></i> (Hz)	<sup>13</sup> C
1				180.4
2				157.9
2-O-Me	3.93	s		60.0
3				133.5
3-Me	1.86	s		7.3
4				189.5
4a				107.9
5				164.5
6				124.
7				163.6
8	6.91	s		107.0
8a				133.3
1'	4.76	d	10.3	107.9
1'	4.82	d	18.0	107.9
2'	6.26	dd	10.3, 18.0	90.8
3'				44.5
4'	1.79	m		35.1
5'	1.94	m		26.0
6'	5.00	t	6.8	131.1
7'				133.1
8'	1.54	s		25.9
9'	1.52	s		24.0
10'	1.42	s		17.9



表 1-7 fur-P2 のケミカルシフト (DMSO-*d*6)

	<sup>1</sup> H		<i>J<sub>H</sub></i> (Hz)
1			
2			
2-O-Me	4.05	s, 3H	
3			
3-Me	2.01	s, 3H	
4			
4a			
5			
6	6.64	s 1H	
7			
8	7.07	s	
8a			
1'	4.66	d, 2H	6.8
2'	5.41	t, 1H	6.2
3'			
4'	2.08	m, 2H	
5'	2.11	m, 2H	
6'	5.05	t, 1H	7.6
7'			
8'	1.60	s, 3H	
9'	1.77	s, 3H	
10'	1.57	s, 3H	

## 第七節 *fur7* 破壊株培養液への *fur*-P1 の添加

前節で合成した *fur*-P1 がフラキノシン生合成中間体になりうる構造であったので、これを *fur7* 破壊株培養液に加えて、フラキノシンの生産が回復するかどうかを確認した。この実験により、*fur*-P1 が真にフラキノシン生合成中間体であることを証明できると考えた。

### 実験方法

*fur7* 破壊株を TSB 培地 (30 µg/ml チオストレプトンを含む) で 30°C、2 日間培養したのち、NMMP 培地で 27°C、2 日間本培養した。培養液 100 ml に対して 0.1 mg の *fur*-P1 を添加し、さらに 24 時間培養した。培養液終了後、培養液に等量のアセトンを加えて抽出し、ろ過によって菌体を除いた後、アセトンをエバポレートした。残った水層に対して酢酸エチルを等量加えて抽出し、酢酸エチルをエバポレートしたのち、残渣をメタノールに溶解して HPLC、LC-MS/MS で分析した。

#### HPLC 条件:

Column: 4.6 × 250 mm (ODS, Senshu, Tokyo),  
Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate), 1.0 ml/min  
2%-75% A over 30 min, 75-98% A over 5 min, 98% A for 5 min  
Detector: Photo Diode Array (MD-2010, JASCO)

#### LC-MS/MS 条件

Column: 2.0 × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),  
Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate), 0.2 ml/min  
40%-98% A over 18 min, 98% for 2 min  
Detector: MS/MS (API3000, Applied Biosystems, ESI<sup>+</sup>)

## 結果

HPLC による分析で、図 1-18 のようにフラキノシン C と溶出時間が一致するピークが検出された。また、LC-MS/MS において、図 1-19 のように、フラキノシン C の標品と一致するピークが検出され、フラキノシンの生産が確認できた。したがって fur-P1 がフラキノシン合成中間体であると結論した。

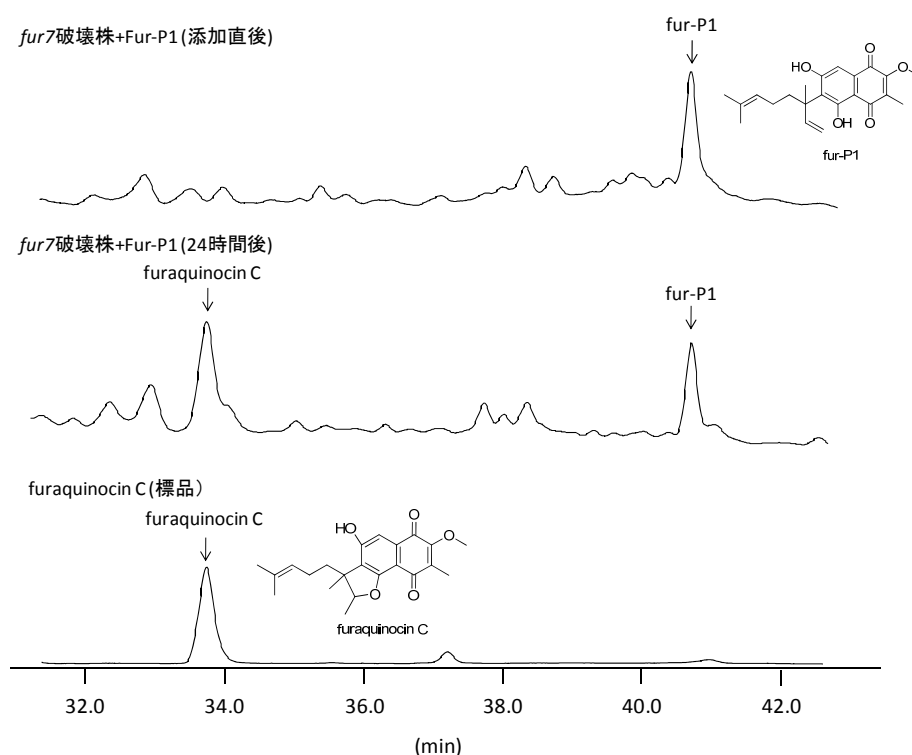


図 1-18 *fur7* 破壊株への fur-P1 添加実験の HPLC 分析

LC 条件は実験方法に記した。検出は Photo Diode array (MD-2010, JASCO)で行い 265 nm でのクロマトグラムを示した。*fur7* 破壊株本培養 2 日目に fur-P1 を 100 ml あたり 0.1 mg 添加した。さらに 24 時間培養し、培養液を抽出したところフラキノシン C と一致する溶出時間に新たなピークが検出された。

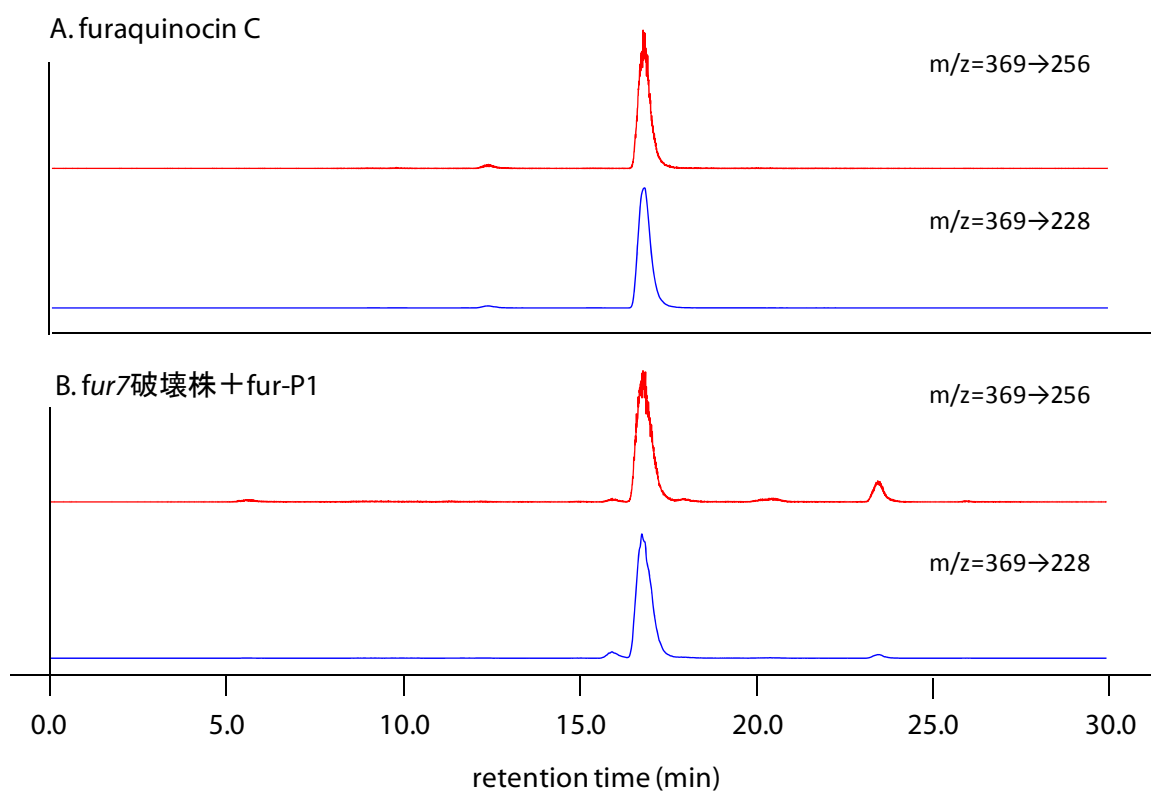


図 1-19 *fur7* 破壊株への furP1 添加実験の LC-MS/MS 分析

LC 条件は実験方法に記した。フラキノシン C は (ESI<sup>+</sup>) での測定により  $m/z=369$  の親イオンに対して  $m/z=228$ ,  $m/z=256$  のフラグメントが観察されたので  $m/z=369/256$  (red line)、 $369/228$  (blue line) でのマスキロマトグラムを示した (A)。*fur7*破壊株に fur-P1 を添加した培養液 (B) からもフラキノシン C が検出された。

## 第八節 Fur7 の機能解析

Fur7 の pH 依存性、金属イオン依存性について検討した。また、フラビオリン、1,3-DHN、生理的基質である 2-methoxy-3-methyl flaviolin を基質に活性測定を行い酵素動力学定数を求めた。

### 第一項 pH 依存性

2-methoxy 3-methyl flaviolin を基質にして Fur7 の pH 依存性を検討した。

### 実験方法

下記反応溶液 100  $\mu$ l を 3 連で調製し、20 分後に酢酸エチルで抽出、エバポレートしたのち残渣をメタノールに溶解し HPLC で分析した。ピーク面積から反応産物量を定量し各 pH での相対活性を求めた。

表 1-8 反応溶液組成

試薬	終濃度
MES (pH6.0, pH6.5), Hepes (pH 7.0, pH 7.5), Tris (pH8.0, 9.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	2 mM
2-methoxy-3-methyl flaviolin	0.3 mM
Fur7	1 mg/ml
milliQ water	
total	0.1 ml

## 結果

Fur7 は pH 7.0, pH7.5 で最も高い活性を示し、pH8.0, 9.0 のアルカリ性では 40%程度の活性を有していたが、pH6.0, 6.5 の酸性側では酵素が凝集してしまい活性がほとんど検出されなかった。Fur7 の活性は中性付近で最も高いことが判明した。

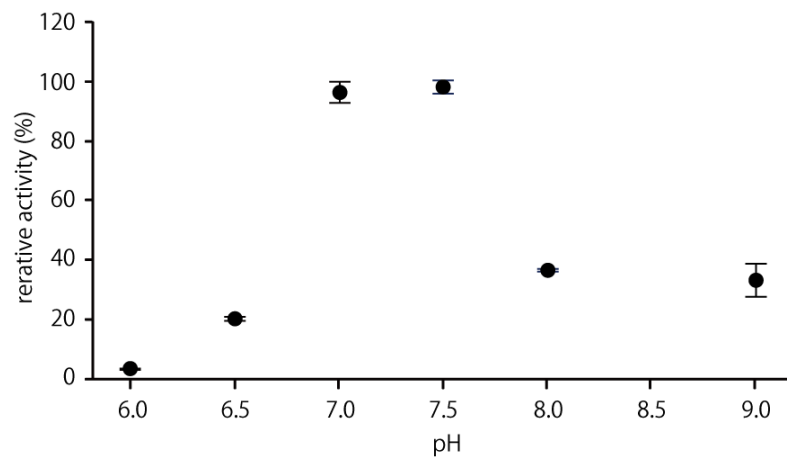


図 1-20 Fur7 活性の pH 依存性

pH 7.0, pH7.5 で最も高い活性を示した。酸性側では酵素が凝集してしまい活性はほとんど検出されなかった。

## 第二項 Fur7 活性の金属イオン依存性

Fur7 は金属イオン非依存的に反応することができるが、各種金属イオン依存性を検討した。

### 実験方法

下記反応溶液 100  $\mu$ l を 3 連で調製し、20 分後に酢酸エチルで抽出、エバポレートしたのち残渣をメタノールに溶解し HPLC で分析した。ピーク面積から反応産物量を定量し各金属イオンでの相対活性を求めた。

表 1-9 反応溶液組成

試薬	終濃度
Hepes (pH 7.5)	50 mM
EDTA, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , $\text{ZnCl}_2$ , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CaCl}_2$ , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5 mM (EDTA は 1 mM)
GPP	2 mM
2-methoxy-3-methyl flaviolin	0.3 mM
Fur7	1 mg/ml
milliQ water	
total	0.1 ml

## 結果

Fur7 は 1 mM EDTA を加えても活性を示し、金属イオン非依存性であった。一方で金属イオンの添加により活性に変化が見られ、 $\text{ZnCl}_2$  や  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を添加すると活性が大きく減少した。特に  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を添加した場合、凝集し沈澱してしまった。また、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  を添加したときに 30%の活性の上昇が観察された。

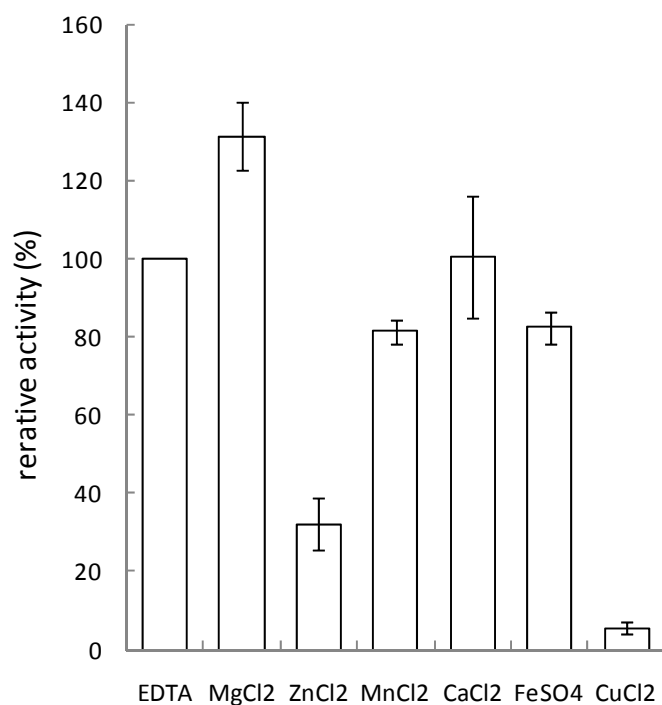


図 1-21 Fur7 の金属イオン依存性



### 第三項 Fur7 の反応速度論的解析

生理的基質である 2-methoxy-3-methyl flaviolin と、フラビオリン、1,3-DHN を基質に活性測定を行い酵素動力学定数を求めた。

#### (1) 2-methoxy 3-methyl flaviolin, GPP との反応速度論的解析

##### 実験方法

下記反応溶液を 500  $\mu$ l 調製し、10 分ごとに 100  $\mu$ l を酢酸エチルで抽出、エバポレートしたのち残渣をメタノールに溶解し HPLC で分析した。ピーク面積から反応産物量を定量し反応速度を求めて Sigma Plot 10.0 を用いて  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を算出した。

表 1-10 2-methoxy-3-methyl flaviolin に対する活性測定の反応溶液組成

試薬	終濃度
Hepes (pH 7.5)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	2 mM
2-methoxy-3-methyl flaviolin	0.03, 0.06, 0.15, 0.3, 0.5, 0.7 mM
Fur7	1 mg/ml
milliQ water	
total	0.5 ml

表 1-11 GPP に対する活性測定の反応溶液組成

試薬	終濃度
Hepes (pH 7.5)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 mM
2-methoxy-3-methyl flaviolin	0.3 mM
Fur7	1 mg/ml
milliQ water	
total	0.5 ml

## 結果

### 2-methoxy 3-mehtyl flaviolin に対する活性測定

2-methoxy-3-mehtyl flaviolin に対する活性測定を行った際、反応産物が fur-P1, fur-P2 の二種類できるので、それぞれについて  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を求めた (表 1-15)。Fur-P1 を定量し反応速度を求め、Sigma Plot 10.0 により計算すると  $K_m$ 、 $k_{cat}$  は  $K_m=0.054\pm0.009$  (mM)、 $k_{cat}=0.66\pm0.03$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) と求められた。このとき Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-22 のようになった。また、fur-P2 を定量し反応速度を求め、Sigma Plot 10.0 により計算すると  $K_m$ 、 $k_{cat}$  は  $K_m=0.41\pm0.19$  (mM)、 $k_{cat}=0.20\pm0.05$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) と求められた。このとき Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-23 のようになった。この結果から fur-P2 が生成する反応は fur-P1 が生成する反応に比べて  $K_m$  が 8 倍高く、おそらく生体内の低い基質濃度ではほとんど起こらないと考えられた。したがって in vivo では Fur7 によって 2-methoxy-3methyl flaviolin から選択的に fur-P1 が生成していると考えられる。

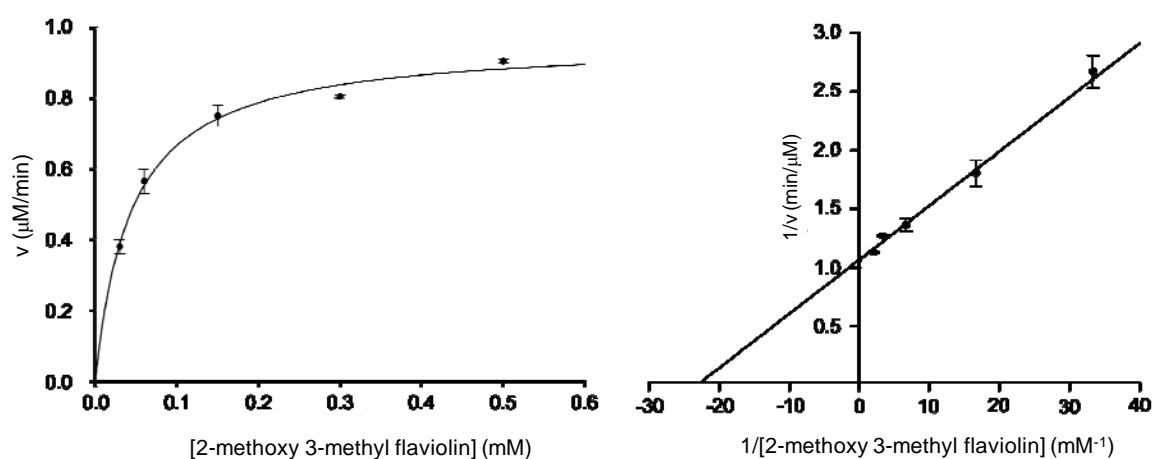


図 1-22 fur-P1 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P1 の生成量を定量し、2-methoxy-3-methyl flaviolin から fur-P1 が生成する反応は  $K_m=0.054\pm0.009$  (mM)、 $k_{cat}=0.66\pm0.03$  (s<sup>-1</sup>×10<sup>-3</sup>) と求められた。

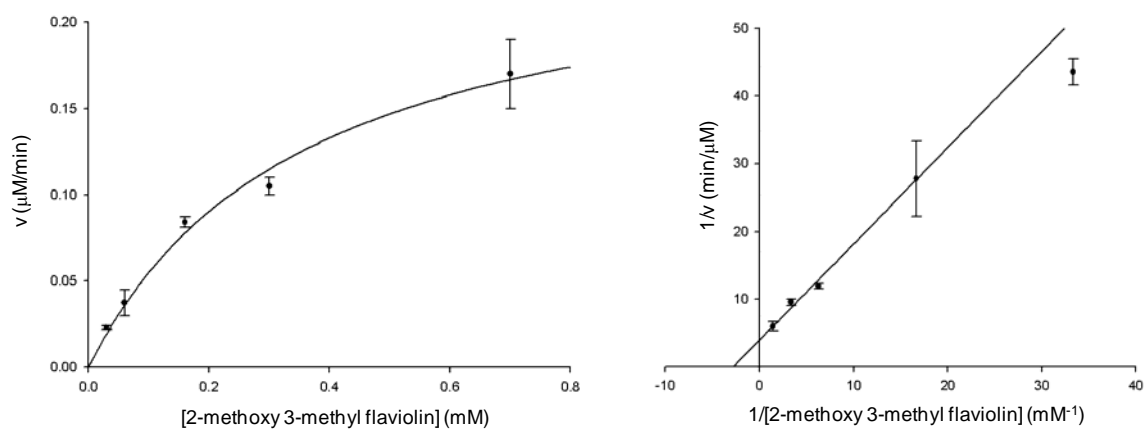


図 1-23 fur-P2 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P2 の生成量を定量し、2-methoxy-3-methyl flaviolin から fur-P2 が生成する反応は  $K_m=0.41\pm0.19$  (mM)、 $k_{cat}=0.20\pm0.05$  (s<sup>-1</sup>×10<sup>-3</sup>) と求められた。

## GPP に対する活性測定

2-methoxy-3-methyl flaviolin の濃度を 0.3 mM に固定し、GPP の濃度を実験方法に記したように 0.025 mM から 0.5 mM の間で変化させて GPP に対する  $K_m$  を求めた。

この反応についても fur-P1、fur-P2 の生成速度をそれぞれ求めて GPP に対する  $K_m$  を個別に求めた。その結果、fur-P1 が生成するときの GPP に対する  $K_m$  は  $0.073 \pm 0.010$  (mM) と算出された。その際の Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-24 のようになった。また、fur-P2 が生成するときの GPP に対する  $K_m$  は  $0.11 \pm 0.03$  (mM) と算出された。その際の Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-25 のようになった。この結果から fur-P1 が生成する反応は 2-methoxy 3-methyl flaviolin に対する  $K_m$  が低いだけでなく GPP に対する  $K_m$  も低く、より反応しやすいということが判明した。

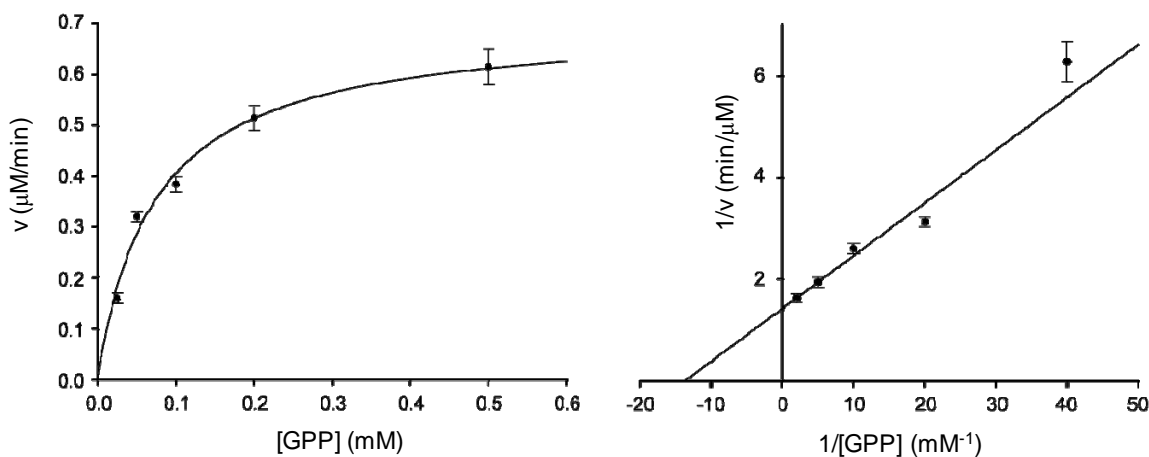


図 1-24 fur-P1 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P1 が生成するときの GPP の  $K_m$  は  $0.073 \pm 0.010$  (mM) と算出された。

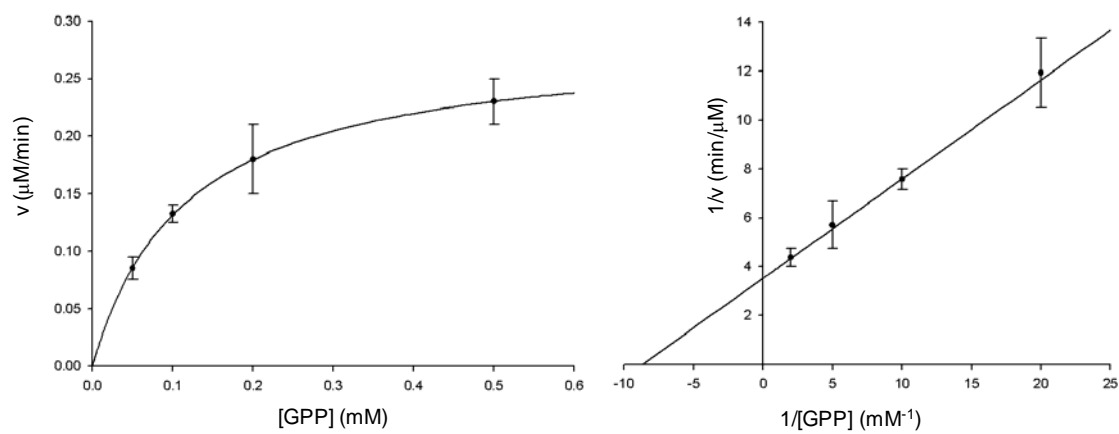


図 1-25 fur-P2 生成反応速度(Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P2 が生成するときの GPP の  $K_m$  は  $0.11 \pm 0.03$  (mM) と算出された。

## (2) フラビオリンと GPP、DMAPP との反応速度論的解析

下図のようにフラビオリンはフラキノシンの部分構造である。そのため、Fur7 の基質になりうると考え、表 1-12 のような反応溶液を調製し反応を試みた。その結果図 1-26 のように二つの反応産物が得られたため、HPLC で分取し構造を NMR で決定すると、ゲラニル基が 1 位で付加した (E)-3-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl) 2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (fur-P3)と、3 位にゲラニル基の 3 位で付加した 3-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl)-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (fur-P4) であった。NMR の測定値は実験項に記した。

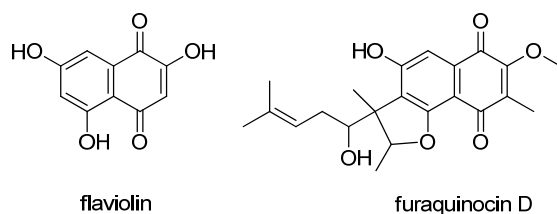


表 1-12 反応溶液組成

試薬	終濃度
Tris-HCl (pH 7.5)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	5 mM
flaviolin	5 mM
Fur7	1 mg/ml
milliQ water	
total	0.1 ml

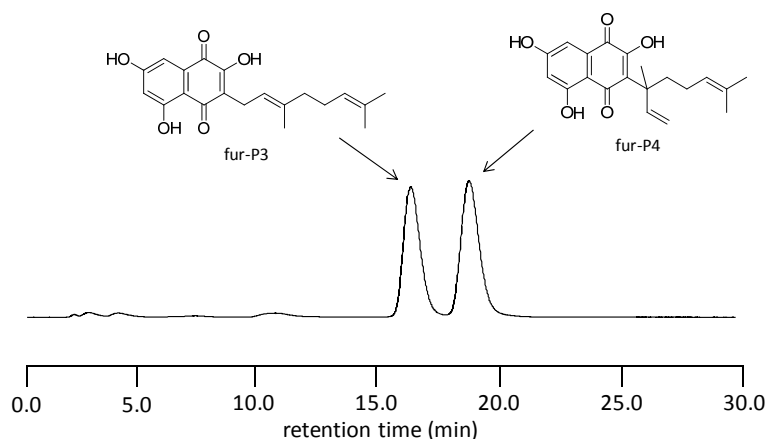


図 1-26 Fur7 によるフラビオリンのゲラニル化反応産物の HPLC 分析

以下の HPLC 条件で測定し 265 nm のクロマトグラムを示した。フラビオリンはすべて消費されて 16 min と 19 min に二つの反応産物が検出された。それぞれの構造は NMR によって決定した。

HPLC 条件: Column: 2 × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, methanol; B, water (+0.1% acetate), 0.2 ml/min  
75% A for 30min

Detector: Photo Diode Array (MD-2010, JASCO)

また、Fur7 はフラビオリンを基質としたとき DMAPP もプレニル基供与体として反応することができた。その結果、図 1-27 のように二つの反応産物が得られたため、HPLC で分取し NMR で構造を決定するとフラビオリンの 3 位に、ジメチルアリル基の 1 位が付加した (E)-3-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (fur-P5) と、フラビオリンの 3 位にジメチルアリル基の 3 位が付加した 3-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl)-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (fur-P6) であった。NMR の測定値は実験項に記した。

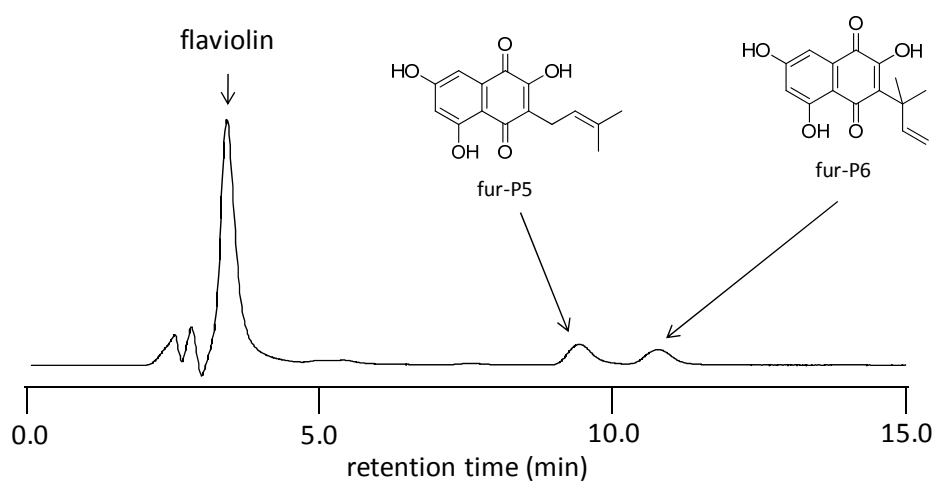


図 1-27 Fur7 によるフラビオリンのジメチルアリル化反応産物の HPLC 分析

以下の HPLC 条件で測定し 265 nm のクロマトグラムを示した。基質である flavioline のほかに 9 min と 11 min に二つの反応産物が検出された。それぞれの構造は NMR によって決定した。

HPLC 条件: Column: 2 × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, acetonitrile; water (+0.1% acetate), 0.2 ml/min  
57% for 15 min

Detector: Photo Diode Array (MD-2010, JASCO)



## (2-1) フラビオリン、GPP との反応速度論的解析

### 実験方法

下記反応溶液を 500  $\mu\text{l}$  調製し、10 分ごとに 100  $\mu\text{l}$  を酢酸エチルで抽出、エバポレー  
トしたのち残渣をメタノールに溶解し HPLC で分析した。ピーク面積から反応産物量を  
定量しフラビオリンと GPP から fur-P3、fur-P4 が生成する反応速度を算出して Sigma Plot  
10.0 を用いて  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を求めた。

表 1-13 Fur7 の flaviolin ゲラニル化反応活性測定の実験溶液組成

試薬	終濃度
Hepes (pH 7.5)	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
GPP	2 mM
flaviolin	0.06, 0.15, 0.3, 0.5, 1.0 mM
Fur7	0.01 mg/ml
milliQ water	
total	0.5 ml

### 結果

#### フラビオリンに対する活性測定

フラビオリンに対する活性測定を行った際、反応産物が fur-P3、fur-P4 (図 1-26) の  
二種類できるのでそれぞれについて  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を求めた (表 1-15)。まず、fur-P3 を定量  
し反応速度を求め、Sigma Plot 10.0 により計算すると  $K_m=0.064\pm0.006$  (mM)、 $k_{cat}=$   
 $13.5\pm0.30$  ( $\text{s}^{-1}\times10^{-3}$ ) と求められた。このとき Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロッ  
トは図 1-28 のようになった。次に、fur-P4 を定量し反応速度を求め、Sigma Plot 10.0 に

より計算すると  $K_m=0.044\pm0.003$  (mM)、 $k_{cat}=17.9\pm0.20$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) と求められた。このとき Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-29 のようになった。この結果から Fur7 は 2-methoxy-3-methyl flaviolin よりもフラビオリンに対して、反応効率が 50 倍高いことが分かった。しかしフラビオリンは 3 位がプレニル化されてしまうため、生理的基質ではない。

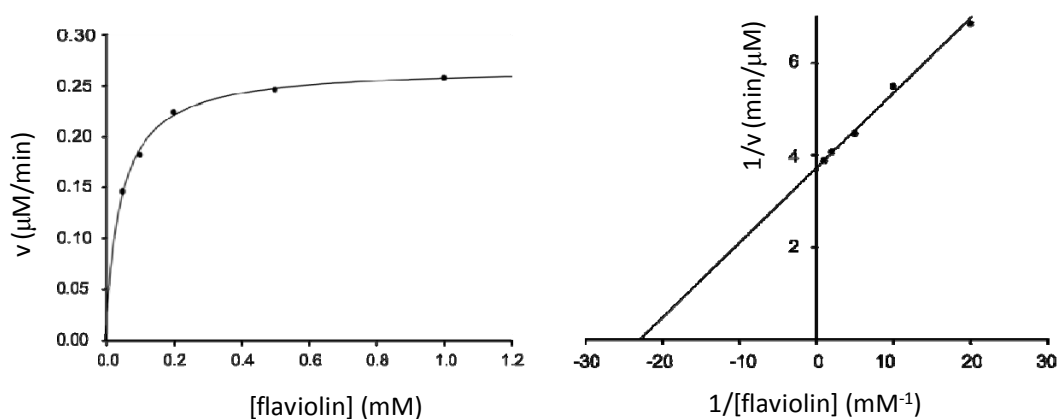


図 1-28 fur-P3 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P3 が生成する反応は  $K_m=0.064\pm0.006$  (mM)、 $k_{cat}=13.5\pm0.30$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) と求められた。

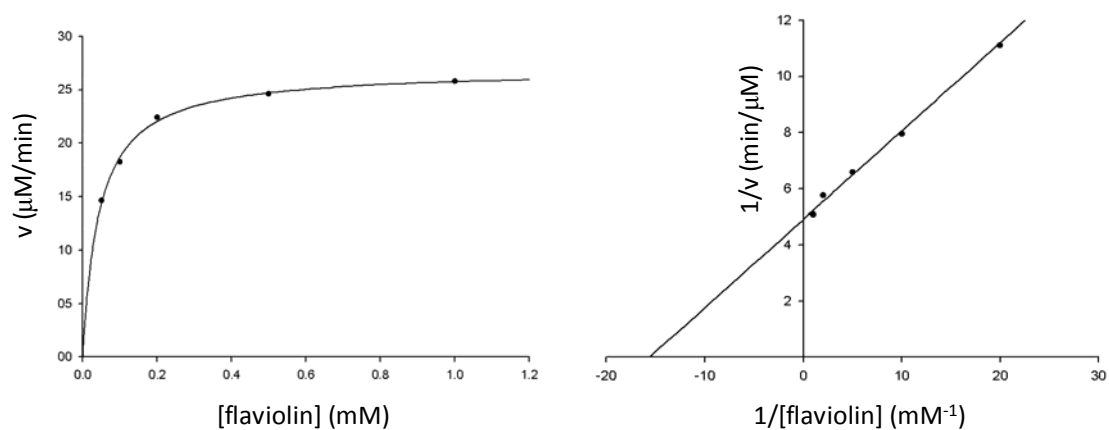


図 1-29 fur-P4 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P4 生成反応の酵素動力学定数を  $K_m=0.044\pm0.003$  (mM)、 $k_{cat}=17.9\pm0.20$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) と求めた。

## (2-2) フラビオリン、DMAPP との反応速度論的解析

### 実験方法

上記反応溶液を 500  $\mu$ l 調製し、10 分ごとに 100  $\mu$ l を酢酸エチルで抽出、エバポレー  
トしたのち残渣をメタノールに溶解し HPLC で分析した。ピーク面積から反応産物量を  
定量し反応速度を算出して Sigma Plot 10.0 を用いて  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を算出した。

表 1-14 Fur7 の flaviolin ジメチルアリル化反応活性測定の実験溶液組成

試薬	終濃度
Hepes (pH 7.5)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
DMAPP	0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mM
flaviolin	0.1, 0.2, 0.5 mM
Fur7	0.01 mg/ml
milliQ water	
total	0.5 ml

### 結果

#### フラビオリンに対する活性測定

フラビオリンに対する活性測定を行った際、反応産物が fur-P5、fur-P6 の二種類で  
るのでそれぞれについて  $K_m$ 、 $k_{cat}$  を求めた (表 1-15)。fur-P5 を定量し反応速度を求め、  
Sigma Plot 10.0 により計算すると  $K_m=0.48\pm0.04$  (mM)、 $k_{cat}=0.32\pm0.02$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) と求め  
られた。このとき Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-30 のようになった。  
また、fur-P6 を定量し反応速度を求め、Sigma Plot 10.0 により計算すると  $K_m=0.50\pm0.03$

(mM)、 $k_{cat}=0.41\pm0.02$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) と求められた。このとき Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-31 のようになった。

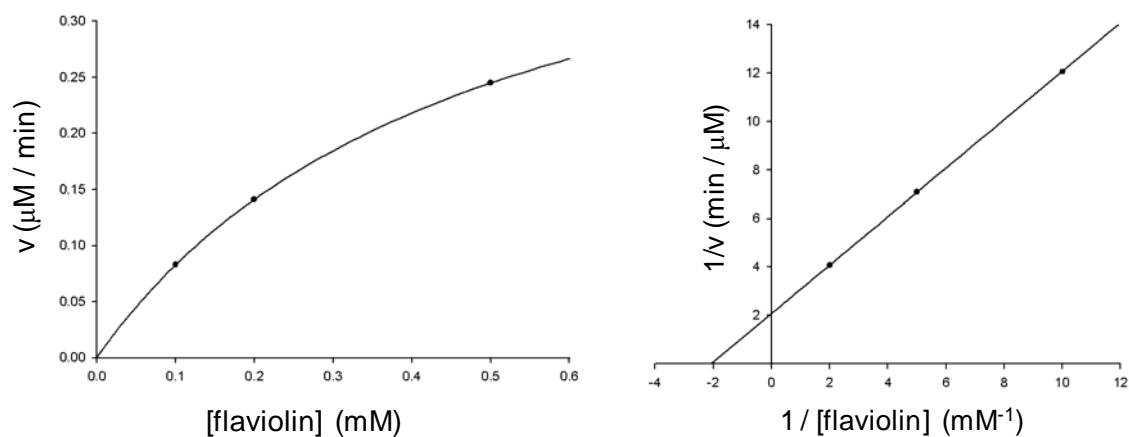


図 1-30 fur-P5 生成反応速度(Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P5 が生成する反応の flaviolin に対する酵素動力学定数を求め、 $K_m=0.48\pm0.04$  (mM)、 $k_{cat}=0.32\pm0.02$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) とした。

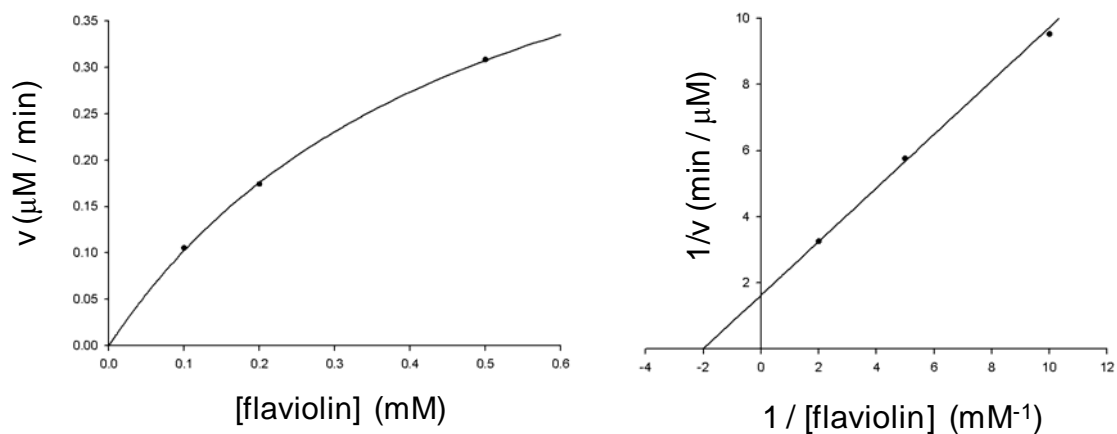


図 1-31 fur-P6 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P6 が生成する反応の flaviolin に対する酵素動力学定数を求め、 $K_m=0.50\pm0.03$  (mM)、 $k_{cat}=0.41\pm0.02$  ( $s^{-1}\times10^{-3}$ ) とした。

## DMAPP に対する活性測定

フラビオリンの濃度を 0.3 mM に固定し、DMAPP の濃度を実験方法に記したように 0.1 mM から 1.0 mM の間で変化させて DMAPP に対する  $K_m$  を求めた。

この反応についても fur-P5、fur-P6 の生成速度をそれぞれ求めて DMAPP に対する  $K_m$  を個別に求めた。その結果、fur-P5 が生成するときの DMAPP に対する  $K_m$  は  $0.86 \pm 0.25$  (mM) と算出された。その際の Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-32 のようになった。また、fur-P6 が生成するときの DMAPP に対する  $K_m$  は  $0.67 \pm 0.23$  (mM) と算出された。その際の Michaelis-Menten、Lineweaver-Burk プロットは図 1-33 のようになった。

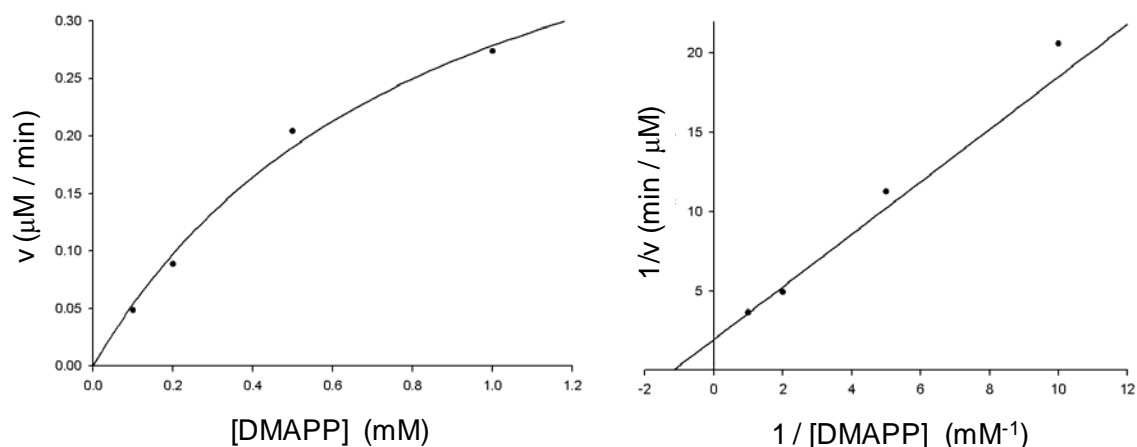


図 1-32 fur-P5 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P5 が生成するときの DMAPP の  $K_m$  は  $0.86 \pm 0.25$  (mM) と算出された。

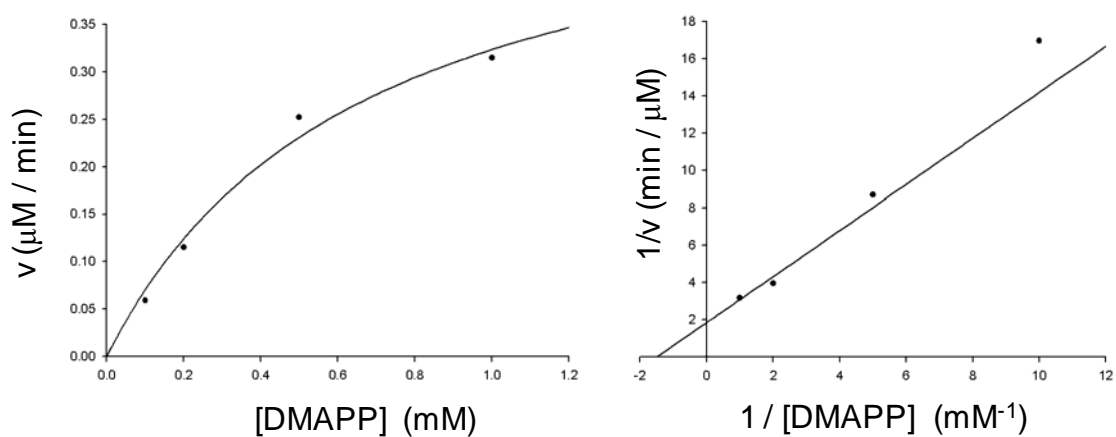


図 1-33 fur-P6 生成反応速度 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk plot)

fur-P6 が生成するときの DMAPP の  $K_m$  は  $0.67 \pm 0.23$  (mM) と算出された。

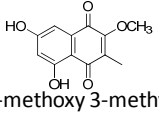
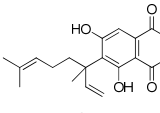
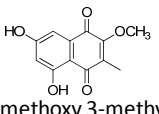
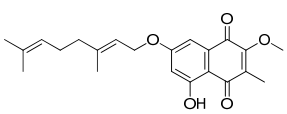
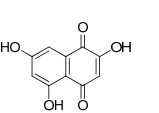
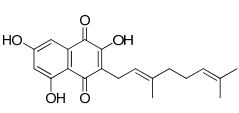
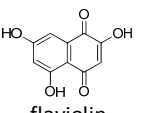
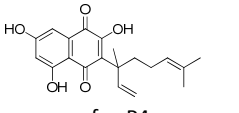

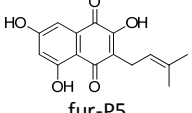

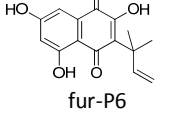
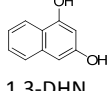
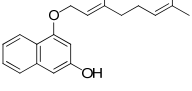
## まとめ

Fur7 の 2-methoxy-3-methyl flaviolin, フラビオリン, 1,3-DHN に対する酵素力学的定数を求めた。すると 2-methoxy-3-methyl flaviolin に対しては  $K_m = 0.054 \pm 0.009$  (mM),  $k_{cat} = 0.66 \pm 0.03$  ( $s^{-1} \times 10^{-3}$ ) と算出された。一方でフラビオリンに対しては  $K_m = 0.064 \pm 0.006$  (mM),  $k_{cat} = 13.5 \pm 0.3$  ( $s^{-1} \times 10^{-3}$ ) であり、 $K_m$  の値はほぼ同等であった(表 1-15)。in vitro においてはフラビオリンに対してより活性が強かったが、フラビオリンを基質にした場合 6 位ではなく 3 位がプレニル化されるため、フラキノシン生合成中間体とは考えられない。したがって、たとえ酵素活性がよいとしてもフラビオリンは生理的基質ではない。一方で 1,3-DHN に対しては  $K_m = 0.30 \pm 0.07$  (mM),  $k_{cat} = 0.15 \pm 0.01$  ( $s^{-1} \times 10^{-3}$ ) であった(表 1-15)。

1,3-DHN と比較すると  $K_m$  の値も十分小さいことから 2-methoxy 3-methyl flaviolin が Fur7 の生理的基質であると結論付けた。

また、Fur7 はフラビオリンを基質としたとき DMAPP もプレニル基共与体とし、反応した。GPP に対して  $K_m = 0.073 \pm 0.010$  (mM) であるのに対し、DMAPP に対しては  $K_m = 0.86 \pm 0.25$  (mM) だったが、これまでに放線菌由来プレニルトランスフェラーゼでは NphB が本来の基質である GPP のほかにわずかに DMAPP と反応することが報告されているだけで[42]、これほど両方と反応する酵素の報告はなく、結晶構造解析ができれば基質の鎖長を決定するアミノ酸残基が明らかになるかもしれない。

表 1-15 1,3-DHN, フラビオリン, 2-methoxy 3-methyl flaviolin に対する酵素動力学的定数

substrate	$K_m$ (mM)	product	$k_{cat} (s^{-1}) \times 10^3$ $k_{cat}/K_m (M^{-1}s^{-1})$
 2-methoxy 3-methyl flaviolin	<b><math>0.054 \pm 0.009</math></b>	 fur-P1	<b><math>0.66 \pm 0.03</math></b> <b>12.2</b>
 2-methoxy 3-methyl flaviolin	$0.41 \pm 0.19$	 fur-P2	$0.20 \pm 0.05$ 0.48
 flaviolin	<b><math>0.064 \pm 0.006</math></b>	 fur-P3	<b><math>13.5 \pm 0.3</math></b> <b>211</b>
 flaviolin	<b><math>0.044 \pm 0.003</math></b>	 fur-P4	<b><math>17.9 \pm 0.2</math></b> <b>448</b>
 flaviolin	$0.48 \pm 0.04$	 fur-P5	$0.32 \pm 0.02$ 0.67
 flaviolin	$0.50 \pm 0.07$	 fur-P6	$0.41 \pm 0.02$ 0.82
 1,3-DHN	$0.30 \pm 0.07$	 1-O-geranyl 1,3-DHN	$0.15 \pm 0.01$ 0.50



## 第九節 考察

*fur7* 破壊株培養液より Fur7 と反応する化合物 2-methoxy-3-methyl flaviolin を取得した。Fur7 による *in vitro* 反応において 2-methoxy-3-methyl flaviolin から fur-P1、fur-P2 が合成された。fur-P1 を *fur7* 破壊株培養液に加えることでフラキノシンが検出されたことから、fur-P1 はフラキノシン生合成中間体であるといえ、その基質である 2-methoxy-3-methyl flaviolin は生理的基質であると結論した。ポリケタイドーテルペノイド融合化合物生合成においてプレニルトランスフェラーゼの生理的基質が明らかになったのはこれが初めてである。

また、反応機構は図 1-34 のように考えられる。まず GPP からヘテロリシスによりプレニルカチオンが生じ、電子の共役によって 1 級カチオンと 3 級カチオンの平衡状態になる。3 級カチオンが 2-methoxy-3-methyl flaviolin の芳香環と求電子置換反応により反応して化合物 fur-P1 が生成し、1 級カチオンが水酸基と反応すると化合物 fur-P2 が生成すると考えられる。fur-P1 と fur-P2 は 10:1 で生成し、一般的には 3 級カチオンが安定であるからこの結果は妥当であると考えられるが、Fur7 がフラビオリンと反応する場合は 1 級カチオンと 3 級カチオンの両方が 3 位の炭素と反応し fur-P3、fur-P4 を 1:1 で生成する (図 1-26)。2-methoxy-3-methyl flaviolin の 6 位とは 3 級カチオンのみが反応することから、フラビオリンの 2 位の水酸基と 3 位がメチル化されることによって、2-methoxy-3-methyl flaviolin は 1 級カチオンが 6 位の炭素と反応できない位置に結合されるのではないかと推測される。したがって fur-P1 と fur-P2 の生成比は 3 級カチオンの安定性だけではなく、酵素との結合状態によるところも大きいと考えられる。また、このことより 2 位の水酸基及び 3 位のメチル化は Fur7 の反応より前に起こると考えられた。

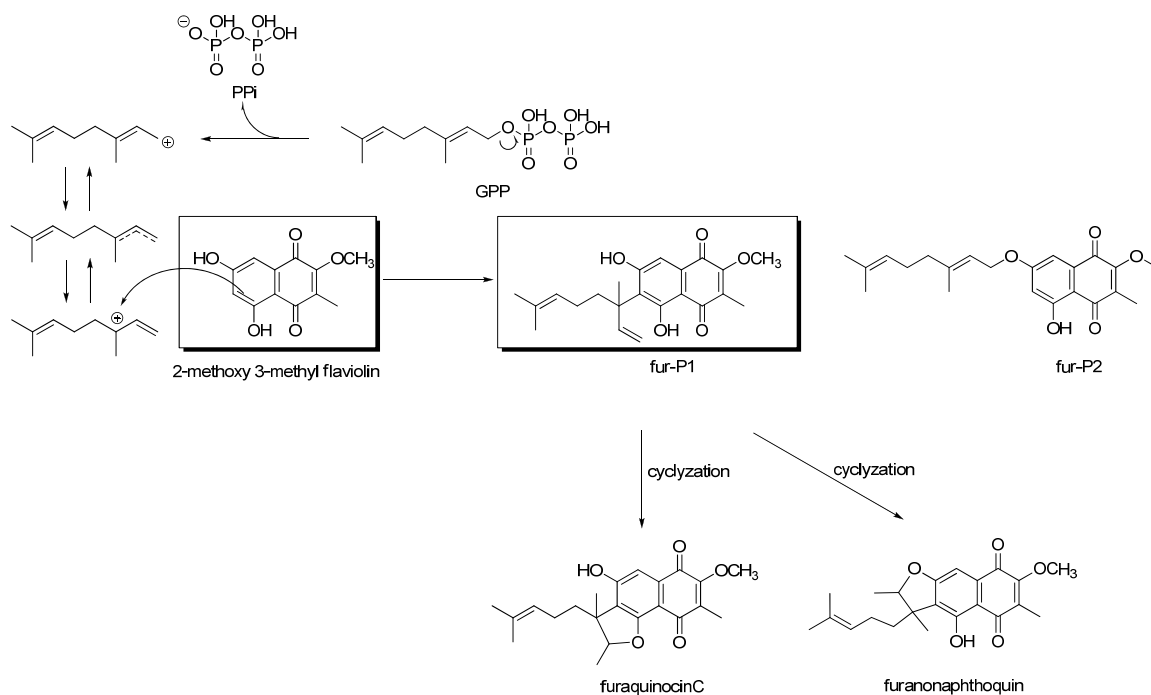


図 1-34 反応機構

また、*Streptomyces cinnamonensis* が生産するフラノナフトキノンはフラキノシンとは環化の位置が異なるのみであり環化酵素以外の生合成酵素は共通していると考えられる。フラノナフトキノン生合成遺伝子クラスターのプレニルトランスフェラーゼ Fmq26 もフラビオリンを基質とした場合 Fur7 と同様に 3 位の位置にゲラニルカチオンの 1 位もしくは 3 位を付加し、fur-P3 と fur-P4 を合成することが報告されている[43]。このことから Fmq26 の生理的基質もやはりフラビオリンではなく、2-methoxy-3-methyl flaviolin が共通の基質であると考えられる。今後、fur-P1 を基質とすることでフラキノシン、フラノナフトキノン両生合成に関与する環化酵素の機能解析が行えるものと考えている。

## 第2章 ナフテルピンの生合成

## 第一節 ナフテルピン生合成遺伝子クラスターの機能予測

抗酸化物質ナフテルピンは放線菌 *Streptomyces* sp. CL190 株が生産するポリケタイド-テルペノイド融合化合物である。ナフテルピンの生合成遺伝子はメバロン酸経路遺伝子クラスターの上流に NphA から NphN まで 14 個の ORF を含むクラスターを形成している (表 2-1)。ナフテルピン生合成は大きく分けてテルペノイドの合成、ポリケタイドの合成、ポリケタイドの 6 位のメチル化、ポリケタイドとテルペノイドの融合 (ゲラニル化)、テルペノイド部分の環化からなる。これまでの研究により、図 2-2 のようにテルペノイド部分は NphN が合成する炭素数 10 の GPP に由来し、ポリケタイド部分は 5 分子の malonyl CoA から NphC、NphD によって合成される THN 誘導体由来と考えられている。また、6 位のメチル基は *S*-adenosylmethionine に由来することが明らかになっている [44]。

ナフテルピン生合成の鍵反応であるポリケタイドとテルペノイドの縮合は芳香族基質プレニルトランスフェラーゼ NphB が触媒すると考えられる。しかし、NphB の生理的基質となるポリケタイド化合物は同定されていない。当研究室の織田により *nphB* 破壊株に特異的に蓄積する化合物 3,6,8-trihydroxy-2-methoxy-7-methyl-1,4-naphthoquinone (d2-8) が同定されたが、d2-8 は NphB の基質にならず NphB の基質が菌体内でさらに修飾された Shunt product であるとされた (図 2-3)。

本研究では、ゲラニル化破壊株 (*nphB* 破壊株) とメチル化酵素破壊株 (*nphF* 破壊株)を用いてナフテルピン生合成における NphB の機能解明を目指した。

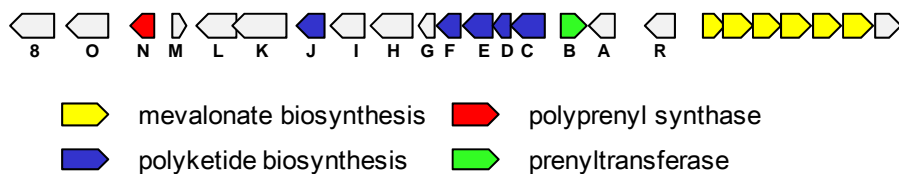


図 2-1 ナフテルピン生合成遺伝子クラスター

表 2-1 ナフテルピン生合成遺伝子クラスター中の ORF

Gene	Amino	Proposed function	Sequence similarity	Similarity /	Protein	Reference
Product	acids (no.)		(protein, origin)	Identity (%)	accession number	
NphA	319	sigma factor	Orf1, <i>Streptomyces antibioticus</i>	97 / 92	BAB89288	[37]
NphB	307	Putative prenyltransferase	Fnq26, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	61 / 42	CAL34104	[39]
NphC	410	TypIII polyketide syntase	RppA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	95 / 89	BAB91443	[36]
NphD	188	quinone-forming monooxygenase	MomA, <i>Streptomyces antibioticus</i>	89 / 84	BAD89290	[37]
NphE	385	aminotransferase	Fur3, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	88 / 79	BAE78971	[35]
NphF	331	SAM dependent O-methyltransferase	FNQ9, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	86 / 77	CAL34087	[39]
NphG	206	NAD(P)H:quinone oxidoreductase	Fnq10, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	86 / 72	CAL34088	[39]
NphH	528	fatty-acid-CoA ligase	NapB4, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	88 / 81	ABS50481	[38]
NphI	410	putative SAM synthase	Fnq12, <i>Streptomyces cinnamonensis</i>	92 / 87	CAL34090	[39]
NphJ	356	SAM dependent C-methyltransferase	NapB5, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	84 / 72	ABS50493	[38]
NphK	634	hypothetical protein	Fur16, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	84 / 76	BAE78984	[35]
NphL	455	3-carboxy-cis,cis-muconate cycloisomerase	Fur17, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	89 / 86	BAE78985	[35]
NphM	208	hypothetical protein	NapU1, <i>Streptomyces</i> sp. CNQ525	74 / 59	ABS50449	[38]
NphN	355	trans-polyprenyl diphosphate synthase	Fur19, <i>Streptomyces</i> sp. KO-3988	80 / 73	BAE78987	[35]

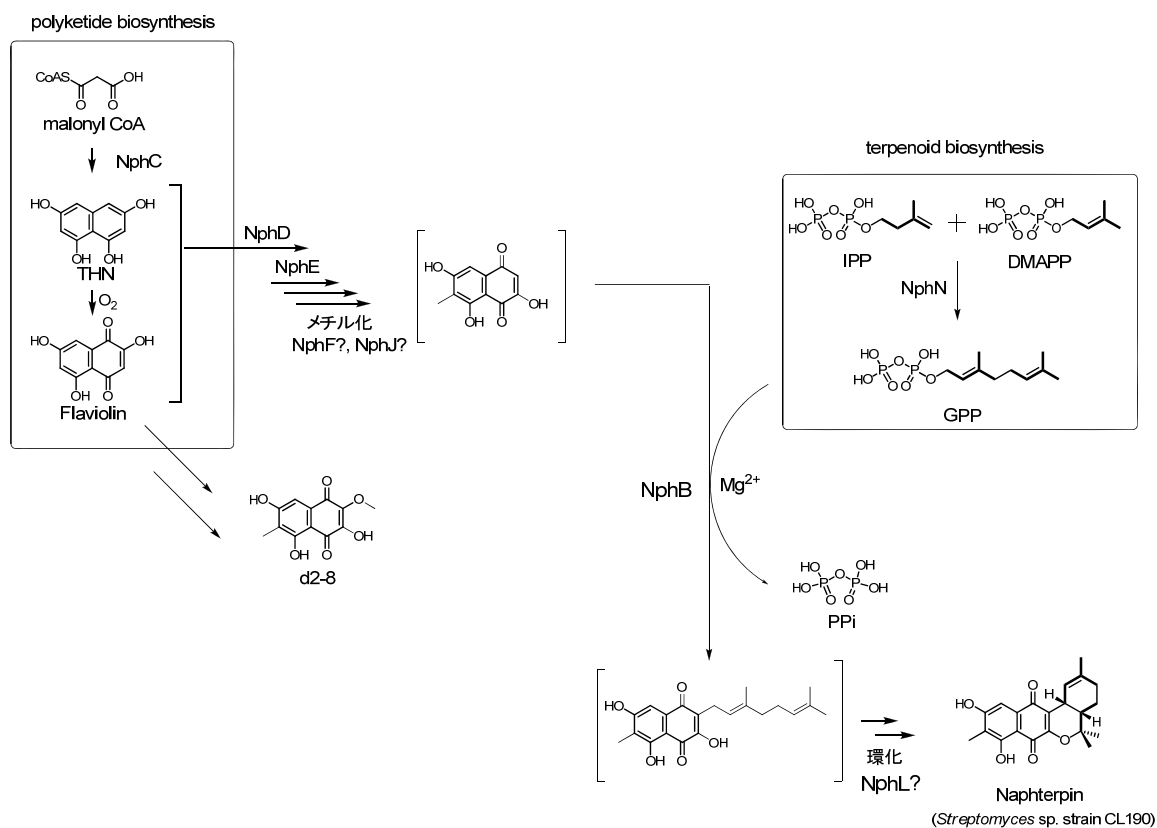


図 2-2 ナフテルピン予想生合成経路

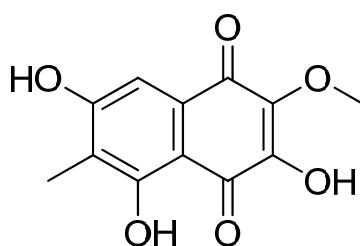


図 2-3 d2-8 の構造

## 第二節 *nphB* 破壊株、*nphF* 破壊株の作製方法と確認

### 第一項 *nphB* 破壊株の作製方法と確認

*nphB* 破壊株は前任者が作製したものをを用いた。その株を使用するに当たり、サザンハイブリダイゼーションにより正しく破壊されていることを確認した。

*nphB* 破壊株は以下のような手順で作製された。まず、*nphB* を含む 9.0 kb の *Bam*HI- *Bam*HI DNA 断片を大腸菌 *E.coli* 用ベクター pUC118 の *Bam*HI サイトにクローニングした。このプラスミドを pCL3301 とした。次に、pCL3301 を *Eco*RI 処理し、生じた 3.5 kb の *Eco*RI-*Eco*RI DNA 断片を pUC118 の *Eco*RI サイトにクローニングした。このプラスミドを pCL3301E3 とした。また、pCL3301 の 2.0 kb の *Bam*HI-*Eco*RI DNA 断片を pBluescript の *Bam*HI-*Eco*RI サイトにクローニングし pCL3301BE2 とした。次に pCL3301E3 を *Bg*/III で制限酵素処理し、T4 DNA polymerase でブラント処理したのちセルフライゲーションさせた。これにより *nphB* がフレームシフト変異を起こす。このプラスミドを pCL3301Bg とした。次に pCL3301Bg から切り出した 3.5 kb の *Eco*RI-*Eco*RI DNA 断片を pCL3301BE2 の *Eco*RI サイトにクローニングした。これを pBlueNphB とした。そして pBlueNphB から 5.5 kb の *Xba*I-*Kpn*I DNA 断片を放線菌—大腸菌シャトルベクターである pSE101 の同サイトにクローニングした。これを pSEdNphB として *Streptomyces* sp. CL190 株を形質転換し 20 µg/ml のチオストレプトンを含む培地で選択した。次に、この形質転換体を 20 µg/ml のチオストレプトンを含む SKII 培地で 30 °C、3 日間培養し、プロトプラストを調製してチオストレプトンを含まない R2YE 寒天培地で培養した。そして各コロニーを、チオストレプトンを含む Bennett 培地と含まない Bennett 培地で同時に培養しチオストレプトン感受性になったコロニーを *nphB* 破壊株とした。

## 実験方法

遺伝子破壊の確認は *Streptomyces* sp CL190 株のゲノムを *Eco*RI と *Bgl*II で消化後、PCR で増幅した *nphB* をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションで行った。

## 結果

*nphB* 破壊株では 3.5 kb の *Eco*RI-*Eco*RI DNA 断片が *bg*III サイトでフレームシフトを起こし、切断されなくなっていることを確認した (図 2-5)。

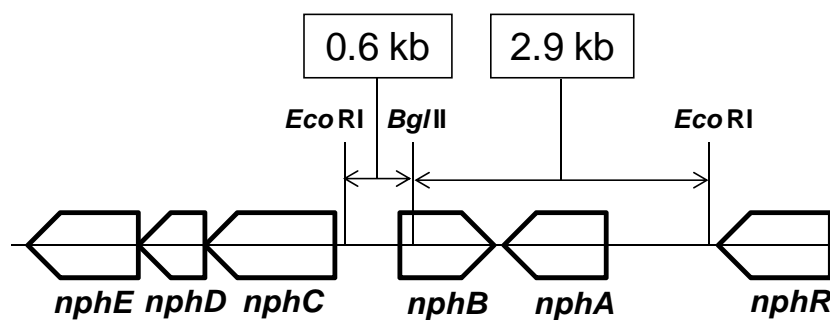


図 2-4 *nphB* 遺伝子破壊方法

*Bgl*II サイトをブラント処理しセルフライゲーションさせてフレームシフトにより *nphB* を破壊した。



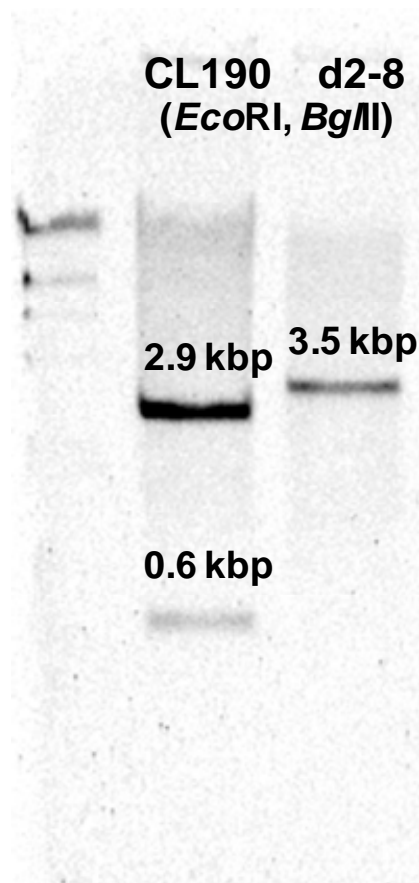


図 2-5 *nphB* 破壊確認 サザンハイブリダイゼーション

*nphB* 遺伝子をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションで *nphB* の破壊を確認した。*nphB* 破壊株では *Bg*/II サイトがブラント、セルフライゲーションにより欠失しているので *Bg*/II で切断されずに 3.5 kb の *Eco*RI-*Eco*RI 断片が検出された。

## 第二項 *nphF* 破壊株の確認

### 実験方法

遺伝子破壊の確認は *Streptomyces* sp CL190 株のゲノムを *Bam*HI と *Bgl*II で消化後、PCR で増幅した *nphF* をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションで行った。

### 結果

*nphF* 破壊株で 0.3 kb の *Bgl*II-*Bgl*II DNA 断片が欠失していることを確認した (図 2-7)。

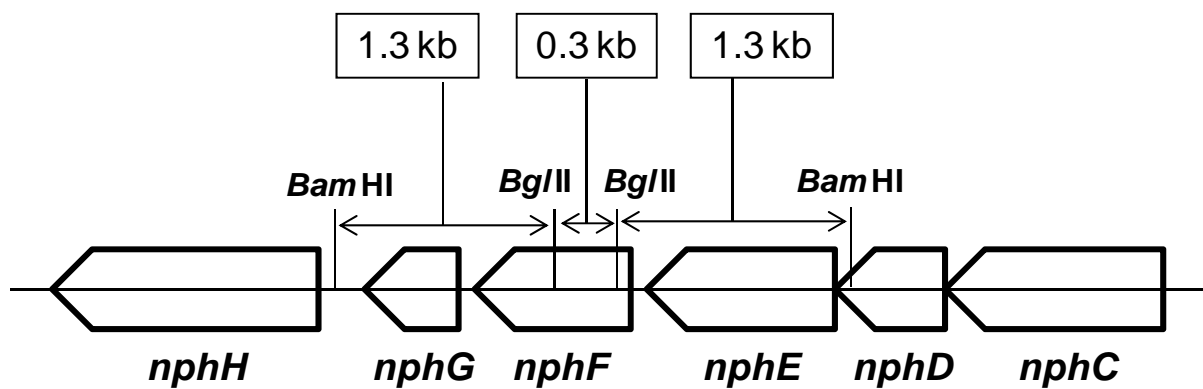


図 2-6 *nphF* 遺伝子破壊方法

*Bgl*II-*Bgl*II 断片を切り出しセルフライゲーションにより *nphF* 破壊株を作製した。

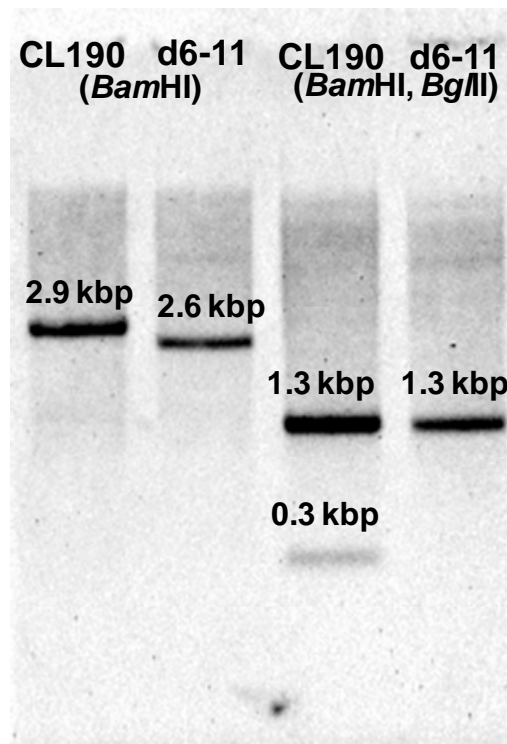


図 2-7 *nphF* 破壊確認 (サザンハイブリダイゼーション)

*nphF* 遺伝子をプローブにしたサザンハイブリダイゼーションで *nphF* の破壊を確認した。*nphF* 破壊株では 0.3 kb の *Bgl*II-*Bgl*II 断片がサイトがセルフライゲーションにより欠失しているので *Bam*HI のみで切断した場合 0.3 kb 短い断片が検出され、*Bam*HI と *Bgl*II で切断した場合は 0.3 kb の *Bgl*II-*Bgl*II 断片が切りだされずに 1.3kb の *Bam*HI-*Bam*HI 断片のみが検出された。

### 第三節 CL190 株及び *nphB* 破壊株、*nphF* 破壊株の生産物の比較

ナフテルピン生合成経路を明らかにするためにゲラニル化酵素破壊株 (*nphB* 破壊株)、メチル化酵素破壊株 (*nphF* 破壊株) の培養抽出物からナフテルピン生合成中間体を単離することを目的とした。

#### 実験方法

当研究室では野生株 (*Streptomyces* sp. CL190 株) の他に先に述べた *nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株の 2 種類の破壊株が作製されている。そこで、まず 2 種類の破壊株を SKII 培地で 30°C、2 日間培養したのち、KG 培地で 27°C、3 日間本培養した。培養液を菌体と上清に分け、菌体はアセトン抽出し、ろ過によって菌体を除いた後、アセトンをエバポレートした。残った水層に対して酢酸エチルを等量加えて抽出し、酢酸エチルに混入した水を完全に除くために Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を適量加え、1 時間静置した。つぎに、酢酸エチルをエバポレートし、残渣をメタノールに溶解して HPLC で分析した。上清は酢酸エチル抽出して分析した。

#### HPLC 条件:

Column: 4.6 × 250 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, methanol; B, water (+0.1% acetate), 1.0 ml/min

40% A for 10 min, 40%-100% A over 45 min, 100% for 15 min

Detector: Photo Diode Array (MD-2010, JASCO)

## 結果

### 培養上清の分析結果

CL190 株 (野生株)、*nphB* 破壊株、*nphF* 破壊株についてそれぞれの培養上清から酸性条件(HCl で pH2.0 程度に調整) で酢酸エチル抽出したサンプルを HPLC で分析した(図 2-9)。

*nphB* 破壊株からは当研究室で以前単離された d2-8 (図 2-3) の他に蓄積している化合物は検出できなかった。また、*nphF* 破壊株には CL190 と *nphB* 破壊株にはない化合物の蓄積は特には検出できなかった。

### 菌体抽出物の分析結果

培養上清と同様に抽出し、サンプルを HPLC で分析した (図 2-10)。*nphB* 破壊株、*nphF* 破壊株からは d2-8, ラバンドシアニン (図 2-8) のほかに蓄積している化合物は検出できなかった。ラバンドシアニンはナフトルピンと同様に *Streptomyces* sp CL190 株が生産する二次代謝産物でイソプレノイドジリン酸由来のテルペノイド構造を持っている。

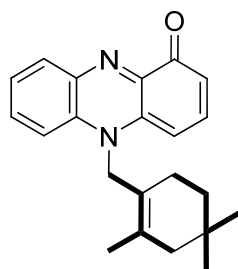


図 2-8 ラバンドシアニンの構造

Bold であらわした部分がテルペノイド構造である。

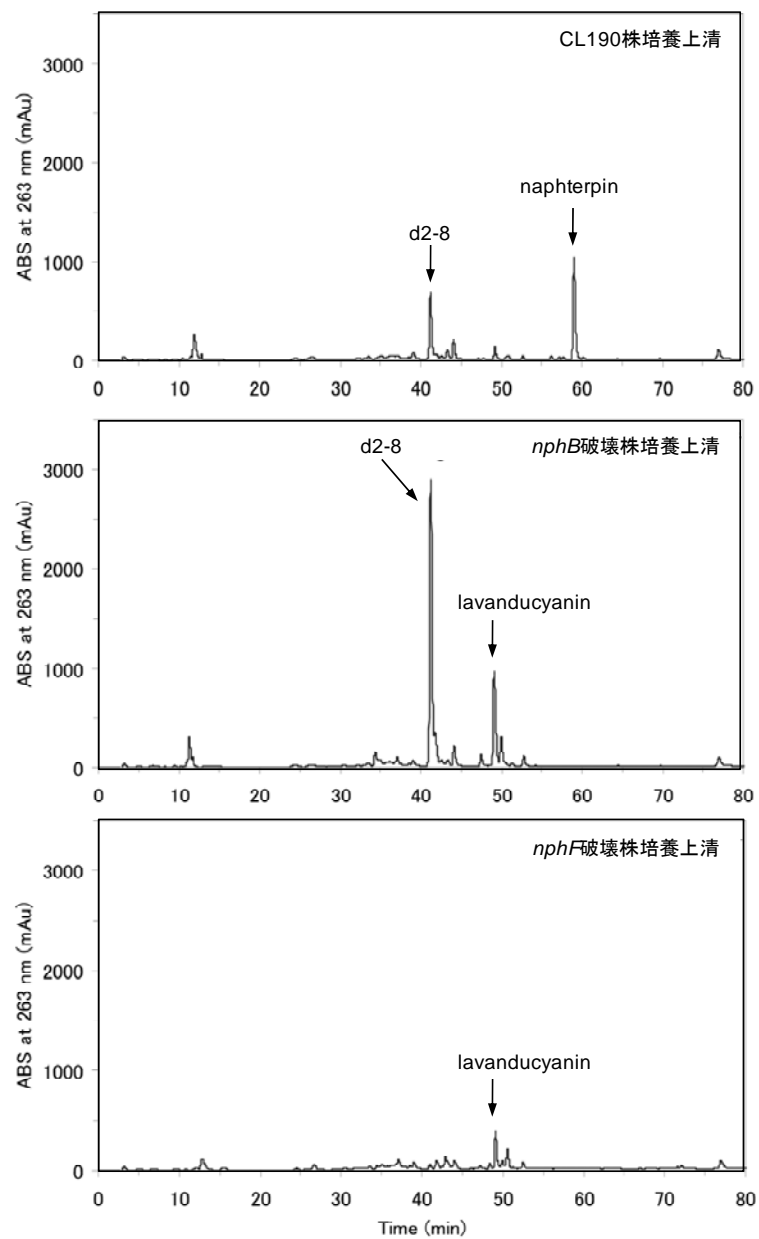


図 2-9 CL190 株、*nphB* 破壊株、*nphF* 破壊株の培養上清の HPLC

*nphB* 破壊株培養上清にはナフテルピンは検出できず、ナフテルピンが合成されなかったことによりラバンドシアニンの生産が増大した。また、*d2-8* 以外に蓄積している化合物は検出出来なかった。

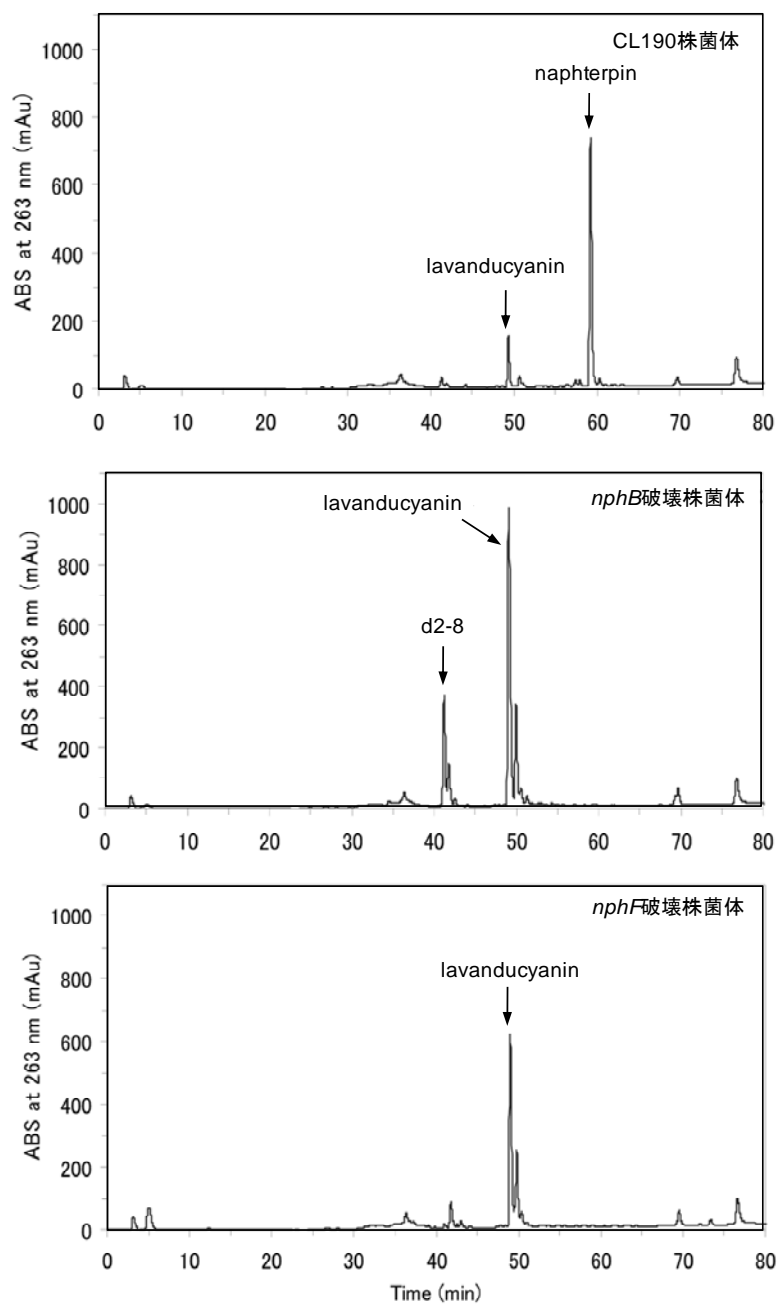


図 2-10 CL190 株、*nphB* 破壊株、*nphF* 破壊株の菌体抽出物の HPLC

*nphB* 破壊株菌体にはナフテルピンは検出されず、ラバンドシアニンの生産が増大した。また、d2-8 以外に蓄積している化合物は検出できなかった。

## 考察

NphF は、ナフトテルピンの生合成において、6 位のメチル化反応に関与していると考えられる。しかしながら、*nphF* 破壊株にはデメチルナフトテルピン (図 2-11) [45]やフラビオリンに類似した化合物がゲラニル化されたと考えられる UV スペクトルを持つ化合物の蓄積は観察されなかった。このことはナフトテルピン生合成において NphB によるポリケタイド部分のゲラニル化は NphF によるメチル化の後に起こることを示唆している。

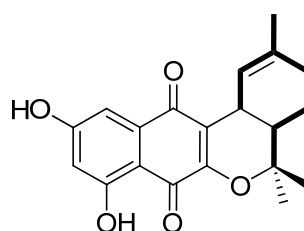


図 2-11 デメチルナフトテルピンの構造

さらに、*nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株では、ラバンドシアニンの生産が CL190 株と比較して増大していた。ラバンドシアニンは phenazine 骨格に IPP と DMAPP から合成される lavandulyl 基が付加した構造をしている[46]。そのため CL190 株ではナフトテルピンの生産と IPP、DMAPP の利用について拮抗していると考えられる。しかし両破壊株ではナフトテルピンが合成されないため IPP と DMAPP がラバンドシアニンの合成により多く使われ、生産量が増大したと考えられる。

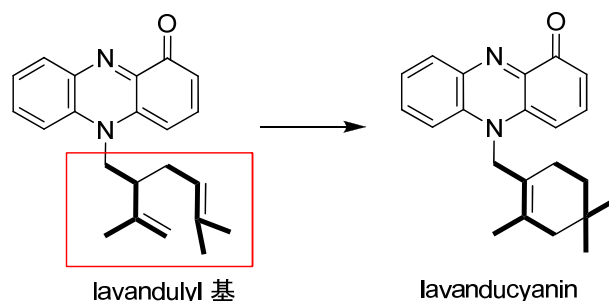


図 2-12 lavandulyl 基



#### 第四節 *nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株の共培養

*nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株にはナフテルピン生合成中間体の蓄積が観察されなかった。しかし、Fur7 の生理的基質の場合と同様、NphB の生理的基質も CL190 株の他の酵素で速やかに変換されてしまっている可能性が考えられた。そこで、*nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株の両破壊株の共培養を行うことで、*nphB* 破壊株で生産される生理的基質が *nphF* 破壊株によって速やかにゲラニル化され、ナフテルピンの生産が回復すると考えた。

#### 実験方法

*nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株をそれぞれ SK-II 培地にて 30 °C、2 日間前培養した。それぞれから 2 ml ずつとり、KG 培地に植菌して 30°C、3 日間本培養した。培養終了後、培養液を上清と菌体に分け、上清は酢酸エチル抽出を行い、酢酸エチルをエバポレート後、残渣をメタノールに溶解して HPLC で分析した。菌体は等量のアセトンを加えて 2 時間抽出し、アセトンを経過後、水層に対して酢酸エチル抽出を行い、酢酸エチルを経過し、残渣をメタノールに溶解して HPLC で分析した。

HPLC 条件: Column: 4.6 × 250 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, methanol; B, water (+0.1% acetate), 1.0 ml/min

40% A for 10min, 40%-100% A over 40min, 100% for 10 min

Detector: Photo Diode array (MD-2010)

## 実験結果

分析結果は図 2-13 のようになり、*nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株を共培養した菌体抽出物には 43.5 min にナフテルピンの生産が観察された。この結果から、*nphB* 破壊株によって生産された NphB の基質が *nphF* 破壊株のもつ NphB によってゲラニル化されることが示唆された。この *nphB* 破壊株によって生産される基質が培養液に蓄積しないことから、この基質となる化合物が内在性の他の修飾酵素によって速やかに別の化合物へ変換されてしまうと考えた。

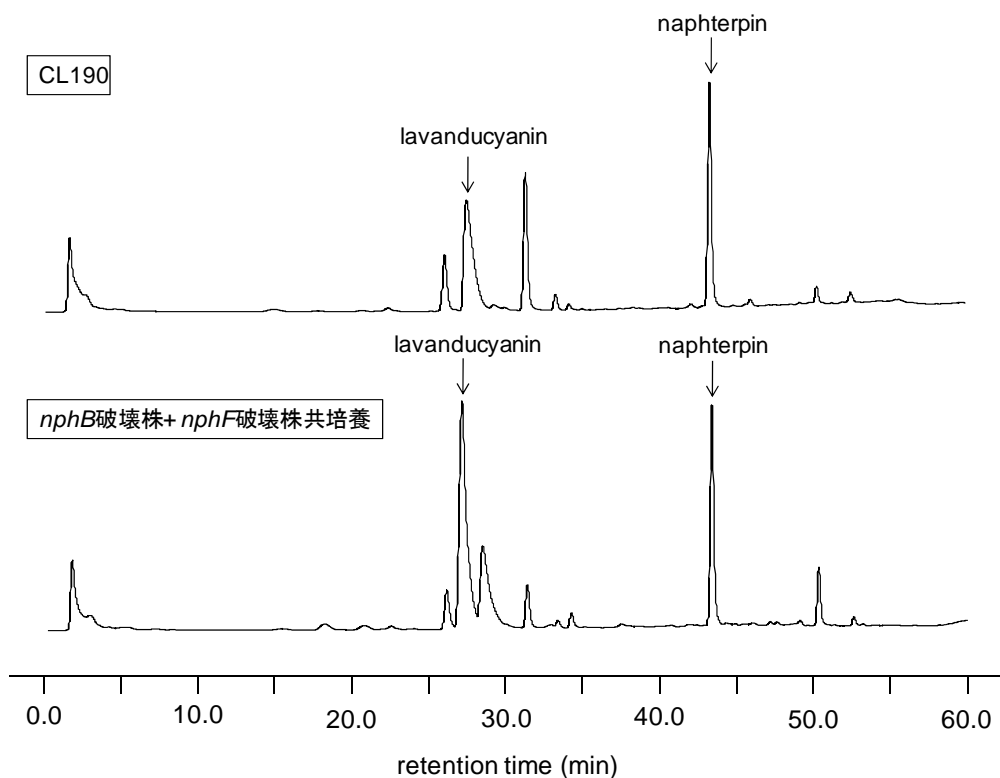


図 2-13 上: CL190 株の培養抽出物の HPLC 分析、

下: *nphB* 破壊株と *nphF* 破壊株共培養抽出物の HPLC 分析

HPLC は実験方法に記した条件で分析し、265 nm のクロマトグラムを示した。27 min にラバンドシアン、43 min にナフテルピンが検出された。したがって *nphB* 破壊株によって生産された NphB の基質が *nphF* 破壊株の NphB によってゲラニル化され、ナフテルピンが合成されることが示唆された。

## 第五節 NphB の発現、精製

以下の実験で用いる NphB の組換えタンパクを発現、精製した。NphB は N 末に *Bam*HI、C 末に *Eco*RI サイトを付加した下記のプライマーで PCR により増幅し、pHis8 ベクターにクローニングした。このプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3)をトランスフォームし、組換えタンパクを得た。タンパク精製に関する実験手順は実験項に記した方法を用いた。酵素精製における各段階のサンプルを SDS-PAGE に供し、精製度を確認した。最終的には目視で 33 kDa に単一のバンドが確認できた。収量は培養液 1 L あたり 150 mg であった。

表 2-2 *nphB* クローニング用プライマー

プライマー名	制限酵素サイト	配列
NphB_N	<i>Bam</i> HI	5'- GGGGGG <u>GATCC</u> TCCGAAGCCGCTGATGTCG-3'
NphB_C	<i>Eco</i> RI	5'- GGGGGG <u>GAATTC</u> TCAGTCCTCCAGCGAGTCG-3'

*nphB* クローニング用プライマーの配列。下線部は制限酵素サイト。

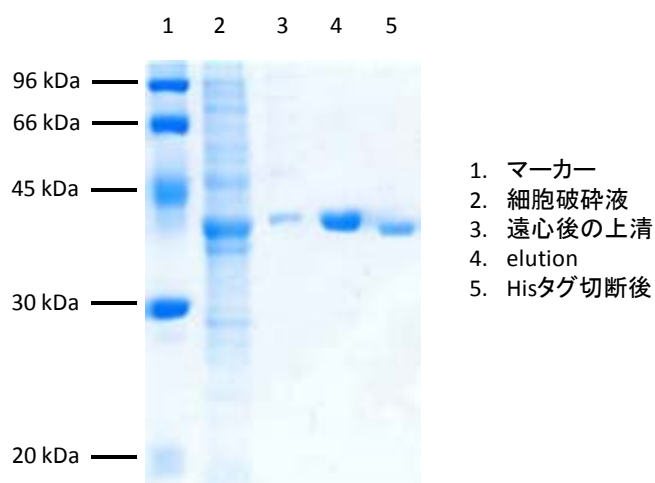


図 2-14 NphB 精製過程の SDS-PAGE

## 第六節 NphB 破壊株培養上清と NphB の反応

NphB の基質が *nphB* 破壊株培養液中に存在することは *nphF* 破壊株との共培養実験で明らかになったので、この基質を単離することを考えたが、おそらくは他の化合物に変換されてしまい蓄積せず、かつ菌体の他の生産物や培地成分との分離が困難であった。そこで組換えタンパク質 NphB を用いて *nphB* 破壊株培養液中に存在すると考えられる NphB の生理的基質のグラニル化を試みた。グラニル化することで疎水性が上昇し、他の菌体成分や培地成分との区別が容易になることを期待した。

### 実験方法

*nphB* 破壊株培養液を上清と菌体に分離し、以下に示す反応溶液を調製し、組換えタンパク質 NphB による生理的基質のグラニル化を試みた。

表 2-3 培養上清のグラニル化反応用液組成

試薬	終濃度
Hepes (pH 7.5)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	0.2 mM
NphB	0.5 mg/ml
培養上清	約 2 L

上記反応溶液を作製し、室温で約 15 時間反応させた。その後、酢酸エチルで抽出し HPLC で分析を行った。

## 結果

反応溶液を酢酸エチル抽出し、HPLC で分析したところ、反応産物と考えられる 3 つの化合物が検出された。それぞれを HPLC で精製し、NMR を測定して構造を決定したところ図 2-17 のようであった。

精製の過程で、nph-P1 は徐々に分子量が 18 小さい nph-P2 へと変化した。このことから nph-P1 は脱水作用を受けて nph-P2 へと変化していると考えられた。

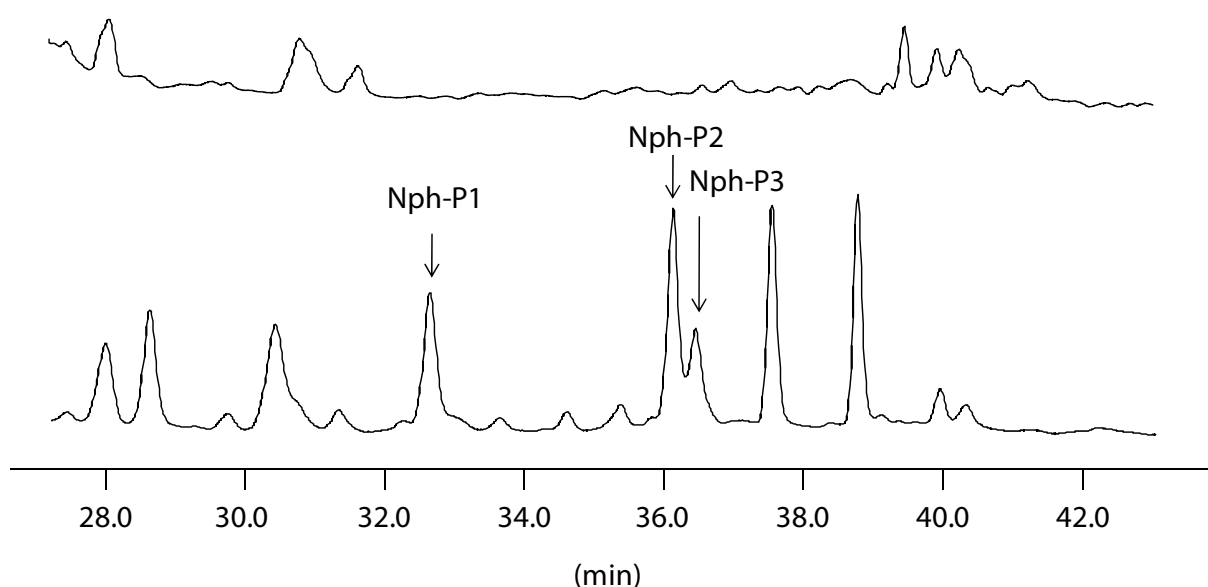


図 2-15 NphB による *nphB* 破壊株培養上清反応抽出物の HPLC 分析

上段:*nphB*破壊株培養上清のNphB反応前の酢酸エチル抽出物。下段:*nphB*破壊株培養上清のNphB反応後の酢酸エチル抽出物。nph-P1, nph-P2, nph-P3の3つのNphB反応産物と考えられるピークを検出した。37.8 minの化合物は7-*O*-geranyl daidzein、38.8 minの化合物は7-*O*-geranyl genisteinでいずれもKG培地に含まれていたsoybeanの成分であるダイゼインとゲニステインが変換されたものである。

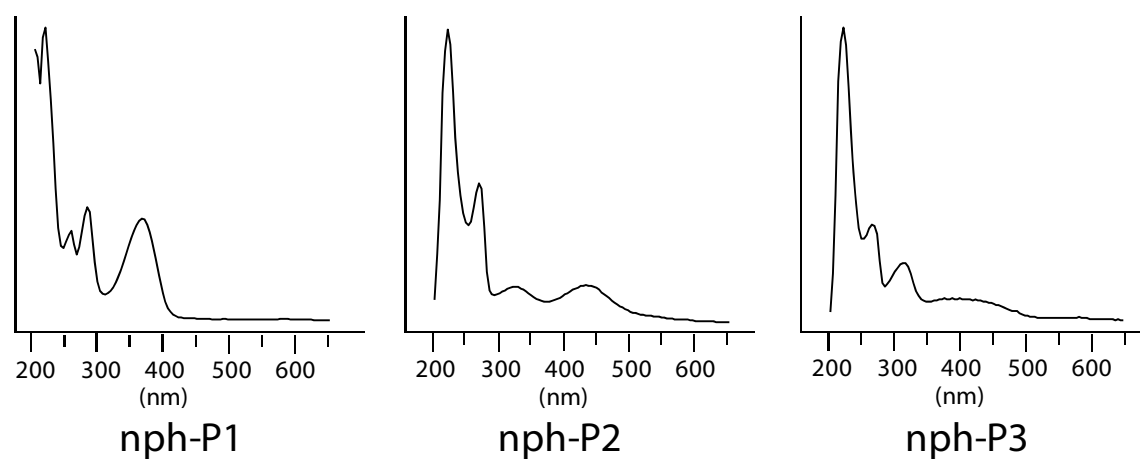


図 2-16 UV spectrums of nph-P1, P2, P3

Nph-P3 はナフトテルピン様の UV スペクトルをもっていたが他の 2 つは異なるスペクトルを示した。

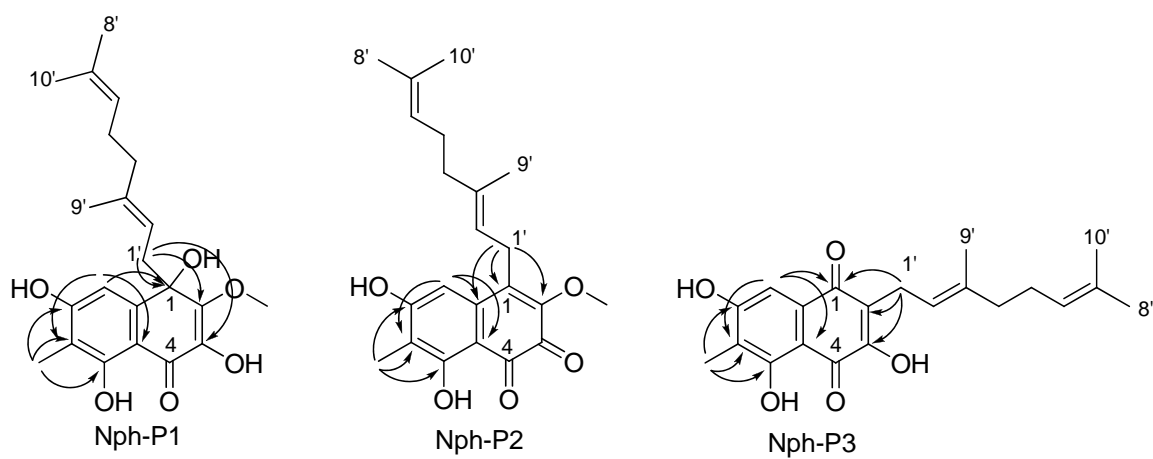


図 2-17 Nph-P1, P2, P3 の構造

それぞれの HMBC によりゲラニル基の位置、環の構造を決定した。

表 2-4 nph-P1 のケミカルシフト (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1		74.3
2		145.0
3		151.3
4		191.6
4a		106.6
5		160.9
6		110.1
6-CH <sub>3</sub>	2.01 (s, 3H)	7.45
7		161.7
8	6.68 (s, 1H)	106.7
8a		117.3
1'	2.4, 2.9 (dd, 2H, $J_H = 7.4, 13.0$ Hz)	35.4
2'	4.45 (t, 1H, $J_H = 7.4$ )	121.6
3'		139.2
4'	2.00 (m, 1H)	39.5
5'	2.06 (m, 1H)	26.5
6'	5.00 (t, 1H, $J_H = 6.2$ )	124.2
7'		131.1
8'	1.57 (s, 3H)	24.6
9'	1.65 (s, 3H)	15.5
10'	1.48 (s, 3H)	17.3

表 2-5   nph-P2 のケミカルシフト (DMSO-*d*6)

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1		134.3
2		153.8
3		174.3
4		189.6
4a		107.5
5		167.0
6		111.8
6-CH3	1.99 (s, 3H)	5.94
7		169.2
8	6.60 (s, 1H)	105.7
8a		141.5
1'	3.36 (d, 1H, $J_H = 6.2$ Hz)	37.6
2'	5.00 (t, 2H, $J_H = 6.2$ )	120.7
3'		137.5
4'	1.99 (m, 1H)	39.7
5'	2.06 (m, 1H)	26.5
6'	5.36 (t, 2H, $J_H = 6.2$ )	123.9
7'		131.4
8'	1.64 (s, 3H)	24.3
9'	1.78 (s, 3H)	15.5
10'	1.52 (s, 3H)	16.6



表 2-6   nph-P3 のケミカルシフト (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

	<sup>1</sup> H	<sup>13</sup> C
1		184.4
2		122.8
3		156.3
4		185.6
4a		106.7
5	12.35 (br, 1H)	162.0
6		115.9
6-CH <sub>3</sub>	2.06 (s, 3H)	7.94
7		163.2
8	6.95 (s, 1H)	106.7
8a		130.3
1'	3.0 (d, 2H, $J_H = 7.6$ Hz)	23.1
2'	4.99 (t, 1H, $J_H = 7.6$ Hz)	120.8
3'		135.7
4'	1.84 (m, 2H)	39.7
5'	1.94 (m, 2H)	26.6
6'	5.06 (t, 1H, $J_H = 6.9$ Hz)	124.1
7'		131.0
8'	1.55 (s, 3H)	24.6
9'	1.75 (s, 3H)	15.0
10'	1.48 (s, 3H)	16.5

## 第七節 naphterpin 生合成中間体候補化合物による *nphB* 破壊株の相補

### 実験方法

*nphB* 破壊株を KG 培地で本培養し、培養 2 日目に培養液 100 ml あたり、0.1 mg の *nph*-P1~P3 をそれぞれ添加し、さらに 24 時間培養した。培養液をアセトン抽出、酢酸エチル抽出したのち HPLC、LC-MS、LC-MS/MS で分析した。

#### HPLC 条件:

Column: 2.0 × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo)  
Solvent: A, methanol; B, water (+0.1% acetate), 0.2 ml/min  
80% for 30 min  
Detector: Photo Diode Array (MD-2010)

#### LC-MS 測定条件

LC 条件: Column: 2.0 × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),  
Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate), 0.2 ml/min  
40%-98% A over 18 min, 98% for 2min, 40% for 10min  
MS 条件: ESI<sup>-</sup>

### 結果

図 2-18 のように、*nph*-P1~P3 を *nphB* 破壊株培養液に添加して 24 時間培養したところ、*nph*-P3 を添加した場合のみナフテルピンと同じ溶出時間に UV スペクトルの一致する化合物が検出できた。一方で *nph*-P1 と *nph*-P2 ではナフテルピンは検出できなかった。

また、添加直後のクロマトグラムと比較すると *nph*-P3 が消費されていることがわかる (図 2-19)。

また、LC-MS での分析では *nph*-P3 を添加した場合のみナフテルピンと同じ溶出時間に分子量の一致する化合物が見られたが、ほかにも同じ分子量の複数の化合物が生成していた (図 2-20)。これらの化合物を溶出時間の早い順に A, B, C, D としてそれぞれの MS/MS フラグメントパターンを比較すると化合物 B がナフテルピンのフラグメントパターンと一致した (図 2-21, 図 2-22)。このことから、化合物 B をナフテルピンと同定した。*nph*-P3 を添加した場合ナフテルピンが生産されていることが証明できたので、*nph*-P3 がナフテルピン生合成中間体であることが示唆された。

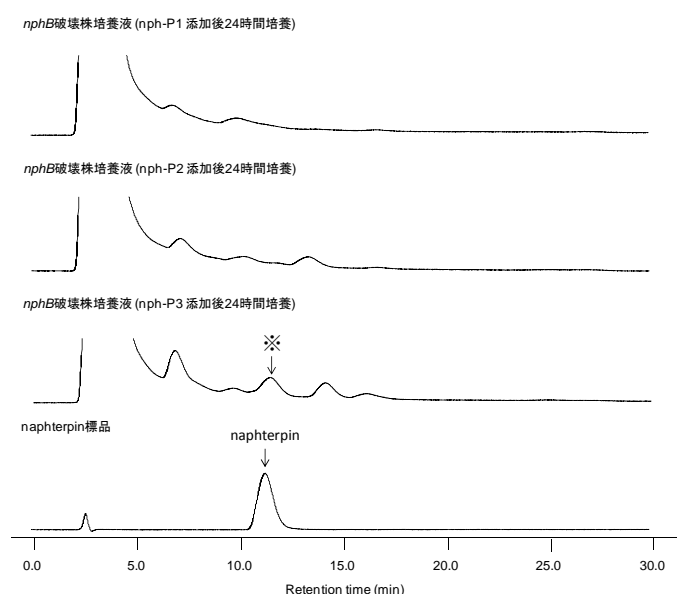


図 2-18 *nph*-P1, P2, P3 添加 *nphB* 破壊株培養液抽出物の HPLC 分析

*nph*P1~*nph*P3 を *nphB* 破壊株培養液に本培養 2 日目に添加し、さらに 24 時間培養後、抽出操作を行い HPLC で分析した。ここでは 265 nm のクロマトグラムを示した。*nph*-P3 を添加した場合はナフテルピンと溶出時間の一致するピーク (\*) が観察されたが *nph*-P1, *nph*-P2 では検出できなかった。

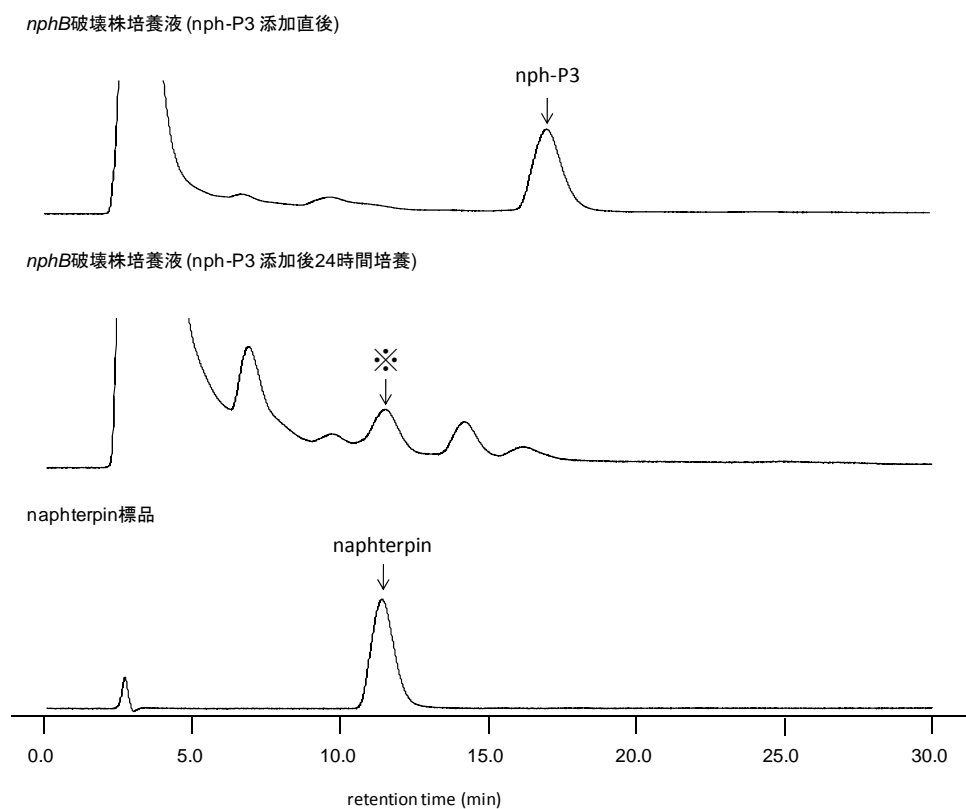


図 2-19 nph-P3 相補実験 (HPLC)

HPLC 条件は実験方法に記した通りでここでは 265 nm のクロマトグラムを示した。nph-P3 を *nphB* 破壊株に添加後 24 時間培養したのち抽出すると nph-P3 が減少し、ナフテルピンと溶出時間の一致するピーク (\*) が認められた。

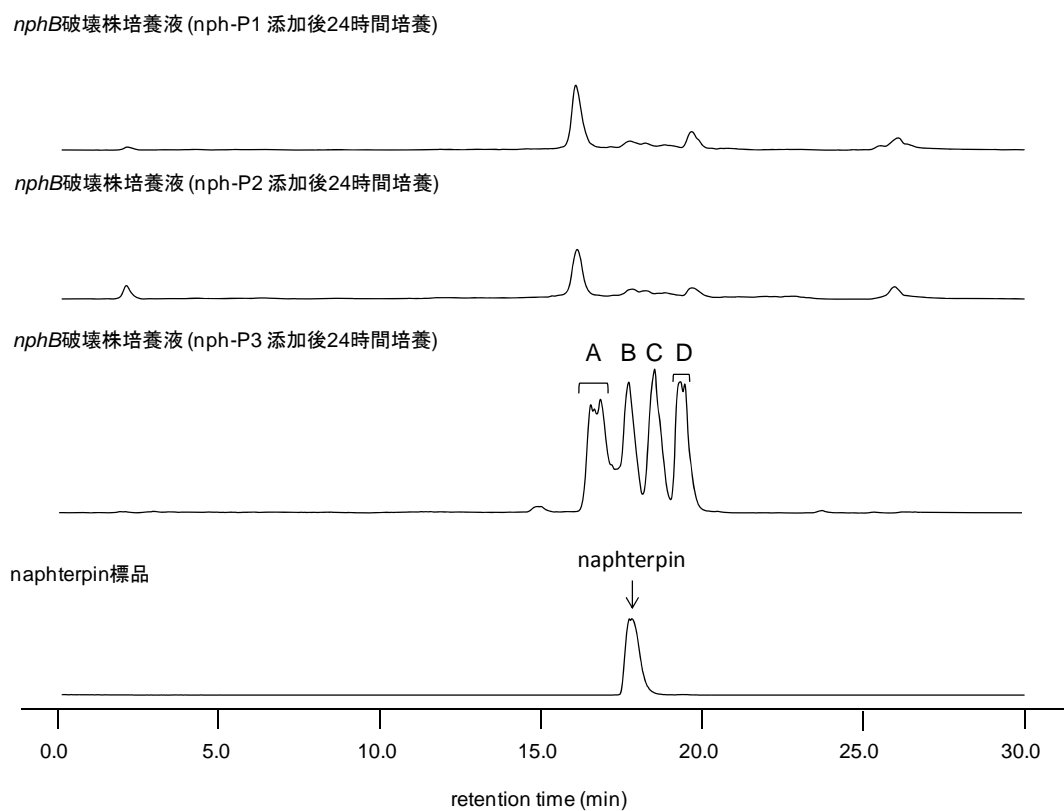


図 2-20 d2-8 相補実験 (LC-MS)

$m/z=353.0-353.5$  のマスキロマトグラムを示した。*nph*-P3 を添加した場合のみナフテルピンと一致するピークが検出されたが、同時に同じ分子量の4つの化合物が検出された。

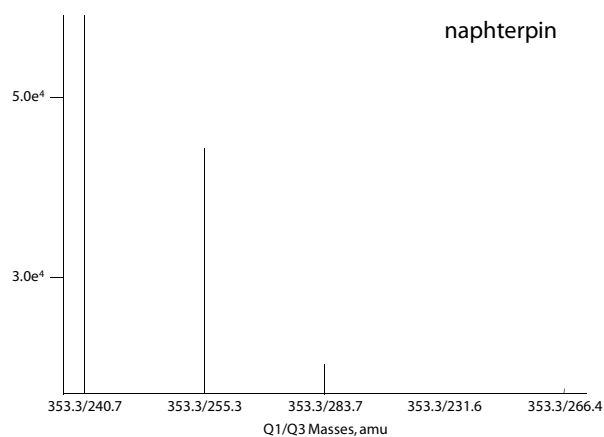


図 2-21 naphterpin の MS/MS

ナフテルピンの MS/MS フラグメントパターン。X 軸にはそれぞれの親イオン/子イオンを示した。

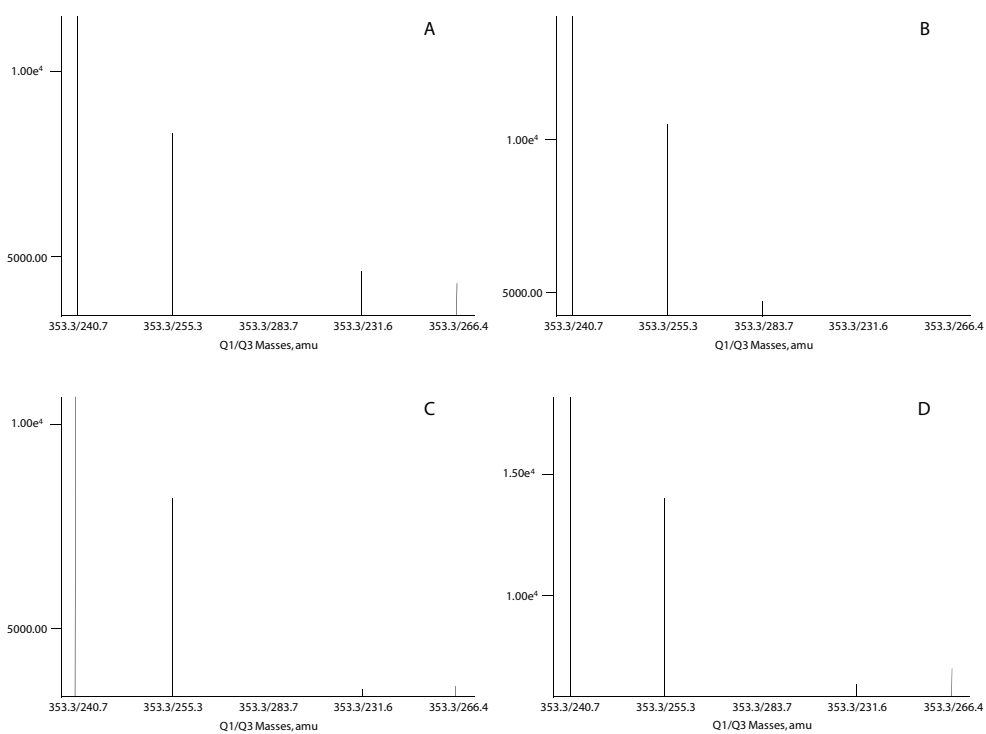


図 2-22 化合物 A-D の MS/MS

化合物 A～D の MS/MS フラグメントパターンを示した。ナフテルピンと溶出時間が一致した化合物 B は MS/MS フラグメントパターンも一致しナフテルピンであることが確認された。X 軸にはそれぞれの親イオン/子イオンの  $m/z$  を示した。

## 第八節 考察

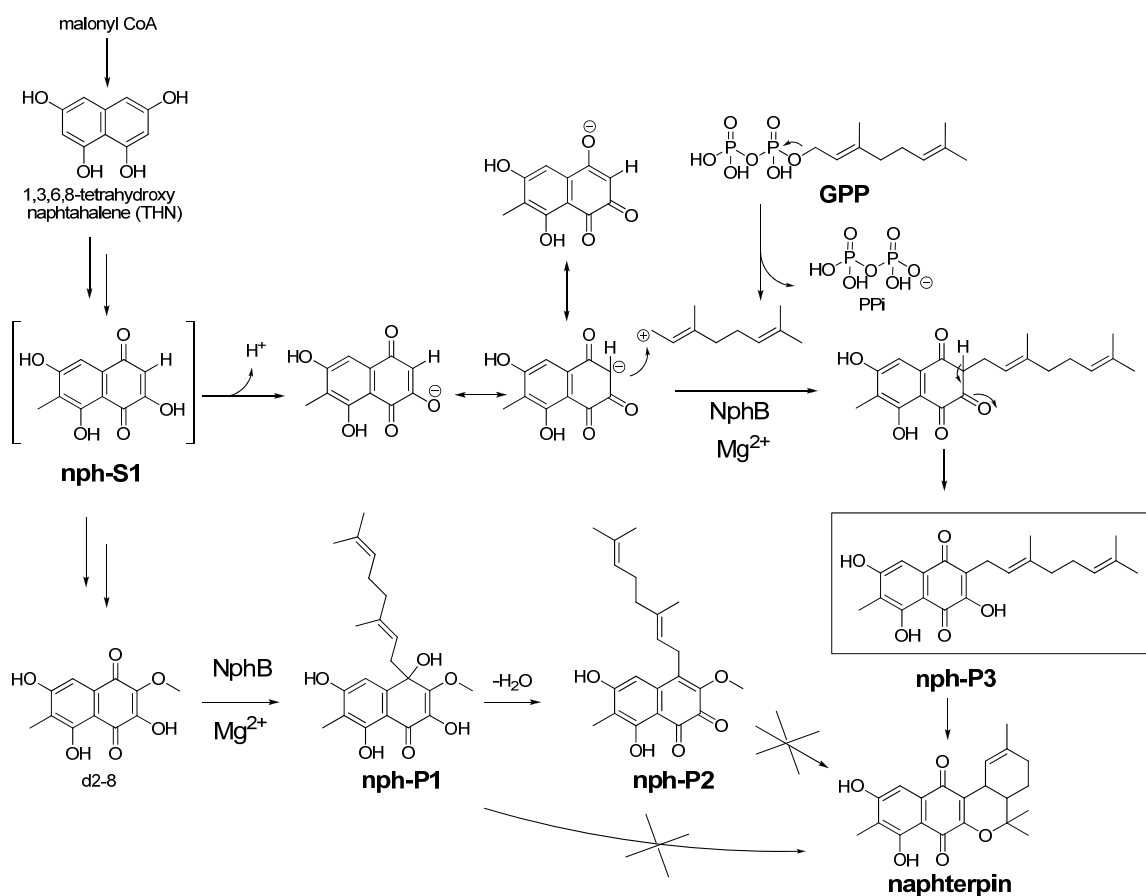


図 2-23 Naphterpin 生合成における NphB 反応予想図

今回、NphB の基質の同定には至らなかったが、ナフテルピンへと変換される生合成中間体、nph-P3 を単離することができた。nph-P3 は万有製薬によって *Streptomyces* sp. A69785 から BE69785A として単離され抗腫瘍剤として特許出願されている (特開平 11-349522)。nph-P3 の構造から、NphB の生理的基質の構造について nph-S1 のように推定した。nph-S1 は溶液中でプロトンが解離し、1 位と 3 位の間で共鳴構造をとると考えられる。そこへゲラニルカチオンが 2 位のアニオンと求電子反応することによって nph-P3 が生じる。

このような反応機構はフラノナフトキノン合成酵素 Fnq26 がフラビオリンと反応する際の反応機構として提唱されている[43]。Fnq26の場合は基質がフラビオリンであるので2位の水酸基のプロトンがpH 8.5において解離し、4位のカルボニルとの間で共鳴構造をとる。そして3位にアニオンが生じた際にプレニルカチオンが反応するとされている。

また、nph-P1とnph-P2の構造からNphBが、d2-8の1位のカルボニルと反応していることが示唆された。ただし、d2-8は反応後の溶液に大量に蓄積しており、仮にd2-8が基質となっていた場合、その反応効率は0.01%程度であると考えられる。さらに、nph-P1とnph-P2はnphB破壊株に与えてもナフテルピンが検出出来なかったことから生合成中間体ではないことが判明した。

nph-P3は *trans* のゲラニル基が付加しており、ナフテルピンの構造中のゲラニル基に由来する部分の立体は *cis* であることから、環化の前、もしくは環化と同時に立体の異性化が必要があると考えられる。しかし相同性検索では、まだそのような環化や、異性化を触媒する遺伝子は見つかっていない。今回得られた nph-P3 を用いることで、環化酵素などの活性を *in vitro* で検討していくことが今後の課題である。



### 第3章 放線菌由来プレニルトランスフェラーゼを用いた プレニル化化合物合成

一般に、二次代謝酵素は基質特異性が比較的寛容である。そこで本章では新規芳香族基質プレニル基転移酵素にも広範な基質特異性があると考え、それを利用し、天然には微量にしか存在しないプレニル化フラボノイドや、非天然型のプレニル化化合物の合成を目指した。プレニル化に利用した芳香族基質プレニル基転移酵素は NphB、Fur7 に加え、NphB と 25% のアミノ酸相同性を示す *Streptomyces coelicolor* A3(2) 由来の機能未知遺伝子 *SCO7190* を用いた。

## 実験方法

### (1) プレニル化反応

NphB, Fur7, SCO7190 によるゲラニル化反応は以下のような反応液組成で行った。

表 3-1 プレニル化化合物合成反応溶液の組成

試薬	終濃度
Tris-HCl (pH 9.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	5 mM
Aromatic substrate	5 mM
Prenyltransferase (NphB または Fur7 または SCO7190)	1 mg/ml
milliQ water	
total	10 ml

上記反応溶液を作製し、室温で約 15 時間反応させた。その後、酢酸エチルで抽出し TLC、HPLC で分析、精製を行った。精製した反応産物は NMR、MS を用いて構造決定を行った。プレニル化を検討した化合物は (図 3-1) の通りである。Dihydroxynaphthalene (DHN) 類や同じくフェノール性水酸基をもつフラボノイド(4, 5, 6, 7)、植物由来ポリケタイド(8, 9)を選んだ。

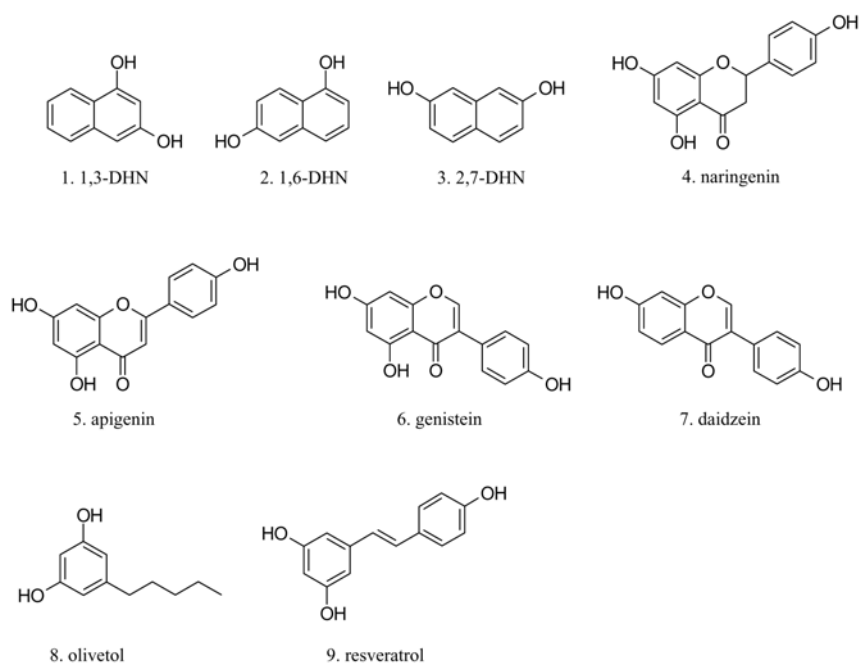


図 3-1 本章で基質に用いた化合物

## 第一節 NphB によるプレニル化化合物合成

### 第一項 NphB によるゲラニル化反応

NphB と dihydroxynaphthalene (DHN)、フラボノイド、植物ポリケタイドについて反応を行った。反応溶液組成は表 3-1 に記した。反応は室温で 15 時間行い反応溶液を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチルをエバポレートしたのちメタノールに溶解して HPLC で分析、分取をおこなった。精製した化合物を NMR、HR-MS により構造を決定した。反応産物の構造は (図 3-11, 図 3-12, 図 3-13) に、NMR ケミカルシフト、HR-MS の測定結果は実験項に記した。

下に一例として 1,6-DHN との反応溶液抽出物の HPLC 分析結果を示す。

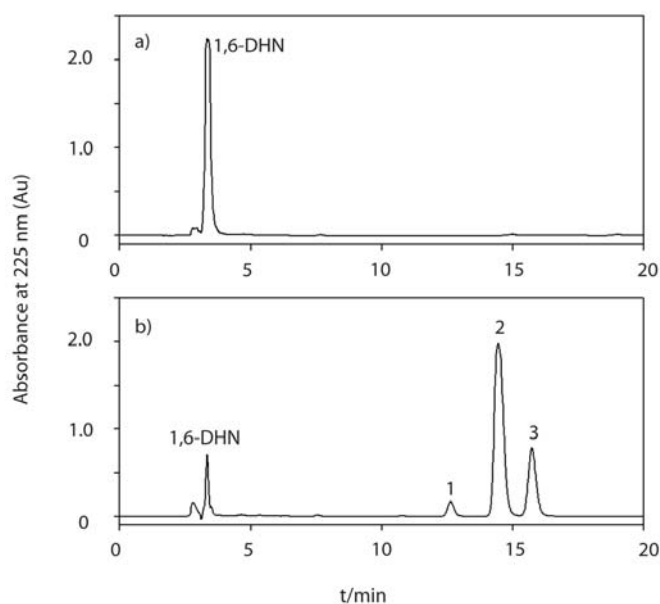


図 3-2 NphB と 1,6-DHN の反応後の酢酸エチル抽出物の分析

a) no NphB, b) add NphB. NphB によって 3 つの反応産物が検出された。それぞれを構造決定すると **1**: 4-geranyl-1,6-DHN, **2**: 5-geranyl-1,6-DHN, **3**: 2-geranyl-1,6-DHN であった。

## 第二項 NphB による芳香族化合物の変換率

NphB の基質のプレニル化化合物への変換率を求めた。これは実際のプレニル化化合物の生産という観点から重要な知見になると考えられる。

### 実験方法

以下の反応組成液を作製し、25°C で反応を行った。NphB の添加により反応を開始し、1, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 36 時間後に 100  $\mu$ l ずつ 200  $\mu$ l の酢酸エチルで抽出し、酢酸エチルを真空ポンプで除去し、残渣をメタノールに溶解して HPLC で分析した。クロマトグラムのピーク面積から反応産物を定量し、各時間での基質の変換率を求めた。

表 3-2 変換率実験反応溶液組成

試薬	終濃度
Tris-HCl (pH 9.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	5 mM
Aromatic substrate	0.5 mM
NphB	0.5 mg/ml
milliQ water	
total	1.0 ml

## 結果

ナリンゲニン、アピゲニン、ゲニステインは20時間後にはほぼ90%プレニル化された。また、ダイゼイン、オリベトールについても36時間までプレニル化反応が持続しており酵素活性は失われていないことが示された。したがって NphB はそれらの基質に対する反応性は高くないものの、安定であり、長時間反応することでプレニル化化合物の生産は可能であると考えられる。

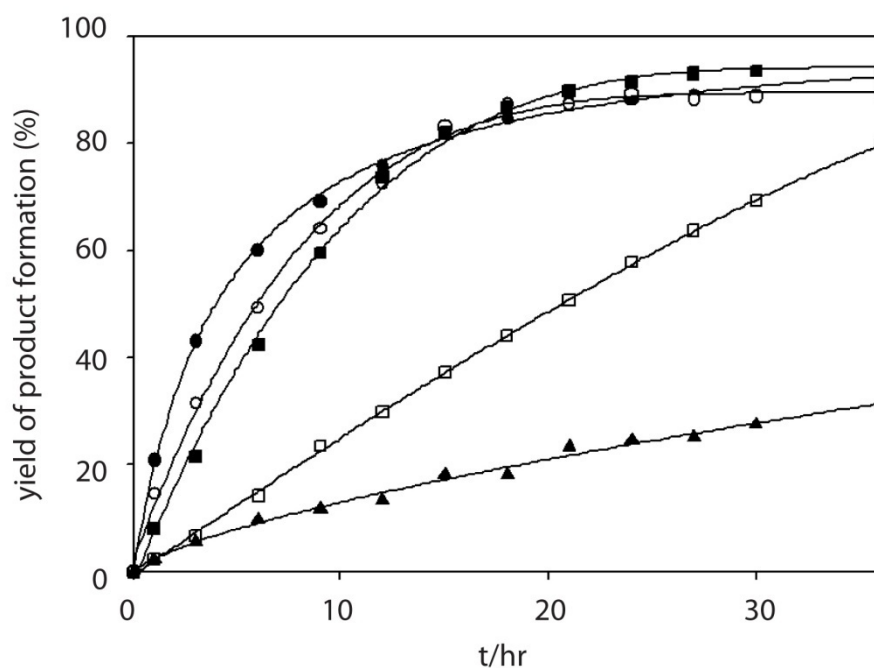


図 3-3 NphB による基質の変換率

naringenin (●), apigenin (○), genistein (■), daidzein (□), olivetol (▲)はそれぞれの基質  
(0.5 mM)に対する変換率

### 第三項 kinetic parameter の算出

NphB についてはゲラニル化反応の各芳香族基質に対する kinetic parameter を求めた。また、活性測定の結果からプレニル化反応の反応機序についても決定した。反応液組成は以下の通りである。

表 3-3 活性測定反応溶液組成

試薬	終濃度
Tris-HCl (pH 9.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM
GPP	2.5 mM
Aromatic substrate	*
NphB	0.5 mg/ml
milliQ water	
total	1.0 ml

\*: 1,6-DHN, 1,3-DHN, 2,7-DHN は 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mM

naringenin, apigenin, olivetol は 0.5, 1.25, 2.5, 5.0 mM

genistein は 0.3, 0.5, 1.0, 2.5 mM

daidzein は 0.15, 0.25, 0.3, 0.5 mM

resveratrol は 0.15, 0.3, 0.5, 1.0 mM

上記反応溶液をエッペン (1.5 ml) に作製し、25°C で NphB の添加により反応を開始させた。DHN に関しては酵素添加後 3, 6, 9, 15 分後、それ以外の基質は 10, 20, 30, 40 分後に、それぞれ 200  $\mu$ l とり、200  $\mu$ l の酢酸エチルを入れた別のエッペンに注ぎ、反応を止めると同時に抽出を行った。酢酸エチルを真空ポンプで除去し、60  $\mu$ l のメタノールに溶かして HPLC に 5  $\mu$ l を流した。HPLC の条件は以下の通りである。

## HPLC 条件

column: PEGASIL ODS 2 mm×150 mm,

solvent: methanol (isocratic), 0.2 ml/min

detector: Photo Diode Array (MD2010, JASCO)

HPLC で測定して得られたクロマトグラフから反応産物のピーク面積を求めて定量し、反応速度を算出して Sigma Plot 10.0 によって kinetic parameter を算出した。

ナリンゲニンを基質に反応した場合 6-geranyl naringenin と 7-*O*-geranyl naringenin が生成する。それぞれについてピーク面積から定量し反応速度を求めると下表のようになった。このデータをもとに Sigma Plot 10.0 で  $K_m$ ,  $k_{cat}$  を求めたところ。6-geranyl naringenin の生成反応に対しては  $K_m=2.1\pm0.5$  (mM)、 $k_{cat}=0.67\pm0.08$  ( $s^{-1}\times10^3$ )、7-*O*-geranyl naringenin の生成反応に対しては  $K_m=1.6\pm0.2$  (mM)、 $k_{cat}=2.3\pm0.1$  ( $s^{-1}\times10^3$ )と算出された。

表 3-4 NphB ナリンゲニン反応の反応速度

naringenin	6-geranyl naringenin 生成速度 V ( $\mu$ M/min)	7- <i>O</i> -geranyl naringenin 生成速度 V ( $\mu$ M/min)
5 mM	0.365	1.45
2.5 mM	0.284	1.12
1.25 mM	0.186	0.783
0.5 mM	0.106	0.447



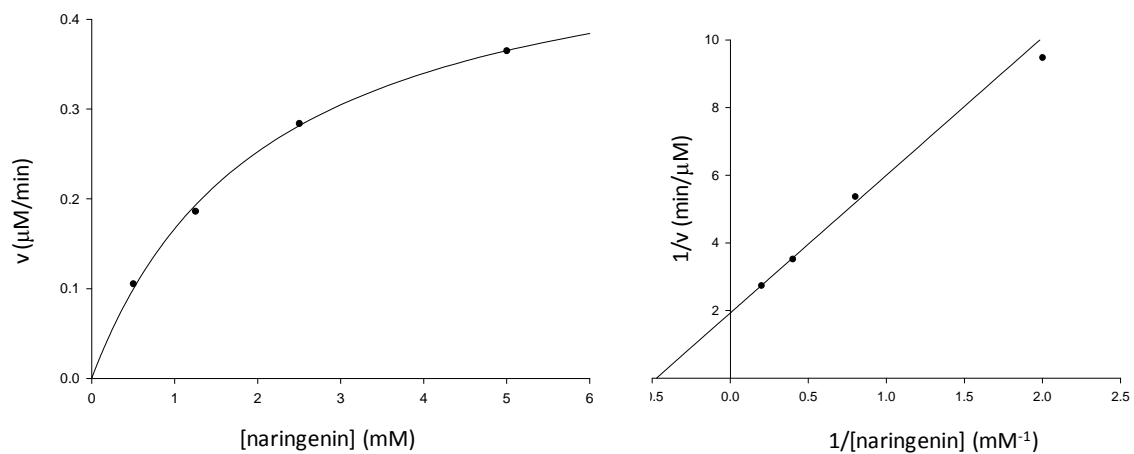


図 3-4 ナリンゲニンに対する活性測定 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk Plot)

6-geranyl naringenin が生成するときナリンゲニンに対し  $K_m=2.1\pm0.5$  (mM)、 $k_{cat}=0.67\pm0.08$  ( $\text{s}^{-1}\times10^3$ ) と算出された。

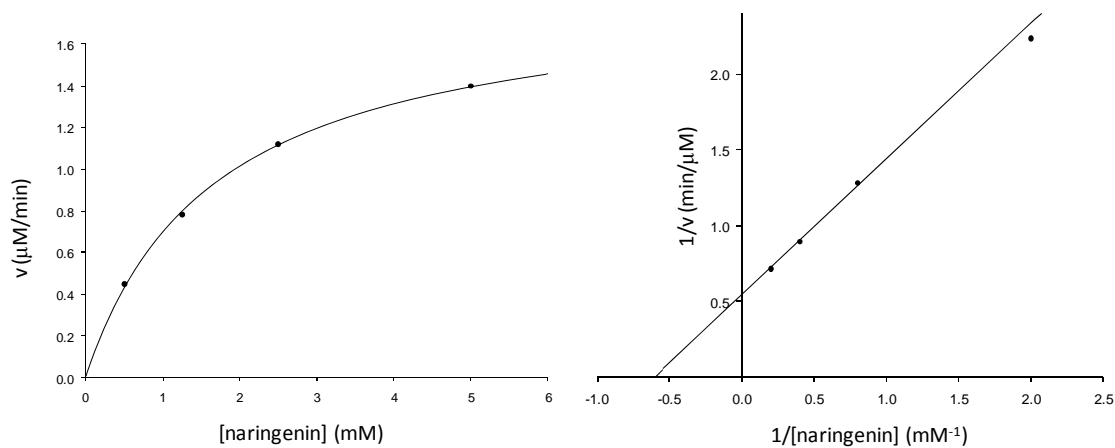


図 3-5 ナリンゲニンに対する活性測定 (Michaelis-Menten kinetic, Lineweaver-Burk Plot)

7-*O*-geranyl naringenin が生成するときナリンゲニンに対し  $K_m=1.6\pm0.2$  (mM)、 $k_{cat}=2.3\pm0.1$  ( $\text{s}^{-1}\times10^3$ ) と算出された。

また、NphB の反応機構明らかにするために naringenin, GPP 双方の濃度を変化させて活性測定を行いそれぞれの基質について Lineweaver-Burk Plot を重ねた。

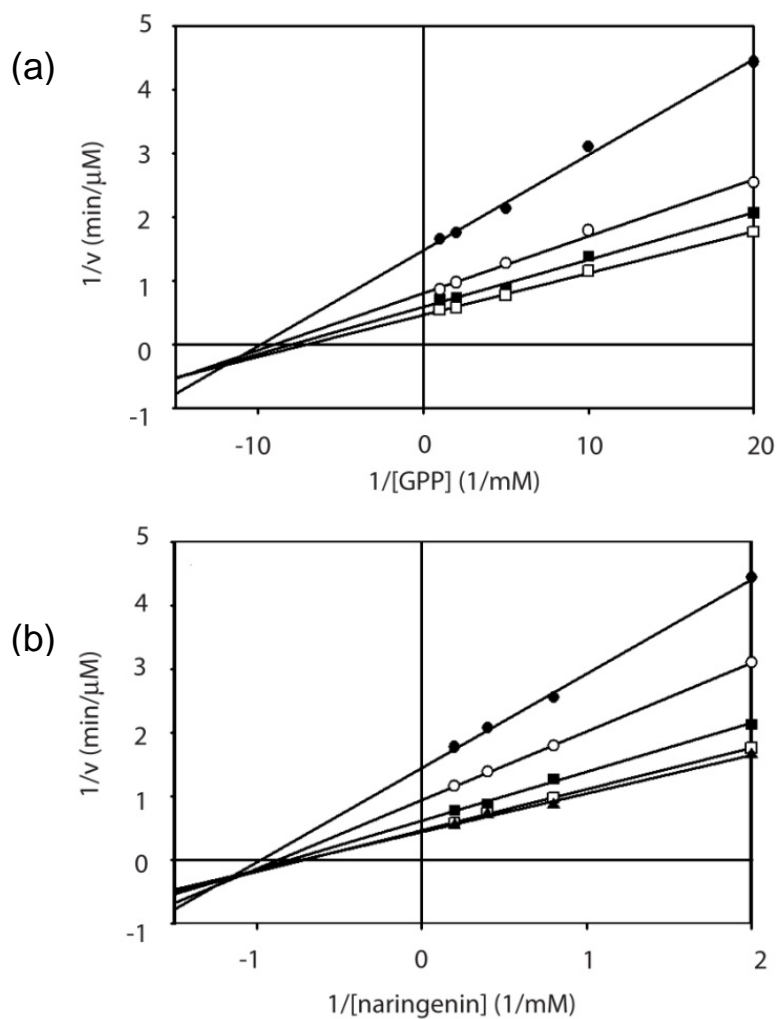


図 3-6 NphB, GPP に対する Double-reciprocal plots

(a) naringenin 0.5 mM (●), 1.25 mM (○), 2.5 mM (■), 5.0 mM (□) での活性測定を GPP 濃度 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mM について行い、それぞれの Lineweaver-Burk Plot を重ねた。(b) GPP 0.05 mM (●), 0.1 mM (○), 0.2 mM (■), 0.5 mM (□), 1.0 mM (▲) での活性測定を naringenin 濃度 0.5, 1.25, 2.5, 5.0 mM について行い、それぞれの Lineweaver-Burk Plot を重ねた。

それぞれの直線が平行ならばピンポンバイバイ機構、交われれば定序機構である。この結果から NphB の反応機構を定序機構 (Ordered mechanism) と結論付けた。先行基質については NphB と芳香族基質単独との共結晶は得られていないが、GPP 単独、GSPP と芳香族基質の二基質との共結晶は得られているので[47]、GPP が芳香族基質より先に結合する必要があると考えられ、先行基質であると考えている。

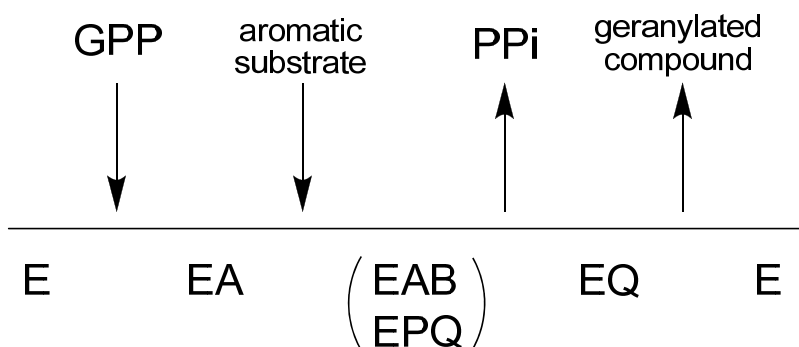


図 3-7 NphB の反応機構

GPPを先行基質とする定序機構と考えた

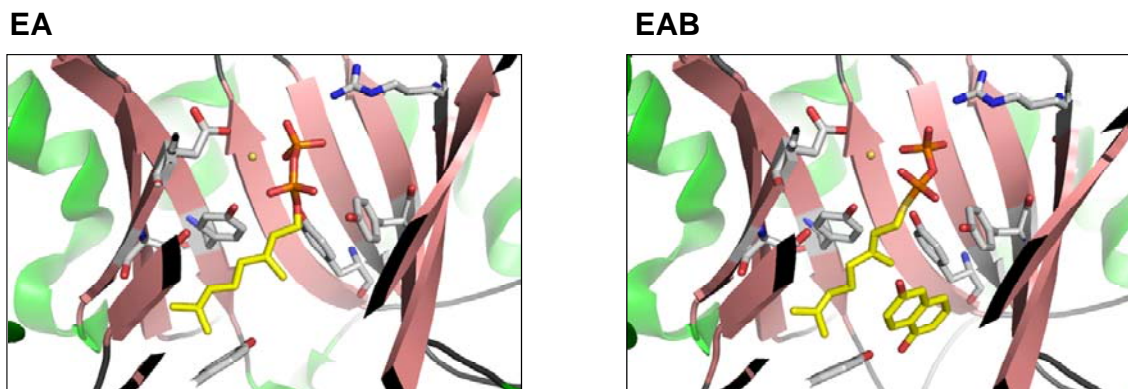


図 3-8 NphBとGPPの共結晶構造 (左)、NphBとGSPP、1,6-DHNの共結晶構造 (右)

1,6-DHN 単体との共結晶構造は得られていないが GPP のみ、GSPP と 1,6-DHN の共結晶構造が得られているので GPP が先行基質であると考えた。

## 第二節 Fur7 によるプレニル化化合物合成

Fur7と dihydroxynaphthalene (DHN)、フラボノイド、植物ポリケタイドについて NphB と同様に反応を行った。反応溶液組成は表 3-1 に記した。反応は室温で 15 時間行い反応溶液を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチルをエバポレートしたのちメタノールに溶解して HPLC で分析、分取をおこなった。精製した化合物を NMR、HR-MS により構造を決定した。反応産物の構造は (図 3-11, 図 3-12, 図 3-13) に、NMR ケミカルシフト、HR-MS の測定結果は実験項に記した。

一例として 1,3-DHN との反応の HPLC 分析の結果を記す

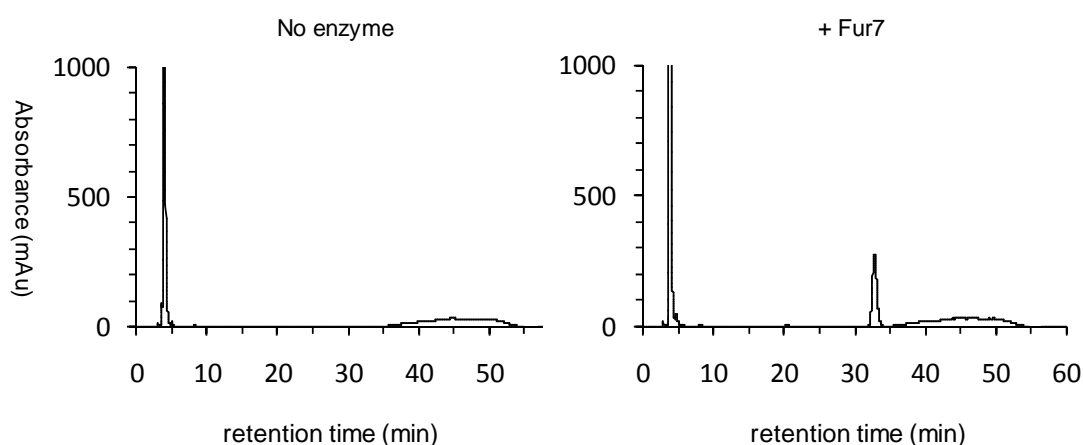


図 3-9 Fur7 と 1,3-DHN の反応産物の HPLC 分析

Fur7と 1,3-DHNを反応させると 33 分に反応産物と考えられるピークが検出された。HPLC の条件は下記の通りで、ここでは 231 nm のクロマトグラムを示した。このピークを分取し、NMR により構造決定すると 1-*O*-geranyl 1,3-DHN であった。

HPLC 条件 Column: PEGASIL ODS 4.6 mm×250 mm,

Solvent: A, methanol; B, water, 1.0 ml/min

80 % A for 30min, 80-100% A over 10 min, 100% A for 5 min

Detector: Photo Diode Array (MD2010, JASCO)

### 第三節 SCO7190 によるプレニル化化合物合成

SCO7190 と dihydroxy naphthalene (DHN)、フラボノイド、植物ポリケタイドについて NphB と同様に反応を行った。反応溶液組成は表 3-1 に記した。反応は室温で 15 時間行い反応溶液を酢酸エチルで抽出した。酢酸エチルをエバポレートしたのちメタノールに溶解して HPLC で分析、分取をおこなった。精製した化合物を NMR、HR-MS により構造を決定した。反応産物の構造は (図 3-11, 図 3-12, 図 3-13) に、NMR、HR-MS の測定結果は実験項に記した。

一例として 1,6-DHN との反応の HPLC 分析の結果を記す

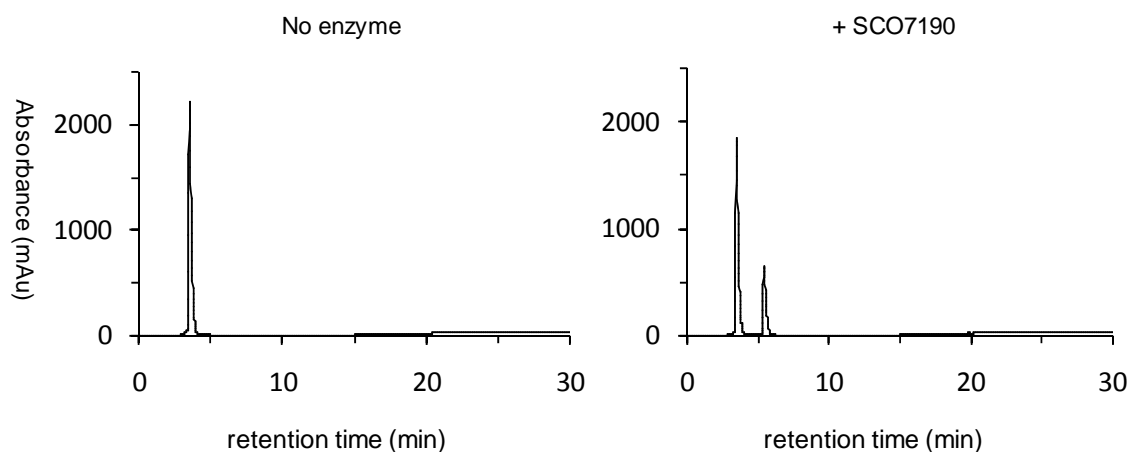


図 3-10 SCO7190 と 1,6-DHN の反応産物の HPLC 分析

SCO7190 と 1,6-DHN を反応させると 6 分に反応産物と考えられるピークが検出された。HPLC の条件は下記の通りで、ここでは 227 nm のクロマトグラムを示した。このピークを分取し、NMR により構造決定すると 5-dimethylallyl 1,6-DHN であった。

HPLC 条件 Column: PEGASIL ODS 4.6 mm×250 mm,

Solvent: A, methanol; B, water, 1.0 ml/min

80 % A for 30min, 80-100% A over 10 min, 100% A for 5 min

Detector: Photo Diode Array (MD2010, JASCO)

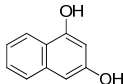
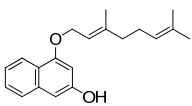
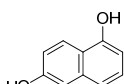
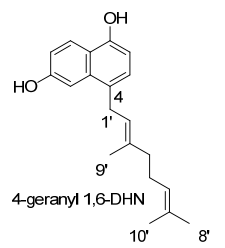
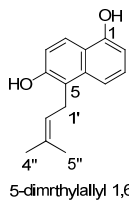
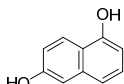
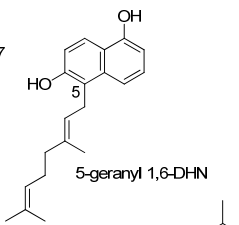
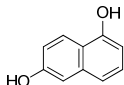
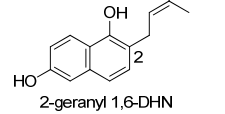
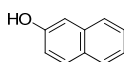
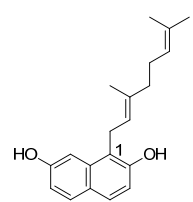
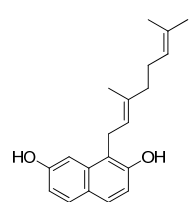
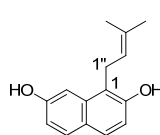
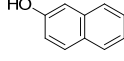
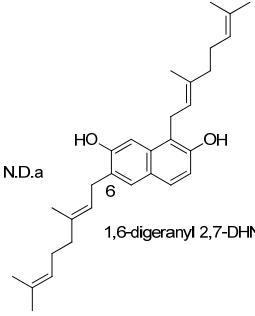
Substrate	NphB		Fur7	SCO7190	
	$K_m$ (mM)	Product	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> ) x10 <sup>3</sup>		
			$k_{cat} / K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )		
 1,3-DHN		no products		 1-O-geranyl 1,3-DHN	no products
 1,6-DHN	1.05 ± 0.17	 4-geranyl 1,6-DHN	0.32 ± 0.02 0.30	no products	 5-dimrthylallyl 1,6-DHN
 1,6-DHN	0.54 ± 0.07	 5-geranyl 1,6-DHN	4.2 ± 0.2 7.7	no products	no products
 1,6-DHN	0.51 ± 0.08	 2-geranyl 1,6-DHN	1.1 ± 0.1 2.2	no products	no products
 2,7-DHN	0.34 ± 0.06	 1-geranyl 2,7-DHN	0.47 ± 0.01 1.4	 1-geranyl 2,7-DHN	 1-dimrthylallyl 2,7-DHN
 2,7-DHN	N.D.a	 1,6-digeranyl 2,7-DHN	N.D.a	no products	no products

図 3-11 NphB、Fur7、SCO7190 と DHNs の反応産物

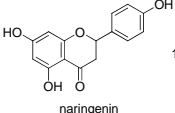
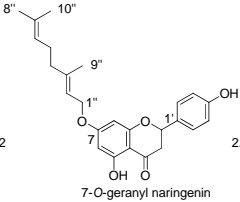
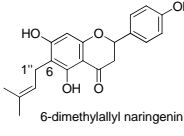
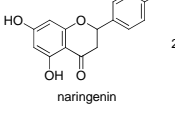
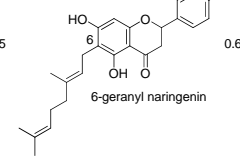
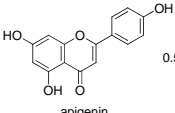
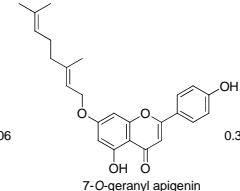
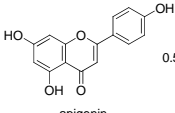
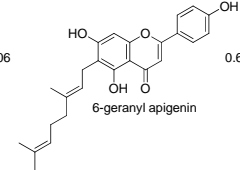
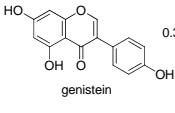
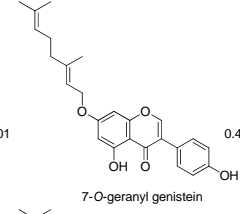
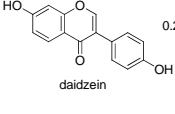
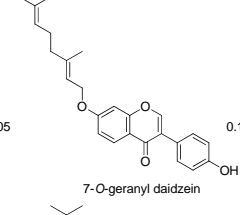
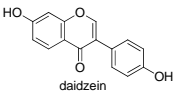
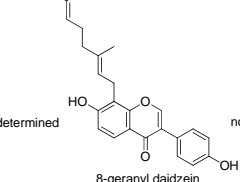
Substrate	NphB		Fur7	SCO7190
	$K_m$ (mM)	Product	$\frac{k_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)} \times 10^3}{k_{cat} / K_m \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}}$	
 naringenin $1.6 \pm 0.2$		 7-O-geranyl naringenin $2.3 \pm 0.1$ 1.4	no products	 6-dimethylallyl naringenin
 naringenin $2.1 \pm 0.5$		 6-geranyl naringenin $0.67 \pm 0.08$ 0.31	no products	no products
 apigenin $0.58 \pm 0.06$		 7-O-geranyl apigenin $0.33 \pm 0.01$ 0.57	no products	no products
 apigenin $0.53 \pm 0.06$		 6-geranyl apigenin $0.60 \pm 0.03$ 1.1	no products	no products
 genistein $0.33 \pm 0.01$		 7-O-geranyl genistein $0.48 \pm 0.01$ 1.5	no products	no products
 daidzein $0.29 \pm 0.05$		 7-O-geranyl daidzein $0.17 \pm 0.01$ 0.59	no products	no products
 daidzein not determined		 8-geranyl daidzein not determined	no products	no products

図 3-12 NphB、Fur7、SCO7190 とフラボノイドの反応産物

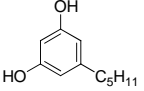
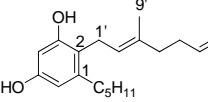
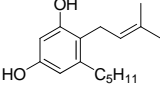
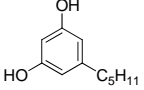
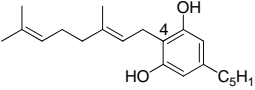
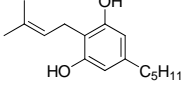
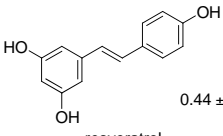
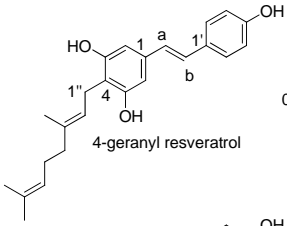
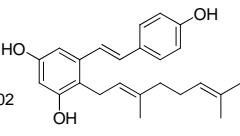
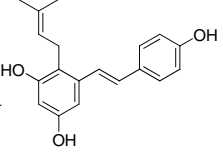
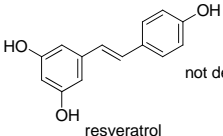
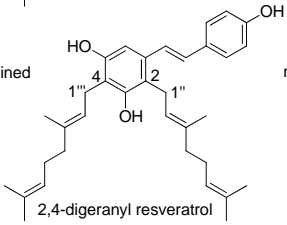
Substrate	NphB		Fur7	SCO7190
$K_m$ (mM)	Product	$\frac{k_{cat} (s^{-1}) \times 10^3}{k_{cat} / K_m (M^{-1}s^{-1})}$		
 olivetol	 2-geranyl olivetol	$0.64 \pm 0.16$ $0.043 \pm 0.003$ $0.067$	no products	 2-dimethylallyl olivetol
 olivetol	 4-geranyl olivetol	$0.52 \pm 0.03$ $0.027 \pm 0.001$ $0.052$	no products	 4-dimethylallyl olivetol
 resveratrol	 4-geranyl resveratrol	$0.44 \pm 0.06$ $0.053 \pm 0.002$ $0.12$	 2-geranyl resveratrol	 2-dimethylallyl resveratrol
 resveratrol	 2,4-digeranyl resveratrol	not determined	no products	no products

図 3-13 NphB、Fur7、SCO7190 と植物ポリケタイドの反応産物



#### 第四節 プレニル化化合物の抗菌活性

序論でも述べたとおりプレニル化化合物は多様な生物活性を示し、抗菌活性を持っているものも知られている[23]。また、ナリングeninはプレニル化されることで抗菌活性を獲得することが知られている[28]。そこで前節で組換えタンパク質 NphB、Fur7、Sco7190 を用いて得られたプレニル化化合物について *Staphylococcus aureus* に対する抗菌活性を測定した。

#### 実験方法

グリセロールストックで保存された *Staphylococcus aureus* をブイオン寒天培地で 37 °C、24 時間前培養した。各プレニル化化合物は DMSO に溶かし、96 穴プレートに分注した。次に、化合物を分注した上からブイオン寒天培地を 100  $\mu$ l ずつ注ぎ、静かに攪拌した。培地が固まった後、前培した *Staphylococcus aureus* を白金耳で植菌して 37°C で 24 時間培養した。

## 実験結果

プレートに生育が確認できなくなる濃度をその化合物の生育阻害濃度（MIC）とした。結果は以下のとおりである。それぞれの MIC を求め表 3-5 に示した

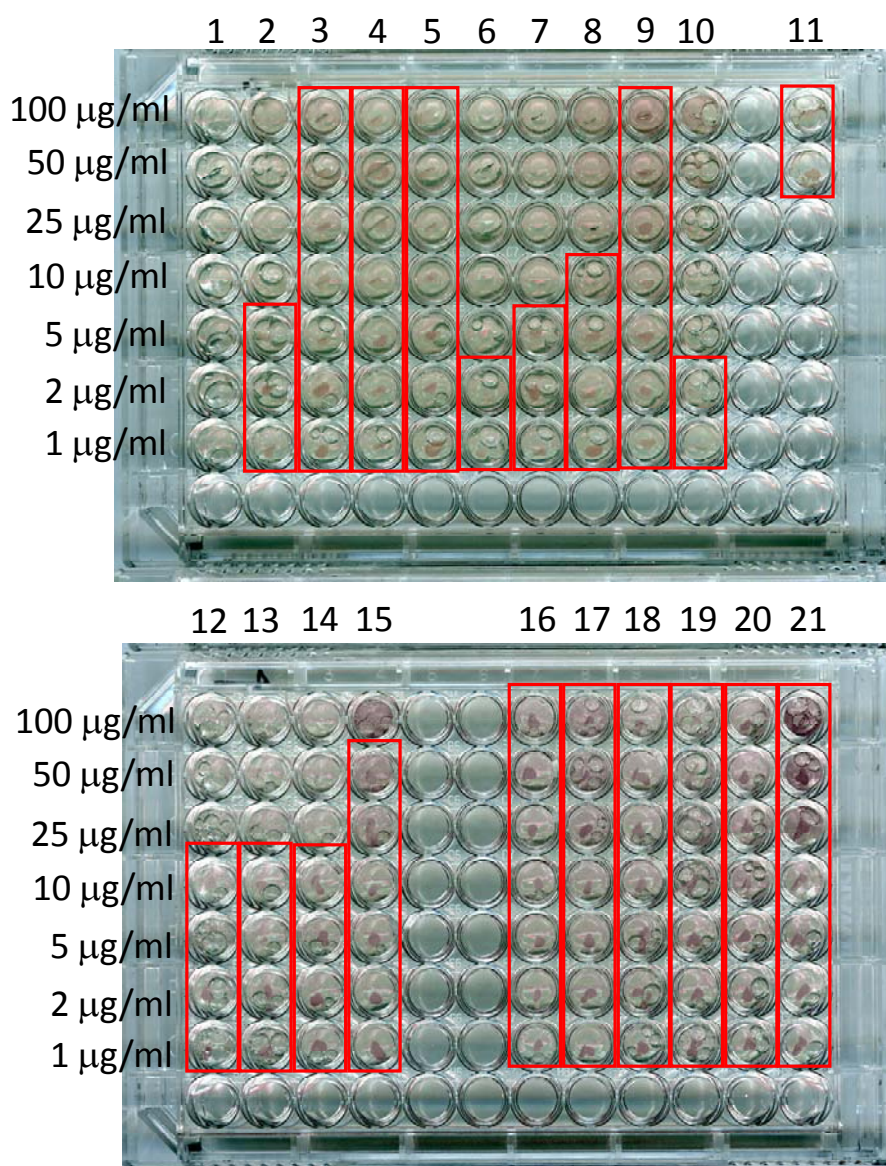


図 3-14 プレニル化化合物の抗菌活性。

赤枠で囲んだ部分が *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) の生育が観察された部分。各番号と化合物名の対応は次ページに記載した

1, Ampicillin; 2, 6-geranyl naringenin; 3, 7-*O*-geranyl naringenin; 4, 7-*O*-geranyl daidzein; 5, 7-*O*-geranyl genistein; 6, 2-geranyl olivetol; 7, 4-geranyl olivetol; 8, 6-geranyl apigenin; 9, 7-*O*-geranyl apigenin; 10, 4-geranyl resveratrol; 11, control (上: DMSO, 下: 水); 12, 6-dimethylallyl naringenin; 13, 2-dimethylallyl olivetol; 14, 4-dimethylallyl olivetol; 15, 4-dimethylallyl resveratrol; 16, naringenin; 17, genistein; 18, daidzein; 19, olivetol; 20, apigenin; 21, resveratrol.

表 3-5 プレニル化化合物の抗菌活性 (MIC)

compound	MIC (μg/ml)
naringenin	>100
apigenin	>100
genistein	>100
daidzein	>100
olivetol	>100
resveratrol	>100
6-geranyl naringenin	10
7- <i>O</i> -geranyl naringenin	>100
6-geranyl apigenin	25
7- <i>O</i> -geranyl apigenin	>100
7- <i>O</i> -geranyl genistein	>100
7- <i>O</i> -geranyl daidzein	>100
2-geranyl olivetol	5
4-geranyl olivetol	10
4-geranyl resveratrol	5
6-DMA naringenin	25
2-DMA olivetol	25
4-DMA olivetol	25
2-DMA resveratrol	100

*Staphylococcus aureus* に対してプレニル化前の基質はいずれも 100 µg/ml 以下では抗菌活性を示さなかった。それに対し、NphB の反応産物である 6-geranyl naringenin, 6-geranyl apigenin, 2-geranyl olivetol, 4-geranyl olivetol, 4-geranyl resveratrol, SCO7190 の反応産物である 6-dimethylallyl (DMA) naringenin, 2-DMA olivetol, 4-DMA olivetol, 2-DMA resveratrol は抗菌活性を示した。この結果からプレニル化が抗菌活性の獲得に寄与することが示された。抗菌活性を示したのはいずれも炭素原子にプレニル基が付加した化合物であり、酸素原子にプレニル基が付加した化合物にはすべて抗菌活性が観察されなかった。このことから、抗菌活性の発現には、7 位の水酸基が必要であることが示唆される。プレニル化化合物が抗菌活性を示す作用機序については解明されていないが、一般的には、プレニル化され疎水性が高まることで細胞膜の透過性が上昇し取り込み量の増大が関係しているのではないかと考えられている[48]。

## 第五節 考察

プレニル化化合物は植物などから数多く単離されており、その活性も抗菌、抗腫瘍、多剤耐性抑制など様々である。しかしながら天然における存在量は微量で作用機構の解明は進んでいない。

本研究では、先に述べた放線菌由来の芳香族基質プレニル基転移酵素である、*Streptomyces* sp. CL190 株由来の NphB、*Streptomyces* sp. KO-3988 株由来の Fur7、および *S. coelicolor* A3(2) 株由来の NphB ホモログ Sco7190 といった基質特異性が比較的寛容であるといわれる二次代謝生合成酵素を利用して、dihydroxynaphthalene (DHN)、フラボノイド、植物由来ポリケタイドのプレニル化化合物を合成し、それらの生理活性を検討した。

NphB は 1,6-DHN、2,7-DHN と、ナリンゲニン、ゲニステイン等のフラボノイド、オリベトール、レスベラトロールといった植物由来ポリケタイドに対して、炭素数 10 のゲラニル基を付加することができたことから、プレニル受容体に関しては基質特異性が極めて寛容であることが判明した。NphB はフラボノイドに対して 7 位の水酸基にゲラニル基を付加したが、酸素原子にゲラニル基を付加した酵素は初めてである。また、Fur7 は 1,3-DHN、2,7-DHN とレスベラトロールに対しゲラニル基を付加することができた。一方、NphB のホモログである SCO7190 は 1,6-DHN、2,7-DHN、ナリンゲニン、オリベトール、レスベラトロールに炭素数 5 のジメチルアリル基を付加することができた。

NphB はフラボノイドに対して広範な基質特異性を示したが全て A 環との反応であった。一方で 4-hydroxyphenylpyruvate (4-HPP) にジメチルアリル基を付加するノビオシン生合成酵素 NovQ はフラボノイドの B 環と反応することが報告されている[49]。これは NphB の生理的基質がナフタレン骨格であり、NovQ の生理的基質である 4-HPP が単環の構造であることを考えると NphB がナフタレン骨格に近い A 環の側を認識し、NovQ は単環の B 環を認識しているといえる。同時に、両酵素とも嵩高い側鎖 (NphB

では B 環、NovQ では A 環と C 環) があるにもかかわらず生理的基質に近い構造を認識できている。これはおそらく活性中心の構造によるものであると考えられるが、嵩高い側鎖を許容しつつ反応できる位置に基質を結合できることが、これら放線菌由来プレニルトランスフェラーゼの基質認識の広範さにつながっているのではないかと考えられる。

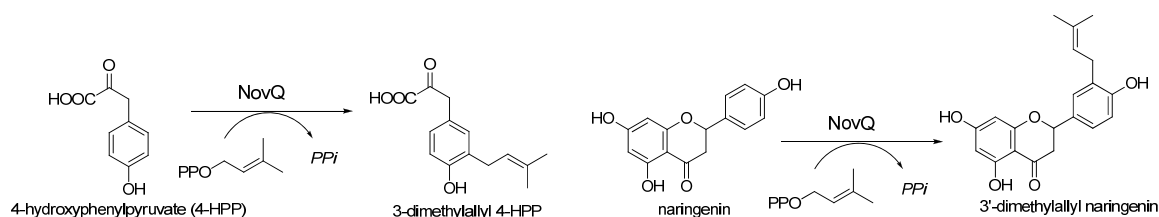


図 3-15 NovQ1 の反応

本研究により酵素によるプレニル化化合物の生産が可能であることを示すことができた。序論でも述べた通りプレニル化化合物、特にプレニル化フラボノイドは植物の二次代謝産物として数多く単離され、様々な生理活性を示すことが報告されている。しかし、天然からは微量しか取れないものが多く生理活性や作用機序がわかっていないものも多い。したがって本研究は酵素を用いたそれらプレニル化化合物の生産を可能にし、プレニル化化合物の生理活性と作用機序の解明に近づくものであるといえる。

また、NphB については X 線結晶構造解析により詳細な結晶構造が明らかになっている。今後は Fur7 及び Sco7190 についても結晶構造が解明され、部位特異的変異を導入し、ポリフェノール類を初めとする多様な骨格の化合物それぞれに対しより活性を向上させた酵素や本研究では反応しなかった化合物とも反応する変異酵素をデザインすることができれば、プレニル化化合物ライブラリーの構築に役立つと考えられる。さらにその中から有用な生理活性を持つものが見つかることを望んでいる。

## 第4章 変異酵素の作製と解析

## 第一節 NapT8 と NapT9 の機能解析

NphB と Fur7 以外にナピラジオマイシンの生合成遺伝子クラスターからもプレニルトランスフェラーゼホモログ *napT8*、*napT9* が見いだされている。そこで *napT8* と *napT9* についても大腸菌で組み換え酵素を発現し機能解析を行った。

### 第一項 NapT8, T9 の精製

NapT8 と NapT9 は以下に示したプライマーを用いて PCR により増幅し、発現プラスミド pHis8 にクローニングした。このプラスミドで大腸菌 BL21 (DE3) をトランスフォームし、組換えタンパクを得た。タンパク精製に関する実験手順は実験項に記した方法を用いた。酵素精製における各段階のサンプルを SDS-PAGE に供し、精製度を確認した。Elution に目視で 34 kDa に単一のバンドが確認できた。収量は培養液 1 L あたり NapT8 は 33 mg、NapT9 は 20 mg 得られた。

表 4-1 NapT8 と NapT9 のクローニング用プライマー配列

プライマー名	制限酵素サイト	プライマー配列
napT8_F	<i>Nco</i> I	5'-GGG <u>CCATGG</u> CACTGACACAGGCATGGAAGG-3'
napT8_R	<i>Bam</i> HI	5'-GGGGGATCCTCAGCTGCCGGCGCCCGCCGC-3'
napT9_F	<i>Nco</i> I	5'-GGG <u>CCATGG</u> CTCCGGAGCTACTGGGGCGGA-3'
napT9_R	<i>Bam</i> HI	5'-GGGGGATCCTCACGAGGCTTGGCCTTCTTC-3'

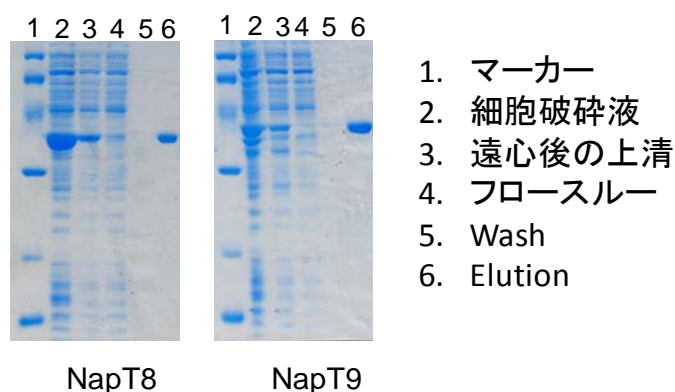


図 4-1 NapT8, NapT9 の SDS-PAGE 結果



## 第二項 NapT8 と NapT9 の機能解析

精製した NapT8 と NapT9 を用いて下記のような反応溶液を調製し、酵素活性を調べた。

表 4-2 NapT8 と NapT9 反応溶液の組成

試薬	終濃度
Tris-HCl (pH 9.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	5 mM / 0 mM
DMAPP または GPP	5 mM
flaviolin	1 mM
NapT8 または NapT9	1.0 mg/ml
milliQ water	
total	1.0 ml

HPLC 条件 Column: 2.0 mm × 150 mm (ODS, Senshu, Tokyo)

Solvent: A, methanol; B, water (isocratic), 0.3 ml/min

75 % A for 30min

Detector: Photo Diode Array (MD2010, JASCO)

## 結果

NapT8 では  $Mg^{2+}$  の有無にかかわらず反応産物が検出された。これを分取し、NMR にて構造決定すると図 4-4 に示したように 3 位にジメチルアリル基が付加した構造だった。また、NapT9 は  $Mg^{2+}$  が存在するときは図 4-4 に示した二つの反応産物が検出されたが、 $Mg^{2+}$  が存在しないときは活性が検出されなかった。そこで NapT8 は DMAPP を基質とし、金属イオン非依存の酵素、NapT9 は GPP を基質とし、金属イオン依存性の酵素であることが判明した。

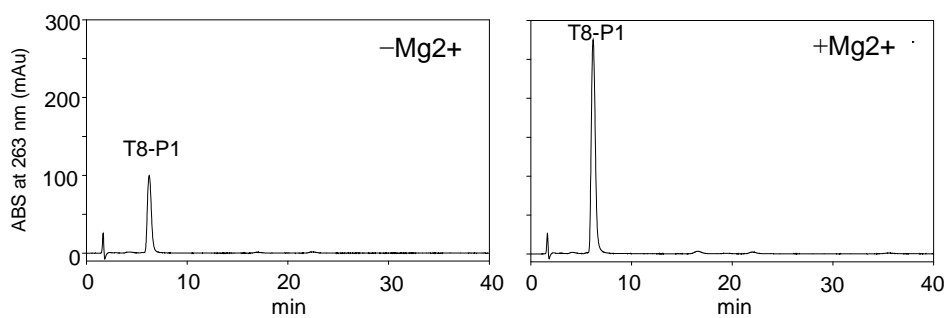


図 4-2 NapT8 とフラビオリン反応産物の HPLC 分析

NapT8 は  $Mg^{2+}$  非依存的に反応産物が検出された。

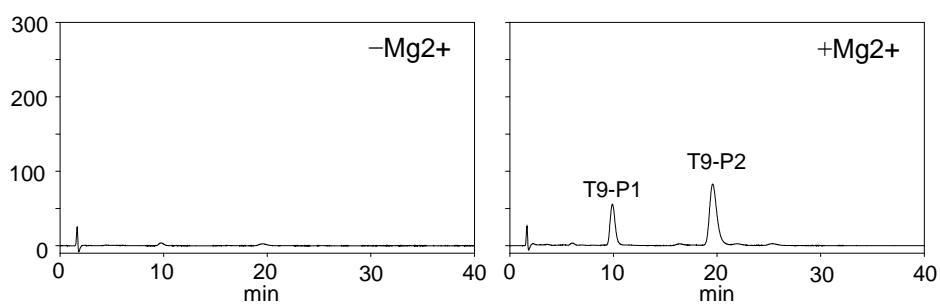


図 4-3 NapT9 とフラビオリン反応産物の HPLC 分析

NapT9 は  $Mg^{2+}$  が存在するときのみ反応産物が検出された。

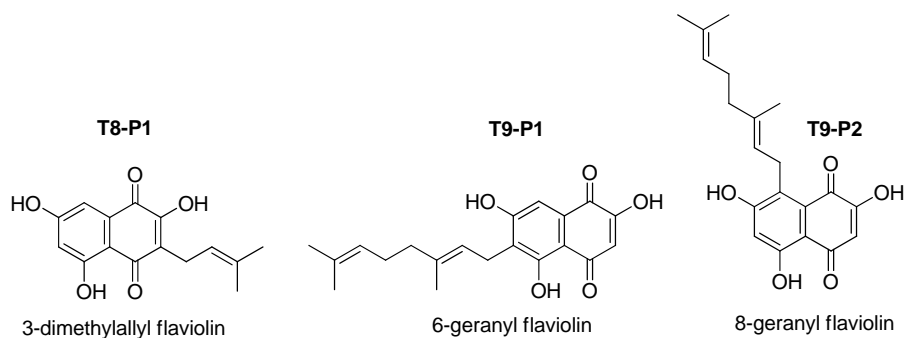


図 4-4 T8-P1 と T9-P1 と T9-P2 の構造

## 第二節 変異酵素の作製

ポリケタイド-テルペノイド融合化合物生合成遺伝子クラスターから見つかったプレニルトランスフェラーゼについて金属イオン依存性は NphB と NapT9 が金属イオン依存性であり、他の Fur7 と NapT8 は金属イオン非依存性であった。さらに Fnq26 も金属イオン非依存性であることが報告されている[43]。そこで、それらプレニルトランスフェラーゼ間でアラインメントをとると図 4-5 のようになった。

アラインメントと、NphB の結晶構造と、それをもとに作成した Fur7 のモデリング構造から活性中心の GPP 結合領域のアミノ酸残基について両酵素を比較すると、51 番目、64 番目のセリン残基が 53 番目、67 番目のアルギニン残基に相当することが分かり、両アミノ酸残基は金属イオン依存、非依存性プレニルトランスフェラーゼ間で保存されていた。Fur7 のモデリングは InsightII で行った (図 4-10)。このアラインメントから、これらのセリン残基が金属イオン依存性を決定している可能性を考えた。そこで、NphB(S51R), NphB(S64R), NphB(S51R, S64R), Fur7(R53S), Fur7(R67S), Fur7(R53S, R67S)を作製して活性を測定し、比較した。作製には表 4-3 のようなプライマーを用い、Stratagene 社の QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit を使った。実験方法は添付されているプロトコルに従った。

また、同じく、NphB と NapT9 では NphB の 121 番目に相当する残基はチロシンであるが Fur7 と NapT8 ではトリプトファン残基に置換されている。そこで NphB (Y121W), Fur7 (W123Y) も作製して活性を比較した。

表 4-3 変異酵素作製のためのプライマー

プライマー名	プライマー配列
NphB (S51R)_N	5'-CGTCGTCTTCCGCATGGCGAGCG-3'
NphB (S51R)_C	5'-CGCTCGCCATGCGGAAGACGACG-3'
NphB (S64R)_N	5'-GAACTGGACTTCCGTATCTCGGTGCCG-3'
NphB (S64R)_C	5'- CGGCACCGAGATACGGAAGTCCAGTTC -3'
NphB (Y121W)_N	5'-GGCTTCAAGAAGACGTGGGCCTTCTTCCCCACC-3'
NphB (Y121W)_C	5'-GGTGGGGAAGAAGGCCACGTCTTCTTGAAGCC-3'
Fur7 (R53S)_N	5'-GATCGCCTTCAGCGTGGCCACCA-3'
Fur7 (R53S)_C	5'- TGGTGGCCACGCTGAAGGCGATC-3'
Fur7 (R67S)_N	5'- GGGACTTCGACGTTAGCTTCACCGTTCC-3'
Fur7 (R67S)_C	5'-GGAACGGTGAAGCTAACGTCGAAGTCCC-3'
Fur7 (W123Y)_N	5'-GGGTTCAAGAAGGTCTACGTGTACTTCTTCCCG-3'
Fur7 (W123Y)_C	5'-CGGGAAGAAGTACACGTAGACCTTCTTGAACCC-3'

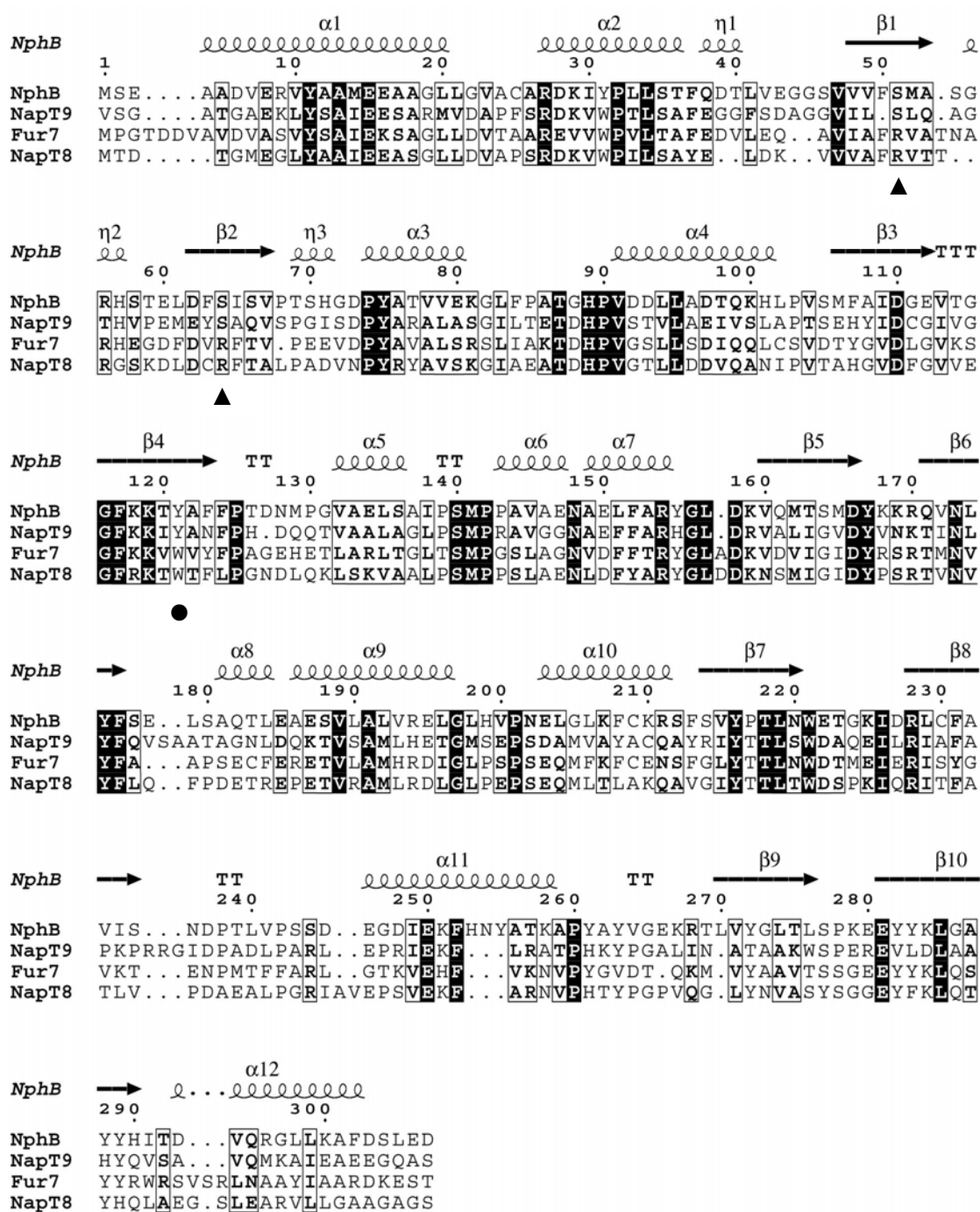


図 4-5 放線菌由来プレニルトランスフェラーゼのアラインメント

NphB と NapT9 が  $Mg^{2+}$  依存性である。ここでは 51 番目と 64 番目のセリン/アルギニン残基 (▲) と 121 番目のチロシン/トリプトファン残基 (●) に注目した。

### 第三節 Fur7 変異酵素の機能解析

Fur7 のそれぞれの変異酵素についてフラビオリンを基質に反応を行いそれぞれ HPLC で分析した。

#### 実験方法

表 4-4 Fur7 変異酵素反応溶液組成

試薬	終濃度
Tris-HCl (pH 9.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM / 0 mM
GPP	5 mM
flaviolin	1 mM
Fur7	1.0 mg/ml
milliQ water	
total	0.1 ml

#### 結果

53 番目のアルギニン残基をセリン残基に置換しただけでは  $\text{Mg}^{2+}$  非依存は変化しなかった。また、67 番目のアルギニン残基をセリン残基に置換したところ活性が 5% に落ち込んだが  $\text{Mg}^{2+}$  の添加によりわずかに活性が回復していると考えられた。さらに 53 番目、67 番目の双方のアルギニン残基をセリンに変更すると  $\text{Mg}^{2+}$  への依存性があきらかに高くなっていた。

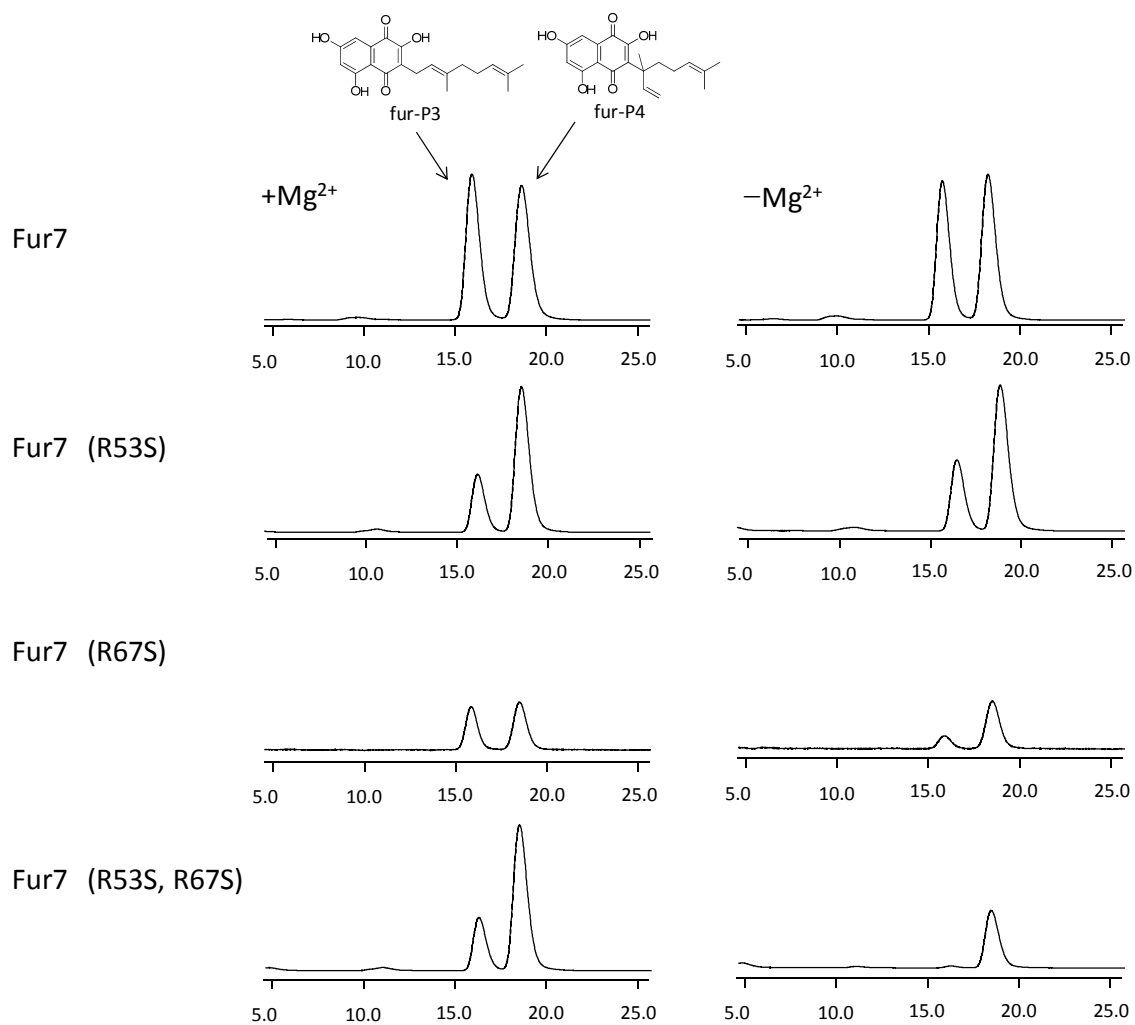


図 4-6 Fur7 アルギニン残基変異酵素活性比較

Fur7 (R67S)は縦軸を 10 倍に拡大した。53 番目と 67 番目の双方のアルギニン残基をセリンに変更すると、 $-Mg^{2+}$ では活性が微弱になった。

続いて、Fur7 (W123Y) の反応溶液の HPLC 分析も同様に行った。その結果 Fur7 (W123Y) は  $\text{Mg}^{2+}$  への依存性はまったく観察されなかったが、fur-P3 と fur-P4 の生成比が 1:1 から 3:1 へと変化していた。

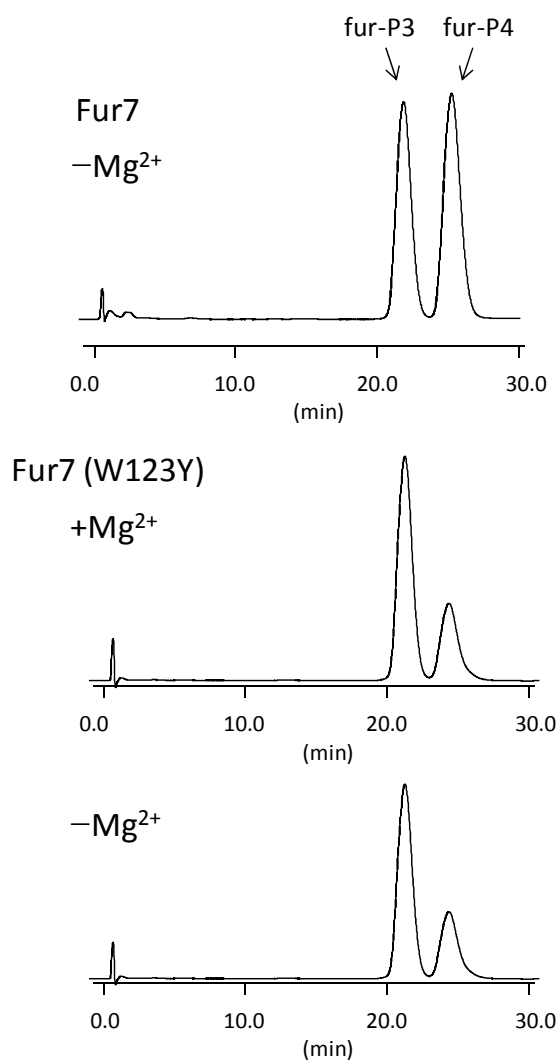


図 4-7 Fur7 (W123Y) とフラビオリンの反応産物の HPLC 分析 (265 nm)

W123Y は  $\text{Mg}^{2+}$  依存性は見られなかったが、fur-P3 と fur-P4 の組成比が野生型酵素の 1:1 から 3:1 へと変化していた。



#### 第四節 NphB 変異酵素の解析

NphB のそれぞれの変異酵素についてナリンゲニンを基質に反応を行いそれぞれ HPLC で分析した。

#### 実験方法

表 4-5 NphB 変異酵素反応溶液組成

試薬	終濃度
Tris-HCl (pH 9.0)	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM / 0 mM
GPP	5 mM
Naringenin	5 mM
NphB	1.0 mg/ml
milliQ water	
total	0.1 ml

#### 結果

野生型酵素は  $Mg^{2+}$  依存性であり、 $Mg^{2+}$  非存在下では活性を示さなかったが、NphB (S51R) では  $Mg^{2+}$  非存在下においても 11 min と 15 min に 6-geranyl naringenin と 7-*O*-geranyl naringenin が検出され、ゲラニル化活性が検出できた。その他の変異酵素では  $Mg^{2+}$  の有無にかかわらず酵素活性が検出できなかった。

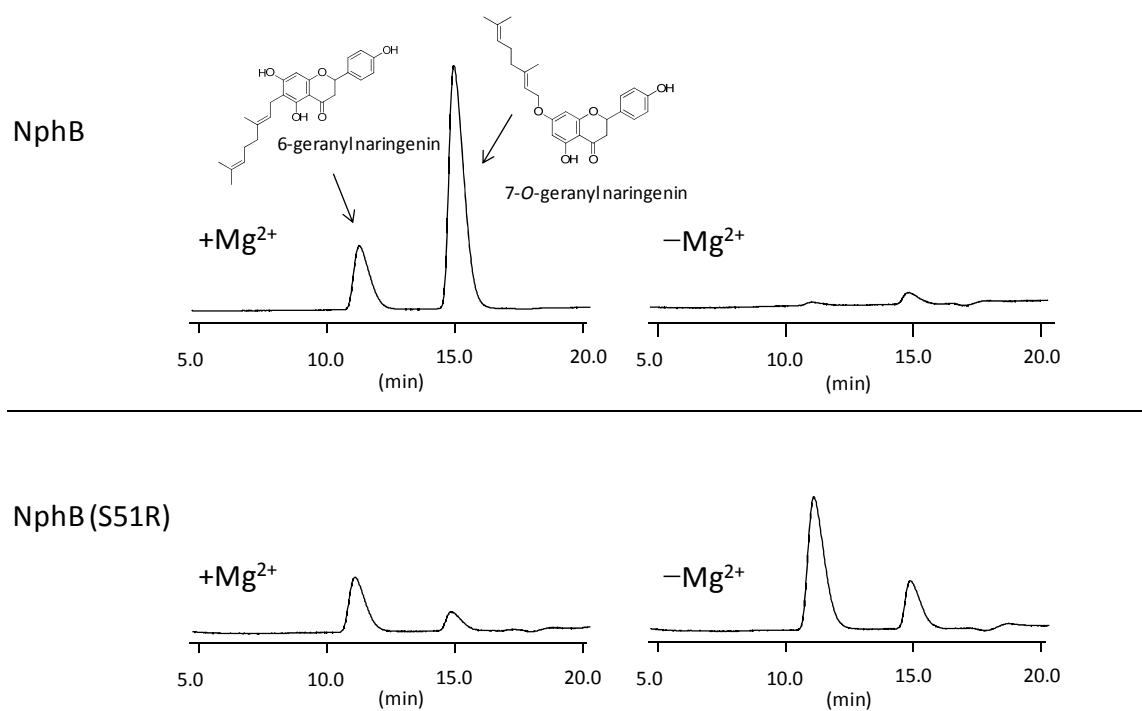


図 4-8 NphB と NphB (S51R) の反応産物の HPLC 分析 (290 nm)

NphB + $\text{Mg}^{2+}$ 以外は縦軸を 10 倍に拡大。51 番目のセリン残基をアルギニン残基に置換した変異酵素で  $\text{Mg}^{2+}$ 依存性が解消されていた。

続いて、NphB (Y121W)の反応溶液の HPLC 分析も同様に行った。その結果 NphB (Y121W)は  $Mg^{2+}$  依存である点は野生型酵素と全く同じであった。しかしフラボノイドや植物ポリケタイドと反応させると、レスベラトロールと反応した場合に反応産物に変化した。この反応産物を分取し NMR によって構造を決定したところ 2-geranyl resveratrol であった。

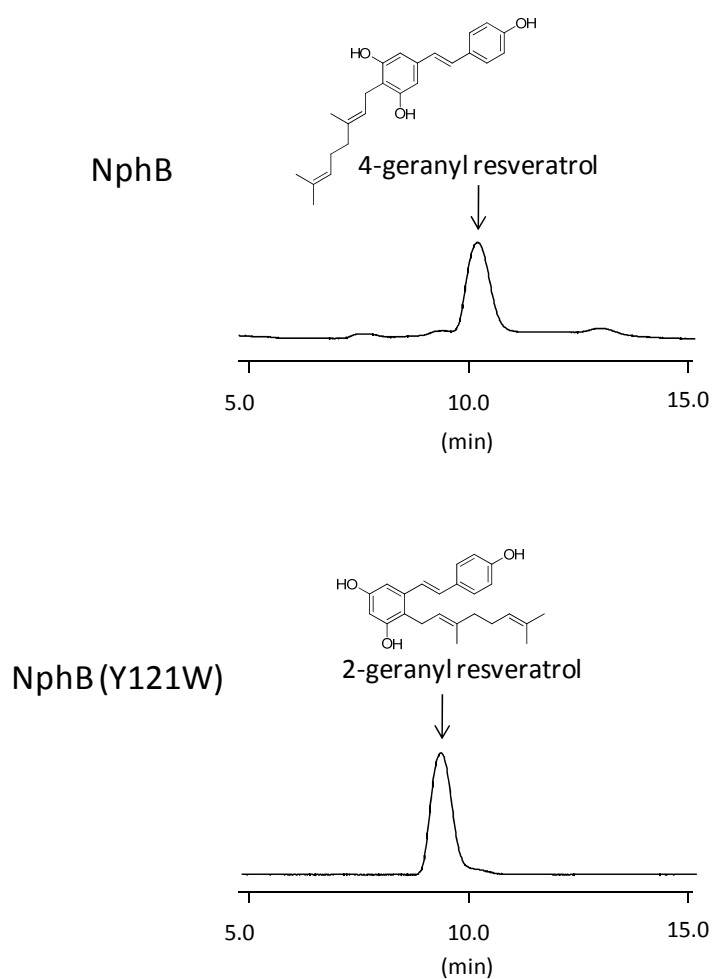


図 4-9 NphB (Y123W)とレスベラトロールの反応産物の HPLC 分析 (290 nm)

NphB (Y123W)は  $Mg^{2+}$  依存性は変化しなかったがレスベラトロールと反応させた場合に反応産物に変化していた。その構造を決定すると 2-geranyl resveratrol が生成していた。

## 第五節 考察

NphB は  $Mg^{2+}$  依存性であるが、Fur7 は金属イオン非依存性である。さらに、ナピラジオマイシン生合成遺伝子 NapT8 と NapT9 をクローニングしフラビオリンに対して反応を試みたところ NapT8 は金属イオン非依存的にジメチルアリル基をフラビオリンの 3 位に、NapT9 は金属イオン依存的にゲラニル基をフラビオリンの 6 位または 8 位に付加した。これらプレニルトランスフェラーゼ間でアラインメントをとると、金属イオン非依存性の Fur7、SCO7190、NapT8 では Fur7 の 53 番目と 67 番目に相当するアミノ酸残基がアルギニンであり、金属イオン依存性の NphB と NapT9 ではセリンであった。プレニルトランスフェラーゼ反応ではプレニル二リン酸のヘテロリシスにより生じたプレニルカチオンが芳香環と求電子置換反応により反応すると推定されており、 $Mg^{2+}$  がその一端を担っていると考えられている。そこで、Fur7 などの金属イオン非依存性の酵素では、アルギニン残基がプレニルカチオンの生成に関与している可能性を考えた。そこで NphB(S51R), NphB(S64R), NphB(S51R, S64R), Fur7(R53S), Fur7(R67S), Fur7(R53S, R67S) を作製して活性を測定した。その結果、NphB(S51R) において  $Mg^{2+}$  非存在下でも活性が検出された。一方で、Fur7(R53S, R67S) は  $Mg^{2+}$  依存度が変化したことから、Fur7 をはじめ、金属イオン非依存性のプレニルトランスフェラーゼでは二つのアルギニン残基がプレニルカチオンの生成に関与していることが示唆された。

また、アラインメントをとると NphB、NapT9 では NphB の 121 番目にあたるチロシン残基が、Fur7、NapT8 ではトリプトファン残基に置換されている。そこで NphB (Y121W), Fur7 (W123Y) を作製して活性を比較したところ NphB (Y121W) では  $Mg^{2+}$  依存性の変化は観察されなかったが、レスベラトロールを基質にした場合に反応産物に変化した。また、Fur7 (Y121W) ではフラビオリンを基質にした場合に、もともと 1:1 程度であった fur-P3 と fur-P4 の生成比が 3:1 になっており、1 級カチオンが安定化されていることが分かった。このことから、Fur7 ではトリプトファンの  $\pi$  電子効果によって 3 級カチオンが安定化されていると考えている。これは、フラキノシン生合成においては 3 級カチオンが求電

子置換反応する必要があるためであるといえる。一方で NphB ではナフトテルピン生合成において 1 級カチオンで反応する必要がある、このためにチロシンの  $\pi$  電子効果により 1 級カチオンを安定化していると考えられる。

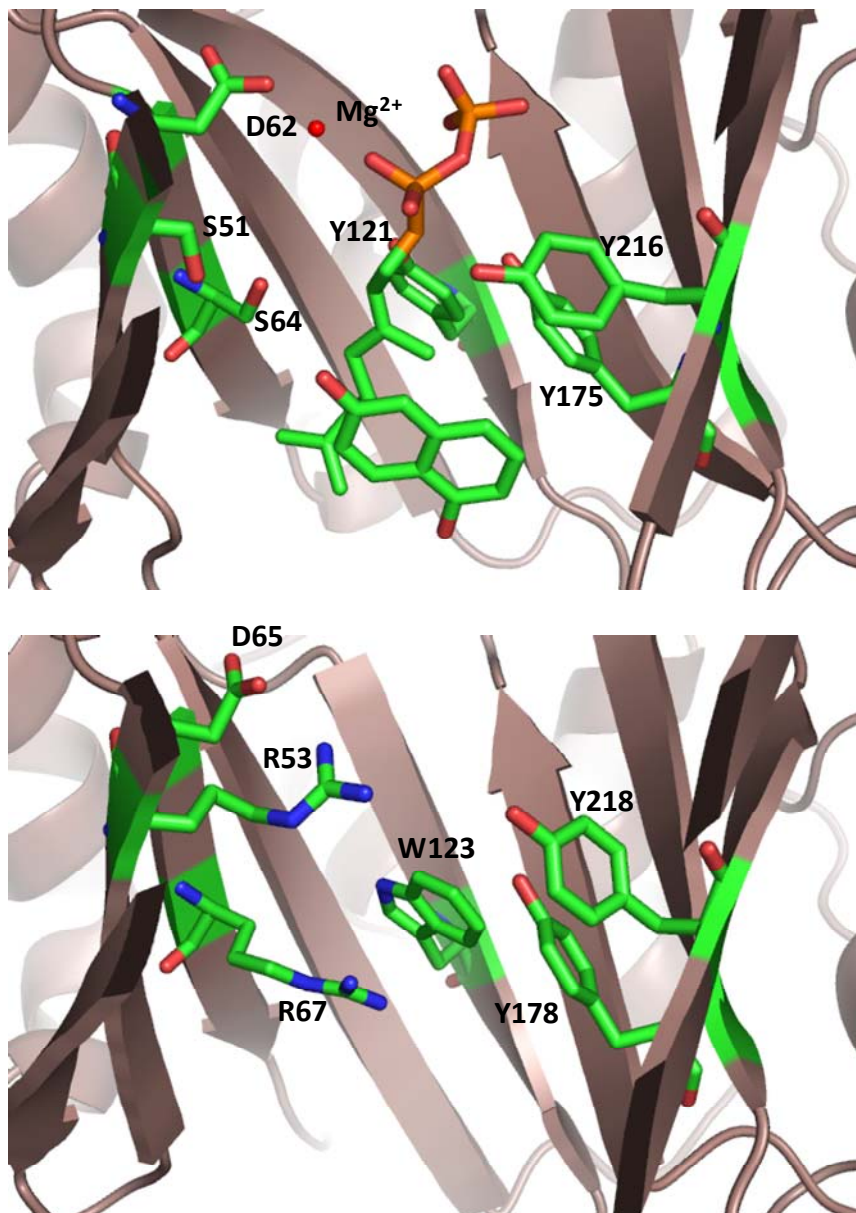


図 4-10 (a) NphB と 1,6-DHN, GPP の共結晶構造、(b) Fur7 のモデリング構造

NphB において  $Mg^{2+}$  と結合している D62 は Fur7 でも保存されている(D65)。それに対して S51, S64 は Fur7 では R53, R67 になっている。また、NphB の Y121 は Fur7 では W123 となっている。

また、最近カビ *Aspergillus fumigatus* 由来のトリプトファンをジメチルアリル化するプレニルトランスフェラーゼ FgaPT2 の結晶構造が報告された[50]。FgaPT2 は図 4-11 のようにトリプトファンの 4 位をジメチルアリル化する酵素で、NphB に対して 12%、Fur7 に対して 6%と相同性は極めて低い、構造は NphB と同じ  $(\alpha\alpha\beta\beta)_4$ - $\alpha\beta\beta$ -の PT バレル構造であった。そして、FgaPT2 は  $Mg^{2+}$  非依存性の酵素だが、DMAPP のジリン酸はアルギニン残基やリジン残基など正の電荷をもつアミノ酸と結合していた。Fur7 や NphB(S51R) も FgaPT2 同様、アルギニン残基がジリン酸と結合することで  $Mg^{2+}$  非依存的なプレニル化反応を触媒していると考えられる。また、FgaPT2 ではカチオンが生成する位置に 3 つのチロシン残基が DMAPP を囲むように存在しており、これらで NphB 同様 1 級カチオンを安定化していると考えられる。

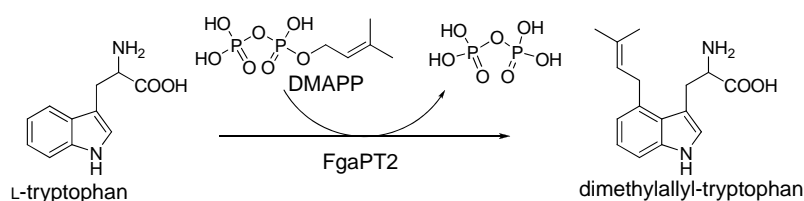


図 4-11 FgaPT2 の反応

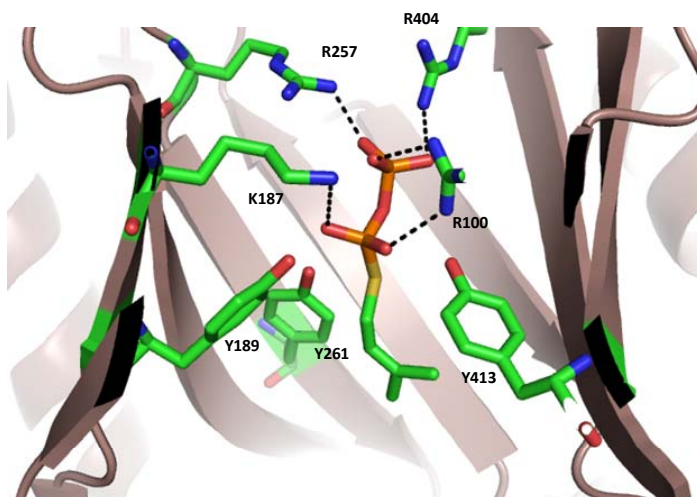


図 4-12 FgaPT2 と DMAPP の共結晶構造

## 第5章 形質転換体植物の生産するプレニル化化合物の同定

## 第一節 序論

植物の二次代謝産物として様々なプレニル化化合物が単離されており、それらの生物活性が注目されている。しかし、その一方で、生産量が微量であるため化合物の同定が困難であり、生物活性が検討されていない化合物も多い。

本章ではマメ科植物 *Sophora flavescens* 由来の 8-dimethylallyl naringenin 合成酵素 N8DT [17]、6-dimethylallyl genistein 合成酵素 G6DT と放線菌由来プレニルトランスフェラーゼ NphB、SCO7190 についてミヤコグサ (miyakojima 系統) とダイズ、トマト (micro tom 種, money maker 種) で発現させ、植物でのプレニル化化合物の異種生産が可能であるかを検討した。その際に、放線菌由来プレニルトランスフェラーゼを利用して合成したプレニル化化合物を標品として用い、LC-MS で分析することで、形質転換体抽出物中のプレニル化化合物の同定を迅速に行うことができると考えた。

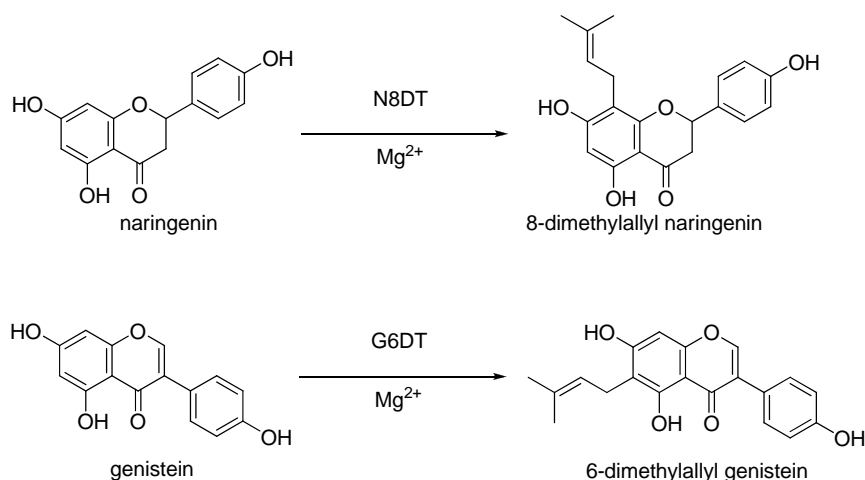


図 5-1 N8DT, G6DT の触媒する反応

N8DT はナリンゲニンの 8 位の炭素にジメチルアリル基を、G6DT はゲニステインの 6 位の炭素にジメチルアリル基を付加する。



## 第二節 形質転換ミヤコグサ抽出物の分析

### 第一項 NphB 発現ミヤコグサ抽出物の分析

ミヤコグサで NphB を発現させたサンプルを分析した。形質転換体の作製はすべて京都大学生存圏研究所、矢崎一史先生の研究室で行われた。NphB はサイトゾル、プラスチド、ミトコンドリアで発現させたものを作製した。ミヤコグサの葉を 100 mg Dry Weight/ml になるようにメタノールで抽出し 15000 rpm で遠心後、0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過したサンプルを LC-MS で分析した。

### 実験方法

ミヤコグサからメタノール抽出したサンプルを 10 倍に希釈して 10  $\mu\text{l}$  を LC-MS で分析した。分析条件は以下のとおりである。

LC 条件:

Column: 2.0  $\times$  150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, methanol; B, water (+0.1% acetate), 0.2ml/min  
40%-100% A over 20 min, 100% A for 10min

MS 条件: ESI-

## 結果

NphB 発現株では NphB をプラスチドで発現させた D9 ラインにおいて、0.1 mM ナリンゲニン、ゲニステインを葉に直接シリンジで添加したときに分子量 405 (ESI) の化合物が検出された。その他のサイトゾルやミトコンドリアで発現させた株ではプレニル化合物は検出できなかった。

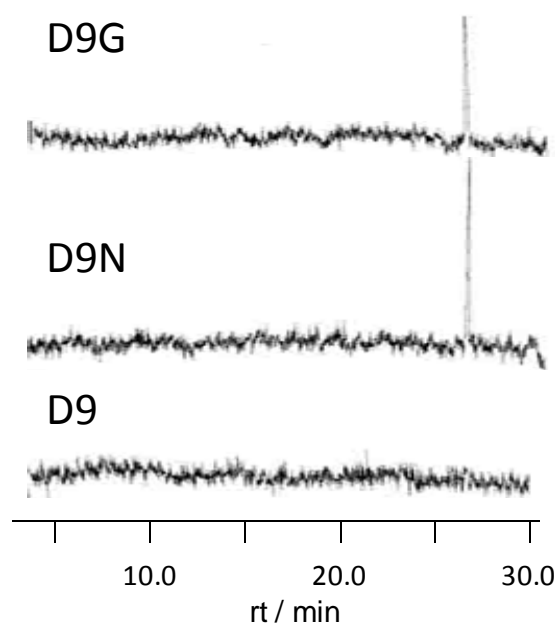


図 5-2 NphB 発現株(D9)抽出物の分析

D9 ラインは NphB をミヤコグサのプラスチドで発現させた株。LC-MS 分析結果のマスキロマトグラム ( $m/z=405.0-405.5$ )を示した。D9G は D9 ラインに 0.1 mM genistein を添加したサンプル。D9N は D9 ラインに 0.1 mM naringenin を添加したサンプル。D9 は何も添加していないサンプル。

次に、0.1 mM naringenin または genistein を添加した D9 ラインに検出された化合物を同定するため、NphB により合成できるフラボノイドのうち  $m/z=405$  (M-H) である 6-geranyl apigenin, 7-O-geranyl apigenin, 7-O-geranyl genistein と混合して、LC-MS 分析に供した。

## 実験方法

D9 ラインの 0.1 mM naringenin 添加サンプル (D9N) と NphB によって合成した標品 (6-geranyl apigenin, 7-*O*-geranyl apigenin, 7-*O*-geranyl genistein) について、それぞれを LC-MS で分析したのち、両者を混合して LC-MS で分析した。

## 結果

D9 ラインにおいてナリンゲニン、ゲニステイン添加サンプルから検出された化合物は 7-*O*-geranyl genistein と溶出時間が一致した。これにより、D9 生産物を 7-*O*-geranyl genistein と同定することができた。

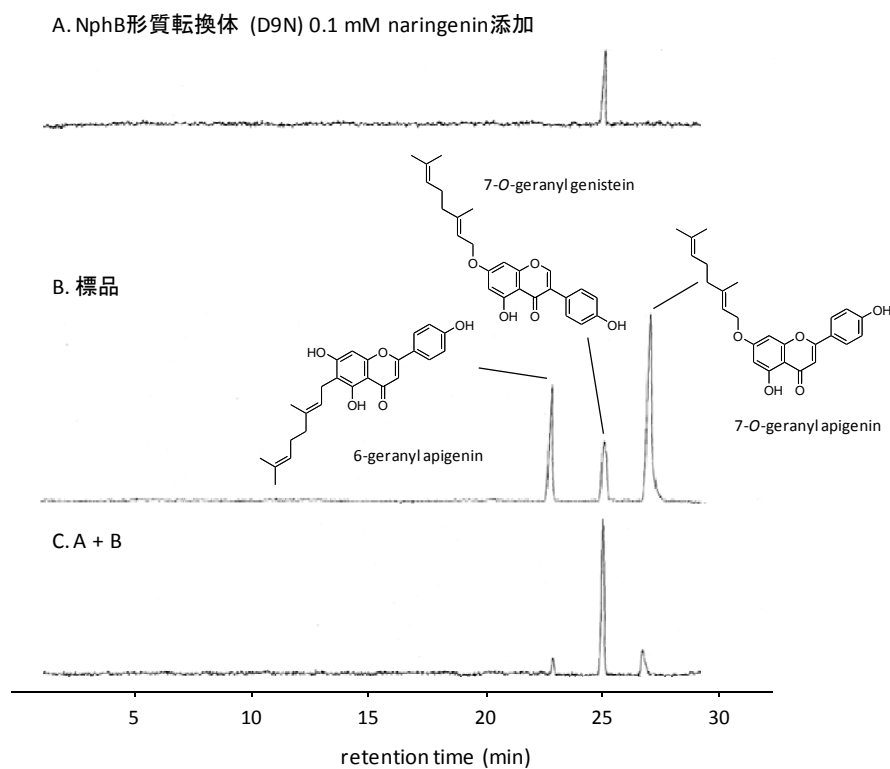


図 5-3 NphB 発現株 (D9)生産物の同定

D9 ラインで検出された化合物は 7-*O*-geranyl naringenin と溶出時間が一致した。

## 第二項 G6DT、N8DT、SCO7190 発現株抽出物の解析

マメ科植物 *Sophora flavescens* 由来の 6-dimethylallyl genistein 合成酵素 G6DT と 8-dimethylallyl naringenin 合成酵素 N8DT[17]、および SCO7190 を発現した株の抽出物を LC-MS で分析した。

### 実験方法

サンプルを 10 倍に希釈して 10  $\mu$ l を LC-MS で分析した。LC-MS 条件は以下の通り。

LC 条件:

Column: 2.0  $\times$  150 mm (ODS, Senshu, Tokyo)

Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1 % acetate) , 0.2ml/min  
40%-98% A over 18 min, 98% A for 2min

MS 条件: ESI<sup>-</sup>

### 結果

G6DT 形質転換体はプラスチドで発現させた AA と AE ラインにおいて、0.1 mM ゲニステインを添加したときに  $m/z=337$  (M-H) の化合物が検出された。また、SCO7190 をプラスチドで発現させた TP-SCO7190 C-18 ラインにおいて 0.1 mM ナリンゲニンを添加したときに  $m/z=337$  (M-H) の化合物が検出された (図 5-4)。

さらに、TP-SCO7190 C-18 ラインにおいて 0.1 mM naringenin を添加したときに  $m/z=339$ (ESI<sup>-</sup>)の化合物が見られた (図 5-5)。

また、N8DT 発現株からも 0.1 mM naringenin を添加することで 8-dimethylallyl naringenin を検出することができた (図 5-6)。

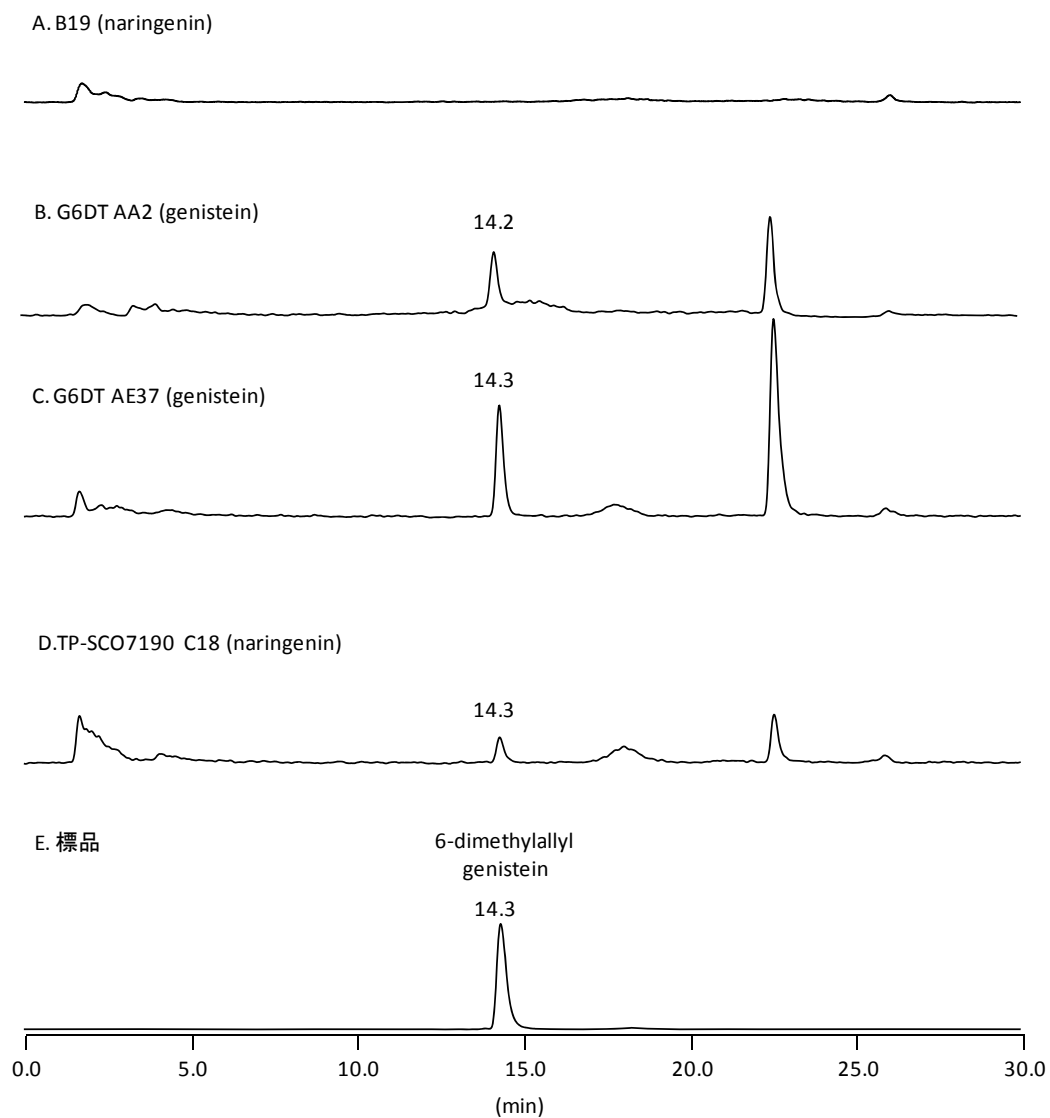


図 5-4 形質転換ミヤコグサ抽出物の LC-MS 分析

$m/z=337.0-337.5$  のマスククロマトグラムを示す。A, 野生株 B19 (+0.1 mM ナリンゲニン); B, G6DT 発現株 AA2 (+0.1 mM ゲニステイン); C, G6DT 発現株 AE37 (+0.1 mM ゲニステイン); D, SCO7190 発現株 C18 (+0.1 mM ナリンゲニン); E, 標品 6-dimethylallyl genistein.

SCO7190 発現株において 0.1 mM ナリンゲニンを投与することで検出された  $m/z=337.1$  の化合物は G6DT と溶出時間が一致し、6-dimethylallyl genistein と同定することができた。23 min のピークについては未知である。

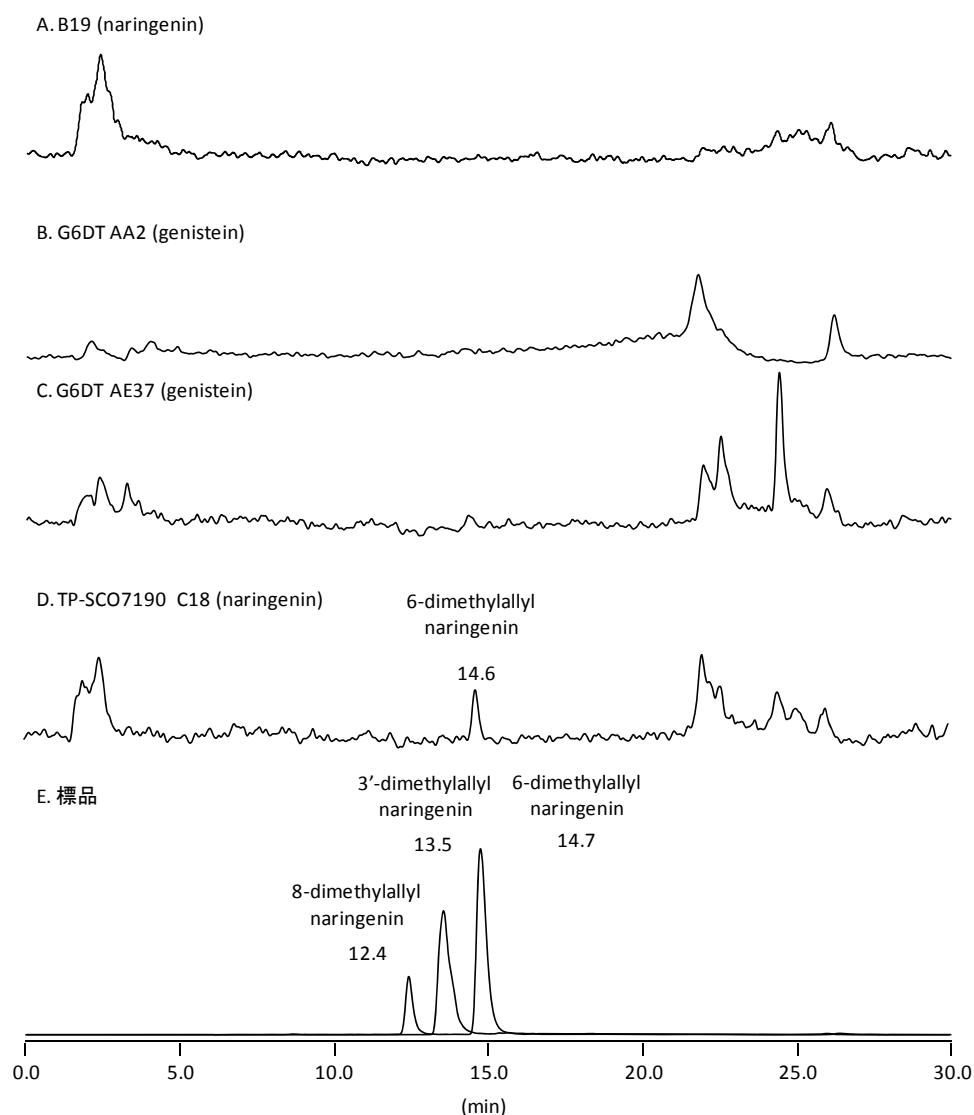


図 5-5 形質転換ミヤコグサ抽出物の LC-MS 分析

$m/z=339.0-339.5$  のマスククロマトグラムを示す。A, 野生株 B19 (+0.1 mM ナリンゲニン); B, G6DT 発現株 AA2 (+0.1 mM ゲニステイン); C, G6DT 発現株 AE37 (+0.1 mM ゲニステイン); D, SCO7190 発現株 C18 (+0.1 mM ナリンゲニン); E, 標品 8-dimethylallyl naringenin, 3'-dimethylallyl naringenin, 6-dimethylallyl naringenin.

SCO7190 発現株において 0.1 mM naringenin を投与することで検出された  $m/z=339.0$  の化合物は標品と比較することで、6-dimethylallylnaringenin と同定することができた。

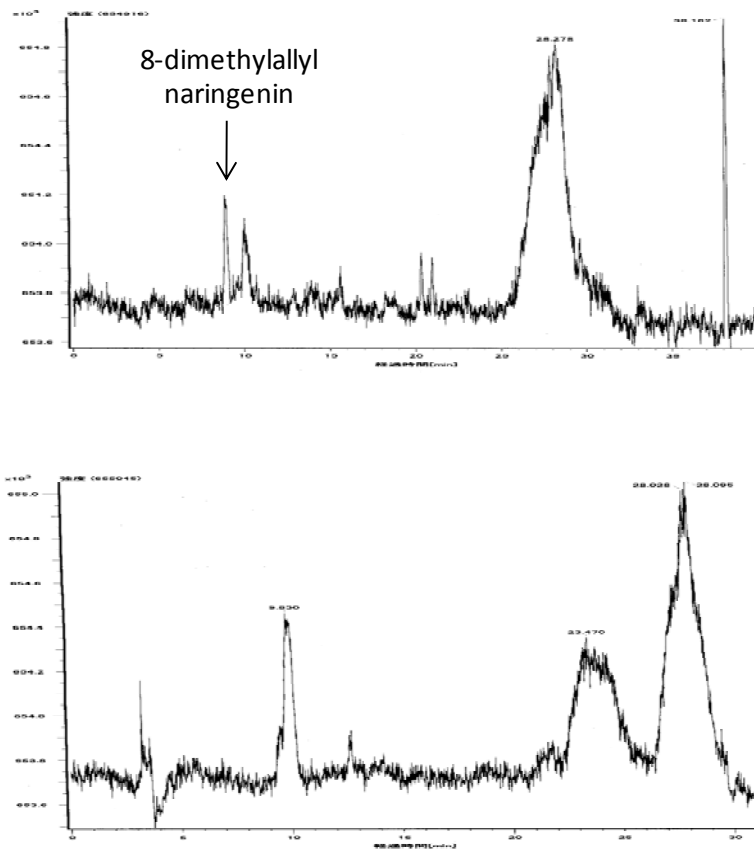


図 5-6 上: N8DT 発現ミヤコグサ(X2), 下: B25 (MG 野生株)

N8DT をプラスチドで発現し 0.1mM naringenin 添加したミヤコグサ(X2)の LC-MS 分析の m/z 339.0-339.5 におけるマスキロマトグラム。X2 ラインからは 8-dimethylallyl naringenin が 7.8 min に検出された。

### 第三項 まとめ

表 5-1 形質転換ミヤコグサの分析結果

enzyme	基質投与なし	+ 0.1 mM naringenin	+ 0.1 mM genistein
N8DT(X2, X5)	N.D.	8- dimethylallyl naringenin	未分析
G6DT(AA, AE)	N.D.	6- dimethylallyl genistein	6- dimethylallyl genistein
NphB (D9, D14)	N.D.	7-O-geranyl genistein	7-O-geranyl genistein
SCO7190 (C3, C18)	N.D.	6-dimethylallyl naringenin 6- dimethylallyl genistein	未分析

形質転換ミヤコグサでプレニル化合物が検出されたサンプルは、いずれもナリンゲニンまたはゲニステインを投与した場合であった。その原因としてミヤコグサのフラボノイドの生産量が少ないことが考えられる。また、今回、酵素をサイトゾル、プラスチド、ミトコンドリアで発現させたものをそれぞれ分析したが、活性が検出できたのはプラスチドで発現させた形質転換体だけであった。いずれの形質転換体についても、それぞれのタンパクが発現していることは強弱はあるもののウェスタンブロットで確認されている。したがってプレニル化合物がプラスチドのみで検出されるのはプレニル基供与体のプール量に依存しており、プラスチドのそれは比較的多いのかかもしれない。

ナリンゲニンを投与したにもかかわらず NphB 発現株では geranyl naringenin が検出されず 7-O-geranyl genistein が、SCO7190 発現株では 6-dimethylallyl naringenin もわずかに検出できたものの 6-dimethylallyl genistein がより多く検出された。これはミヤコグサの持つ内因性の 2-hydroxy isoflavanone synthase (IFS) と hydroxy isoflavanonedehydratase (HID)によってナリンゲニンがゲニステインに代謝されたためではないかと考えている (図 5-8)。ただ、in vitro 反応において SCO7190 とゲニステインの反応産物は HPLC では検出できなかった。そこで今回、SCO7190 とゲニステインの in



in vitro 反応溶液を LC-MS で分析したところ dimethylallyl genistein と m/z が一致する反応産物と考えられるピークが検出された (図 5-7)。したがって、SCO7190 はゲニステインに対しても活性を有することが示唆された。しかし、in vivo で検出された 6-dimethylallyl genistein (14.2 min) とは溶出時間が一致しなかった。この結果から、SCO7190 発現株ではゲニステインに対して in vitro とは異なる位置に dimethylallyl 基を付加するのではないかと考えられる。もしくは 6-dimethylallyl naringenin が合成されてからミヤコグサの内在性酵素によって 6-dimethylallyl genistein に変換されていると考えられるが、そのような酵素はこれまで知られていない。

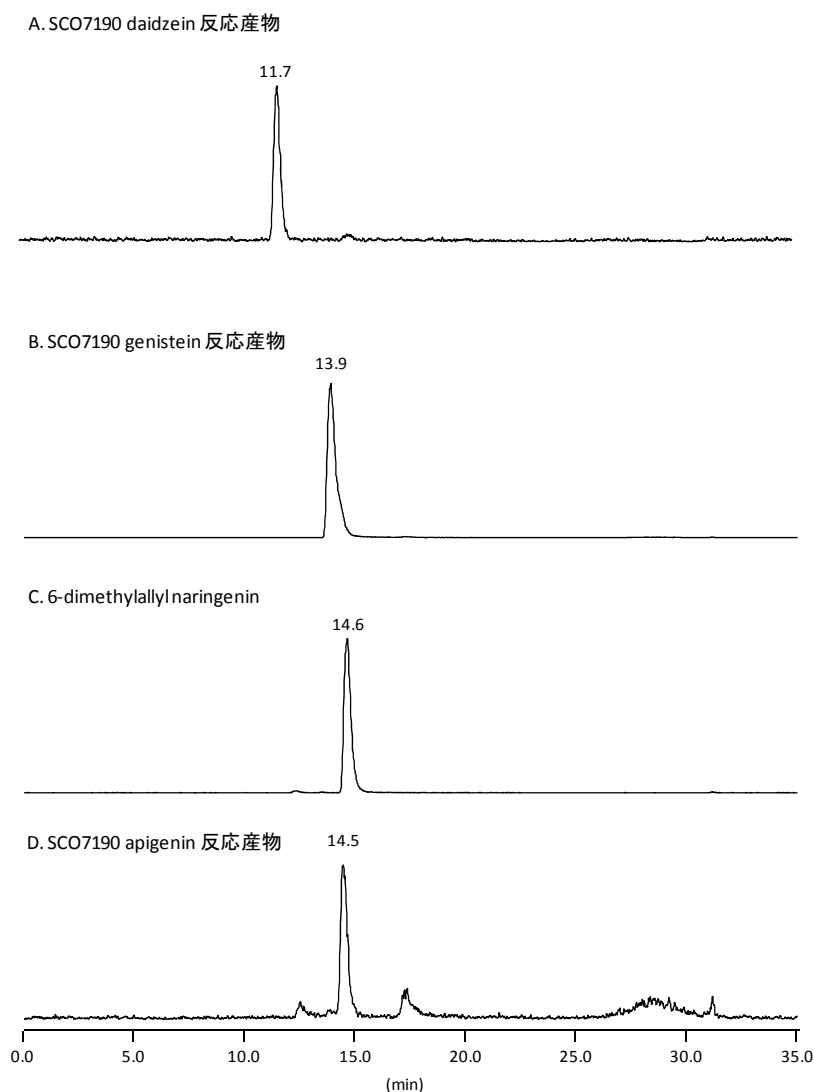


図 5-7 SCO7190 とダイゼイン、ゲニステイン、ナリンゲニン、アピゲニン反応産物の LC-MS 分析

A, SCO7190 とダイゼインの in vitro 反応産物 ( $m/z=320.0-320.5$ ); B, SCO7190 とゲニステインの in vitro 反応産物 ( $m/z=337.0-337.5$ ); C, 6-dimethylallyl naringenin ( $m/z=339.0-339.5$ ); D, SCO7190 とアピゲニンの in vitro 反応産物 ( $m/z=337.0-337.5$ )

SCO7190 との反応産物が HPLC でも確認できたのはナリンゲニンのみでありその他のものは構造未知である。

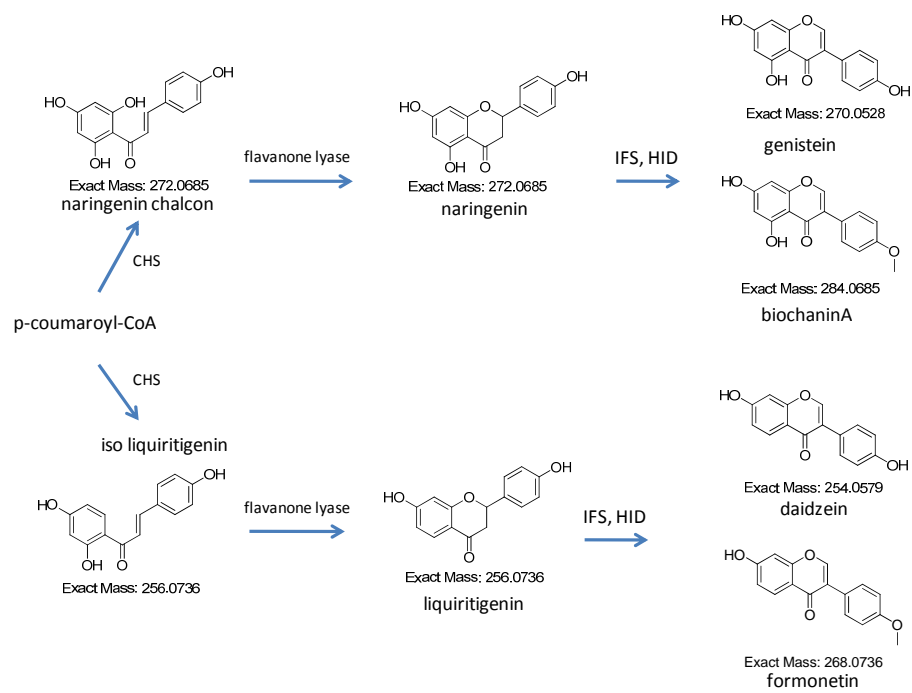


図 5-8 isoflavone 合成経路

ナリンゲニン は IFS, HID によりゲニステイン等イソフラボンに代謝される。

### 第三節 形質転換ダイズ抽出サンプルの分析

ミヤコグサは基質となるフラボノイドの生産が少ないため基質の添加が必要であったが、ダイズはフラボノイド、特にダイゼインやゲニステインの生産量が多いため基質の添加なしでプレニル化合物が得られることを期待した。

#### 第一項 組換えダイズカルス抽出物の分析

ミヤコグサの場合と同じように、NphB, SCO7190, N8DT を発現させたダイズのカルス抽出物を LC-MS で分析した。形質転換ダイズの抽出物はすべて京都大学生存圏研究所、矢崎一史先生の研究室より提供された。

#### 実験方法

サンプルは 100 mg Dry Weight/ml になるようにメタノールで抽出し 15000 rpm で遠心後上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過して調製されている。そのサンプルを 10 倍に希釈して 10  $\mu\text{l}$  を LC-MS で分析した。

LC 条件:

Column: 2.0  $\times$  150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1% acetate), 0.2ml/min  
40%-98% A, over 18 min, 98% A for 2min

MS 条件: ESI<sup>-</sup>

## 結果

NphB、SCO7190 発現株では dimethylallyl daidzein と  $m/z$  の一致するピークが検出された。このピークは *in vitro* における SCO7190 とダイゼインの反応産物と一致した。しかし SCO7190 とダイゼインは反応効率が悪く、NMR による構造解析に足る量が得られないため、この反応産物の構造決定には至っていない。

NphB、SCO7190 (サイトゾル発現型)、TP-SCO7190 (プラスチド発現型)、N8DT のいずれを発現させた酵素でも  $m/z=337$  (M-H) の化合物が検出された。溶出時間の比較では 6-dimethylallyl genistein とは一致せず、SCO7190 とアピゲニンの反応産物と一致した。しかし SCO7190 とアピゲニンは反応効率が悪く、NMR 構造解析に足る量が得られないため、この反応産物の構造決定には至っていない。また、*in vitro* では NphB と DMAPP の反応産物は HPLC では検出できていないが NphB 発現株からも SCO7190 発現株と同じピークが検出された。また、dimethylallyl naringenin と一致する  $m/z=339$  (M-H) の化合物は検出されなかった。

さらに、NphB の反応産物として考えられる geranyl naringenin, geranyl apigenin, geranyl genistein, geranyl daidzein は検出されなかった。

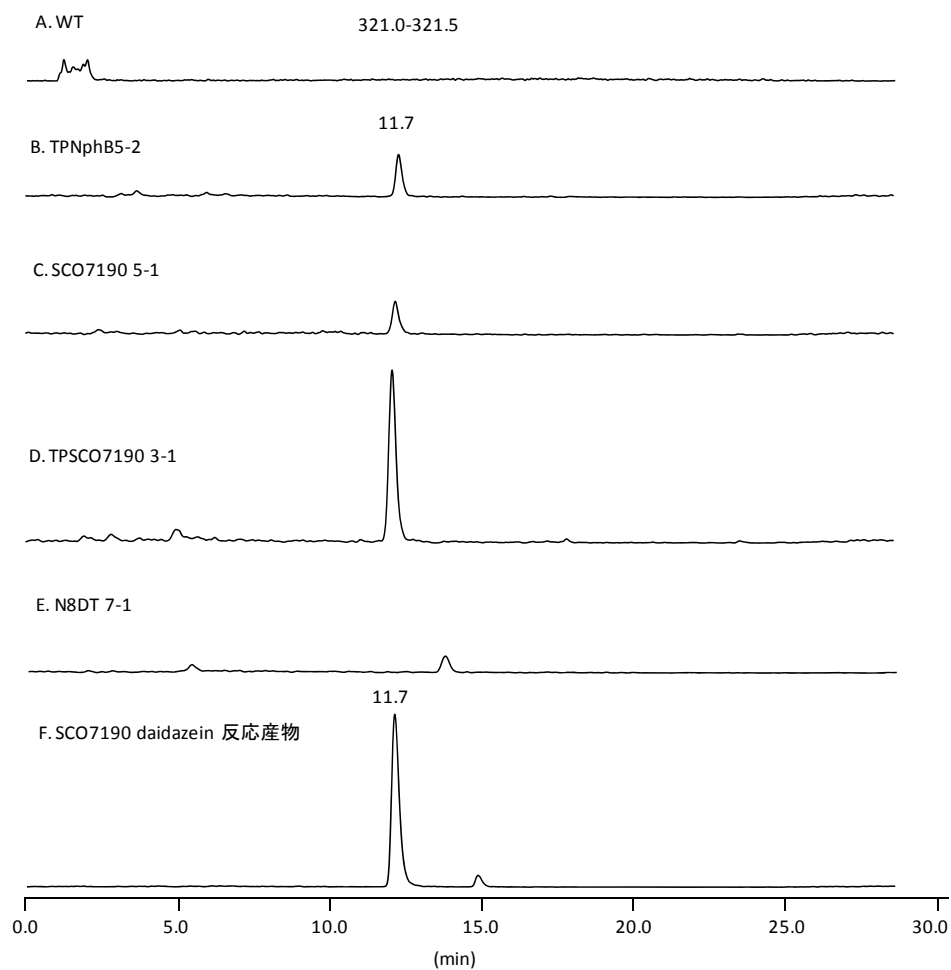


図 5-9 ダイズカルス抽出物の LC-MS 分析

$m/z=321.0-321.5$  のクロマトグラムを示す。A, 野生株; B, NphB 発現株 (プラスチドで発現); C, SCO7190 発現株 (サイトゾルで発現); D, SCO7190 発現株 (プラスチドで発現), E, N8DT 発現株 (サイトゾルで発現); F, SCO7190 とダイゼインの *in vitro* 反応産物。

ダイズカルスからは  $m/z=321.0-321.5$  のマスクロにおいてピークが検出された。このピークは *in vitro* で SCO7190 とダイゼインを反応させた反応産物に一致した。ただ、この化合物の構造は未知である。

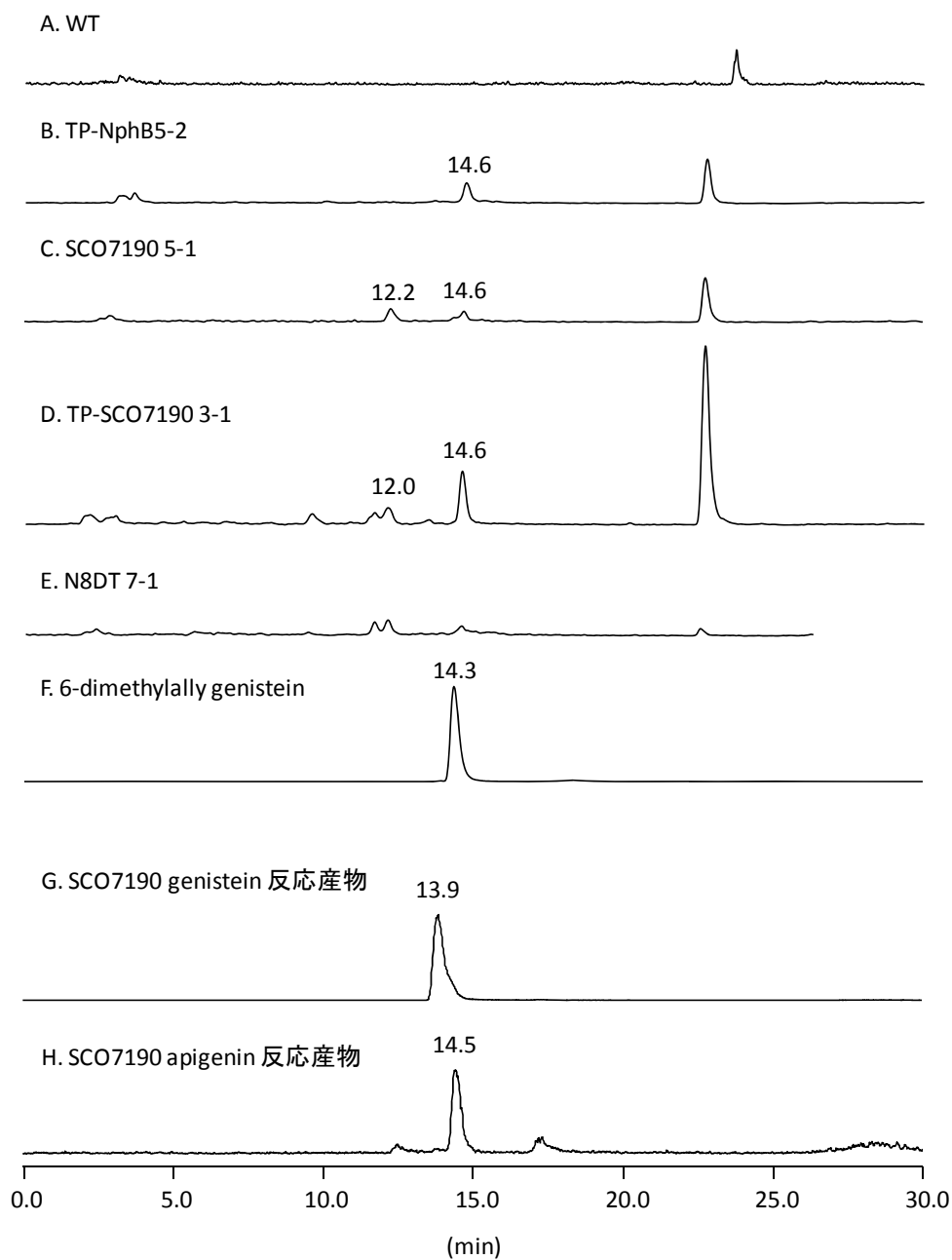


図 5-10 ダイズカルス抽出物の LC-MS 分析

$m/z=337.0-337.5$  のクロマトグラムを示す。A, 野生株; B, NphB 発現株 (プラスチドで発現); C, SCO7190 発現株 (サイトゾルで発現); D, SCO7190 発現株 (プラスチドで発現), E, N8DT 発現株 (サイトゾルで発現); F, 6-dimethylallyl genistein; G, SCO7190 とゲニステインの *in vitro* 反応産物; H, SCO7190 とアピゲニンの *in vitro* 反応産物.

ダイズカルスからは  $m/z=337.0-337.5$  のマスクロにおいてピークが検出された。このピークは *in vitro* で SCO7190 とアピゲニンを反応させた反応産物に一致した (図 5-7)。ただ、この化合物の構造は未知である。

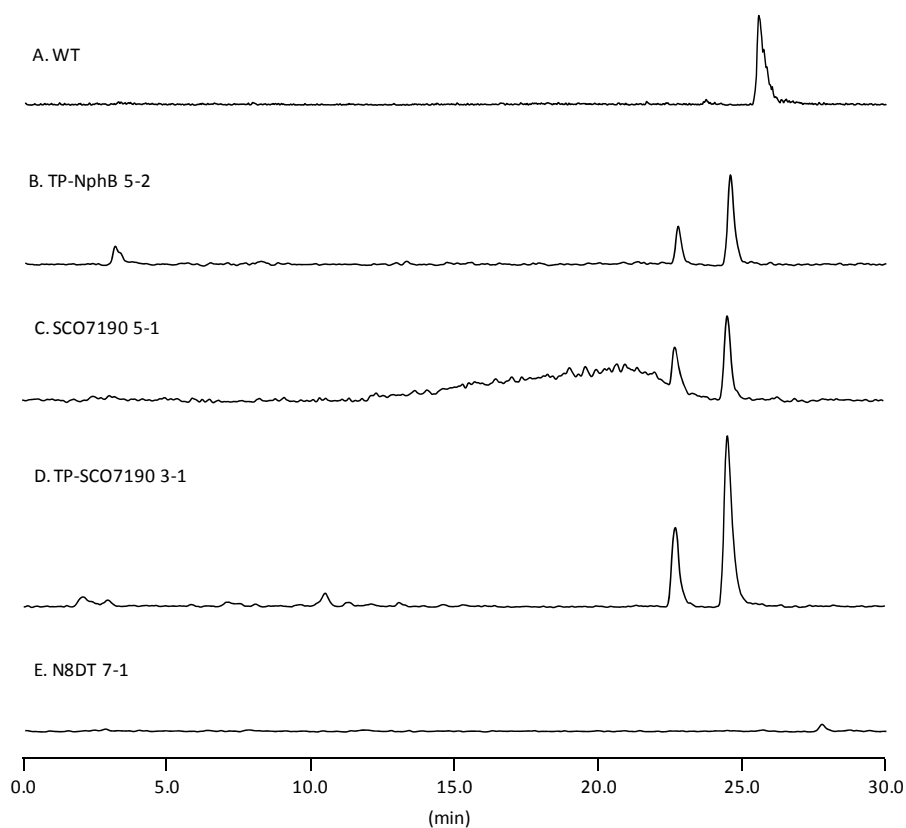


図 5-11 ダイズカルス抽出物の LC-MS 分析

$m/z=339.0-339.5$  のマスクロを示す。A, 野生株; B, NphB 発現株 (プラスチドで発現); C, SCO7190 発現株 (サイトゾルで発現); D, SCO7190 発現株 (プラスチドで発現), E, N8DT 発現株 (サイトゾルで発現).

いずれのサンプルからも dimethylallyl naringenin は検出されなかった。



## 第二項 形質転換ダイズ葉抽出物の解析

NphB または SCO7190 を発現させたダイズの葉の抽出物を LC-MS で分析した。

### 実験方法

サンプルは 100 mg Dry Weight/ml になるようにメタノールで抽出し 15000 rpm で遠心後上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過して調製されている。そのサンプルを 10 倍に希釈して 10  $\mu$ l を LC-MS で分析した。

LC 条件:

Column: 2.0  $\times$  150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, acetonitrile; B, water( +0.1 % acetate), 0.2ml/min  
40%-98% A over 18 min, 98% for 2min

MS 条件: ESI<sup>-</sup>

### 結果

NphB, SCO7190 発現株において 0.1 mM ナリンゲニンを添加することで dimethylallyl daidzein, dimethylallyl genistein と分子量の一致するピークが検出された。これらのピークは in vitro 反応の SCO7190 とダイゼイン、ゲニステインの反応産物とそれぞれ溶出時間が一致した。

SCO7190 は in vitro 反応では HPLC で分析した限りダイゼインやゲニステインとの反応産物は検出できなかったが今回 LC-MS で分析したところ反応産物が検出された。しかしその構造については反応効率が悪く NMR 測定に足る量が得られず未知である。

また、野生型ダイズにナリンゲニンを投与した場合も同じピークが検出された。したがってダイズ自身の酵素による変換もわずかに起こっている可能性がある。NphB に関して in vitro 反応では DMAPP との反応産物は検出されていない。さらに、NphB の反応産物として考えられる geranyl naringenin, geranyl apigenin, geranyl genistein, geranyl daidzein は葉でも検出されなかった。

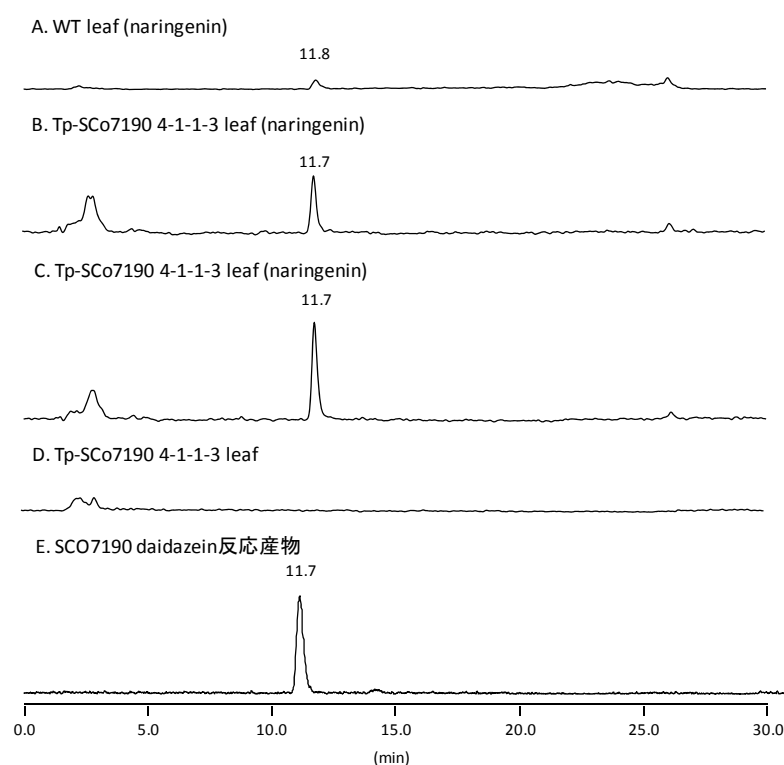


図 5-12 ダイズ葉抽出物の LC-MS 分析

$m/z=321.0-321.5$  のクロマトグラムを示す。A, 野生株 (+0.1 mM ナリンゲニン); B, NphB 発現株 (+0.1 mM ナリンゲニン); C, SCO7190 発現株 (+0.1 mM ナリンゲニン); D, SCO7190 発現株 (ナリンゲニン添加なし); E, SCO7190 とダイゼインの in vitro 反応産物

NphB, SCO7190 発現株で検出されたピークは in vitro で SCO7190 とダイゼインを反応させた反応産物に一致した。ただ、この化合物の構造は未知である。また、極微量 WT でも検出された。ナリンゲニンを添加しない場合はプレニルダイゼインと考えられるピークは検出されなかった。

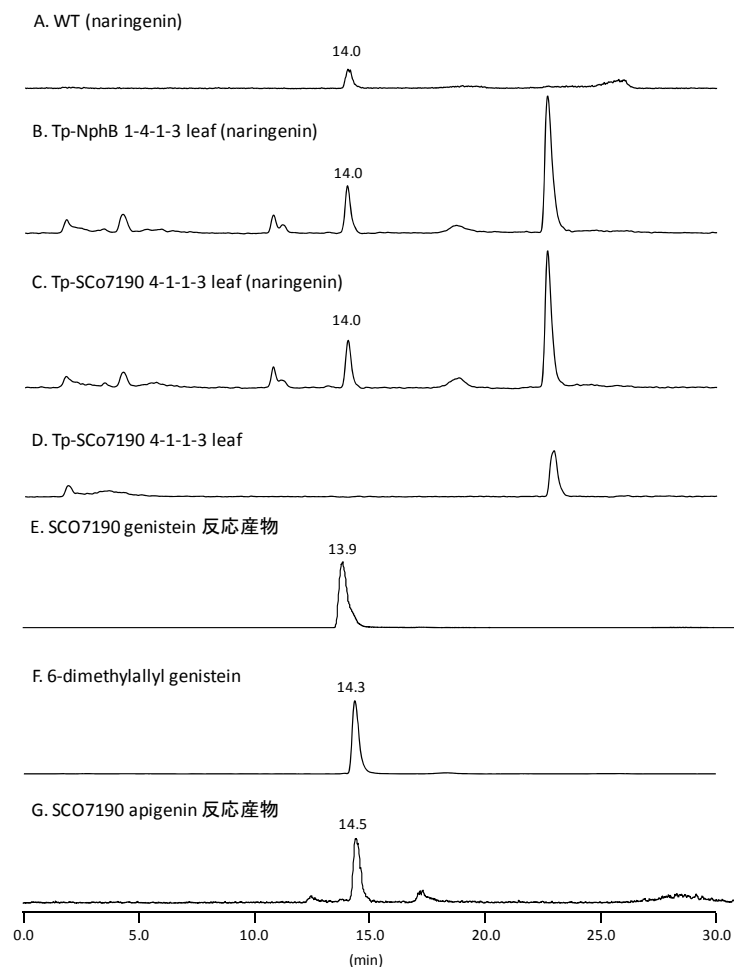


図 5-13 ダイズ葉抽出物の LC-MS 分析

$m/z=337.0-337.5$  のマスクロを示す。A, 野生株 (+0.1 mM ナリンゲニン); B, NphB 発現株 (+0.1 mM ナリンゲニン); C, SCO7190 発現株 (+0.1 mM ナリンゲニン); D, SCO7190 発現株 (ナリンゲニン添加なし); E, SCO7190 とゲニステインの *in vitro* 反応産物; F, 6-dimethylallyl genistein; G, SCO7190 とアピゲニンの *in vitro* 反応産物

NphB と SCO7190 発現株で検出されたピークは *in vitro* で SCO7190 とゲニステインを反応させた反応産物に一致した。ただ、この化合物の構造は未知である。また、量は少ないながら WT でも検出された。ナリンゲニンを添加しない場合はプレニルゲニステインと考えられるピークは検出されなかった。

### 第三項 まとめ

組換えダイズからは構造が既知のプレニル化化合物の検出はできなかった。カルス、葉の双方から prenyl daidzein, prenyl genistein を検出することができたがいずれも生産量は微量であった。これらは in vitro で SCO7190 とダイゼイン、ゲニステインを反応させたときの反応産物と LC-MS では一致したが HPLC では反応が確認できないくらい微量であるため NMR による構造決定はできていない。また、葉では、プレニル化化合物が野生株からも検出されてしまったことからダイズ自身の酵素による変換も起きている可能性がある。

表 5-2 ダイズ分析結果

Enzyme	カルス	葉
NphB	Prenyl daidzein Prenyl apigenin	Prenyl daidzein Prenyl genistein
SCO7190	Prenyl daidzein Prenyl apigenin	Prenyl daidzein Prenyl genistein
N8DT	8-prenyl naringenin	未分析

最近ダイズからも (-)-Glycinol をジメチルアリル化する酵素 G2DT と G4DT がクローニングされた[51]。これらの酵素が基質の添加により発現し、prenyl daizein や prenyl genistein を生産している可能性がある。今後、定量的にプレニル化化合物を測定し、酵素を導入したことによりどの程度プレニル化化合物生産量の増加が見込まれるのか検討したい。

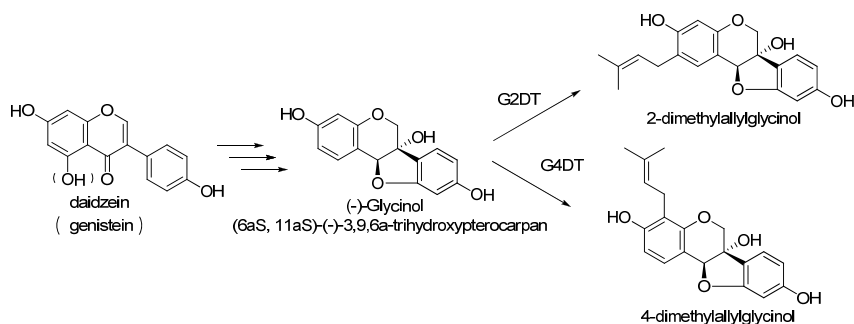


図 5-14 G2DT, G4DT の反応

## 第四節 形質転換トマト抽出物サンプルの分析

### 第一項 N8DT、SCO7190 発現株の分析

N8DT、SCO7190 を発現させたトマト (micro tom 種, money maker 種) の果実、果皮抽出物を LC-MS で分析した。形質転換体トマト抽出物はすべて京都大学生存圏研究所、矢崎一史教授の研究室から供与いただいた。

### 実験方法

サンプルは 100 mg Dry Weight / 1 ml になるようにメタノールで抽出し 15000 rpm で遠心後上清を 0.45  $\mu$ m のフィルターでろ過して調製されている。そのサンプルを 10 倍に希釈して 10  $\mu$ l を LC-MS で分析した。

LC 条件:

Column: 2.0  $\times$  150 mm (ODS, Senshu, Tokyo),

Solvent: A, acetonitrile; B, water (+0.1 % acetate)  
40%-98% A over 18 min, 98% for 2min, 0.2ml/min

Detector: MS (ESI)

### 結果

N8DT 発現株、SCO7190 発現株ともにトマトでは基質の添加なしでも prenyl naringenin と一致する化合物 ( $m/z=339.0$ ) が検出された。それぞれ標品と比較した結果 MT-N8DT 株、MM-N8DT 株では 8-dimethylallyl naringenin, MT-SCO7190 株では 3'-dimethylallyl naringenin と同定することができた。

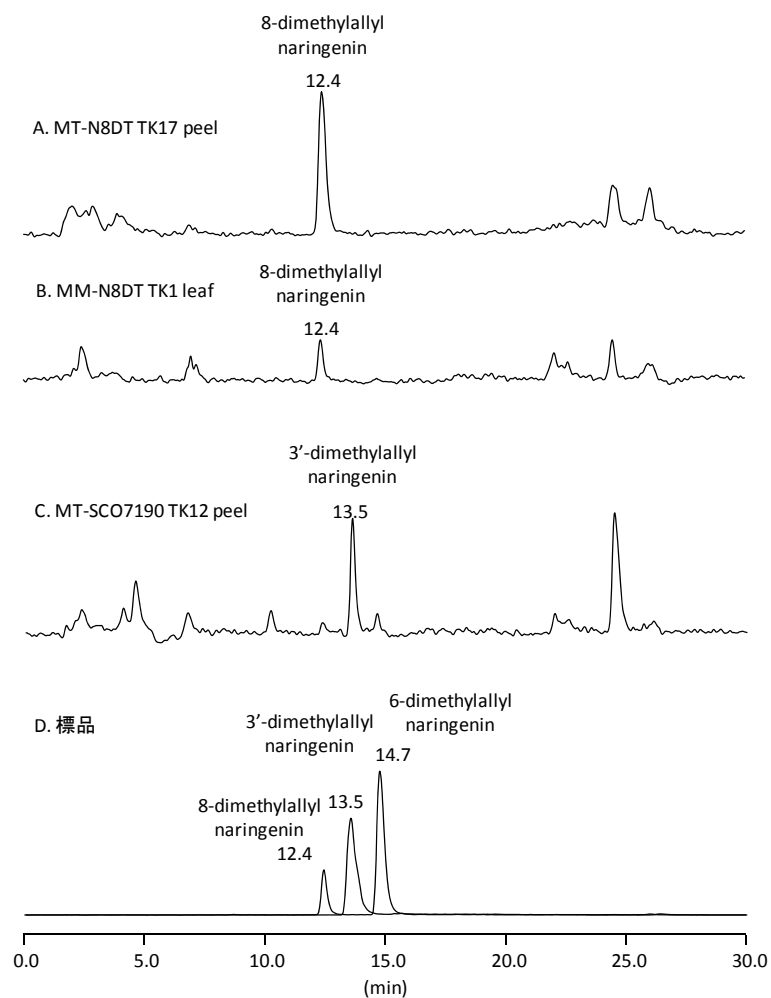


図 5-15 形質転換トマトの 抽出物の LC-MS 分析

$m/z=339.0-339.5$  のマスプロを示した。A, N8DT 発現株 (果皮); B, N8DT 発現株 (葉); C, SCO7190 発現株 (果皮); D, 標品 8dimethylallyl naringenin, 3'-dimethylallyl naringenin, 6-dimethylallyl naringenin. MT は Micro-Tom 種、MM は Money Maker 種。

標品と比較した結果、N8DT 発現株では 8-dimethylallyl naringenin と、SCO7190 発現株では 3'-dimethylallyl naringenin と一致した。

## 第二項 まとめ

トマトは基質の添加なしにプレニル化合物を生産していた。N8DT 発現株では予想通り 8-dimethylallyl naringenin が検出された。SCO7190 発現株については in vitro では 6-dimethylallyl naringenin を生産するが、トマトで異種発現した場合は予想に反して 3'-dimethylallyl naringenin が生産されていた。なぜ in vitro 反応と異なる反応産物が生成しているのかは不明である。

また、トマトには図 5-16 のように naringenin の約 100 倍の naringenin カルコンが存在していた。このことから naringenin カルコンを基質にできる酵素を利用すれば、より効率よくプレニル化合物の生産が行えると考えている。カルコンのプレニル化体は優れた抗酸化活性や抗ガン活性が報告されているので応用面からも期待される[52, 53]。

表 5-3 トマトの分析結果

形質転換体	fruits	peel	Leaves
MM-N8DT	8-dimethylallyl naringenin	8-dimethylallyl naringenin	8-prenyl naringenin (TK1)
MT-N8DT	8-dimethylallyl naringenin	8-dimethylallyl naringenin	未解析
MT-SCO7190	未解析	3'-dimethylallyl naringenin	未解析

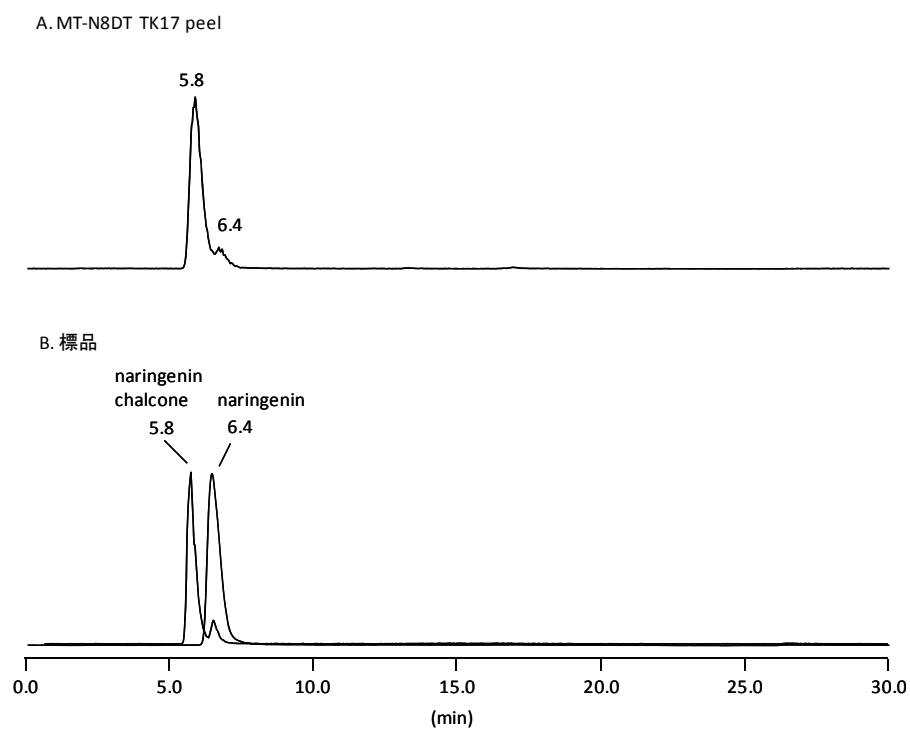


図 5-16 トマトサンプル中の naringenin および naringenin chalcone

$m/z=339.0-339.5$  のクロマトグラムを示した。A, N8DT 発現株; B, 標品 naringenin chalcone, naringenin. トマトにはナリンゲニンに対して 100 倍のナリンゲニンカルコンが蓄積していた。



## 第五節 考察

ミヤコグサはフラボノイドの生産自体が少なくプレニル化化合物は得られなかったが、プラスチドで発現させ、0.1 mM 基質 (ナリンゲニンまたはゲニステイン) を添加するとプレニル化化合物を生産することが明らかになった。G6DT AA2、G6DT AE37 では 6-geranyl genistein が検出でき、D9 (NphB 発現株)では 7-*O*-geranyl genistein、TP-SCO7190 C18 では 6-dimethylallyl naringenin, 6-dimethylallyl genistein が検出できた。今後はこれらのラインを中心に定量的な実験も行う必要がある。

また、ダイズはフラボノイドを多量に含んでおり、基質が豊富に存在するため、基質の投与なしで、プレニル化化合物の生産が期待されたが、ミヤコグサ同様プレニル化化合物の生産には0.1 mMの基質の添加が必要であった。この原因としてはNphBでは酵素のフラボノイドに対する  $K_m$  が 1 mM 程度と高いことが考えられる。また、ダイズ葉のサンプルでは野生型でも基質の投与によりプレニル化化合物の生産が観察されたことからダイズ自身の酵素によるプレニル化化合物の生産も起こっている可能性がある。最近、ダイズから(-)-Glycinol をジメチルアリル化する G4DT、G2DT がクローニングされた[51]。基質の添加により WT でもこのような酵素が働いている可能性がある。

トマトからは基質の添加なしでナリンゲニンのプレニル化化合物が得られた。この化合物は LC-MS で標品と比較した結果 3'-dimethylallyl naringenin であった。SCO7190 は in vitro では 6-dimethylallyl naringenin のみ合成するが、in vitro と異なる活性がトマトの異種発現酵素で検出されたことは興味深い。

いずれの場合も in vitro で合成した標品を用いることで微量な生産物の同定ができた。ただし、in vitro では反応しにくいものや、in vitro とは異なる反応産物が植物体では検出され、そういった化合物の同定が今後の課題である。また、定量実験を行うことで、よりプレニル化化合物の生産量の多い形質転換体のラインを選抜することも今後の課題である。

## 総 括

放線菌は多様な二次代謝産物を生産することが知られており、そのうちの一部はポリケタイド-テルペノイド融合化合物を合成する。*Streptomyces* sp. CL190 株の生産するナフテルピン[46]や *Streptomyces* sp. KO-3988 株の生産するフラキノシン[35]、*Streptomyces* sp. CNQ525 の生産するナピラジオマイシン[38]、*Streptomyces cinnamomensis* の生産するフラノナフトキノ[39]などが知られている。これら融合化合物の生合成遺伝子クラスターには複数の共通した遺伝子が見出され、そのうちの 하나가 THN 合成酵素 *rppA* ホモログである[22]。したがってポリケタイド部分は 5 分子の malonyl CoA から合成される THN に由来し、酸化やメチル化などの修飾を受けると考えられる。さらに、テルペノイド骨格の基質となるプレニル二リン酸合成酵素も共通して存在する。これまで、放線菌由来の低分子芳香族化合物を基質とするプレニルトランスフェラーゼは知られていなかったが、*Streptomyces roseochromogenes* より、クロロビオシン生合成酵素の一つとして *cloQ* がクローニングされた。*cloQ* は既知のプレニルトランスフェラーゼと相同性を示さなかったが、4-Hydroxyphenylpyruvate (4-HPP) に DMAPP 由来のジメチルアリル基を付加する活性を有していた。そして、上述したポリケタイド-テルペノイド融合化合物生合成遺伝子クラスターにも相同性は 20%程度と低いながら *cloQ* ホモログが共通して存在している。しかし、これら *cloQ* ホモログのプレニルトランスフェラーゼの生理的基質については、未知であった。そこで本研究ではナフテルピン生合成とフラキノシン生合成について、*nphB* 破壊株と *fur7* 破壊株からプレニルトランスフェラーゼの生理的基質の取得を目指した (第 1 章、第 2 章)。また、それらプレニルトランスフェラーゼの性状解析を行うとともに、寛容な基質特異性を利用してフラボノイドや植物ポリケタイドのプレニル化を試みた (第 3 章)。プレニル化フラボノイドやプレニル化植物ポリケタイドは抗菌、抗酸化、抗ガン、抗腫瘍などのすぐれた生物活性を有しているが天然には微量にしか存在せず有機合成も煩雑であり、簡便な合成法が求められている。

また、既知のプレニルトランスフェラーゼはすべて高度に保存された DDXXD モチーフを有し、基質のプレニル二リン酸の結合と反応に  $Mg^{2+}$  が必須である。しかし放線菌由

来のプレニルトランスフェラーゼではナフトルピン生合成酵素 NphB、ナピラジオマイシン生合成酵素 NapT9 は金属イオン依存性だがフラキノシン生合成酵素 Fur7、ナピラジオマイシン生合成酵素 NapT8 は非依存性であった。そこで、その違いに寄与するアミノ酸残基を明らかにすることを目指した (第 4 章)。最後に、放線菌由来プレニルトランスフェラーゼを用いて合成したプレニル化化合物を標品とすることで植物の抽出物に含まれる微量なプレニル化化合物の同定も試みた (第 5 章)。

## 第 1 章 フラキノシンの生合成および Fur7 の機能解析

第 1 章ではフラキノシン生合成遺伝子クラスターに含まれるプレニルトランスフェラーゼ Fur7 の生理的基質の同定を行った。Fur7 の生理的基質は *fur7* 破壊株培養上清から単離することができ、構造解析の結果 5,7-dihydroxy 2-methoxy 3-methylnaphthalene-1,4-dione (2-methoxy 3-methyl flaviolin) であった (図)。このことからポリケタイド基質は Fur7 によるプレニル化の前にメチル化されることが判明した。一方でフラキノシンの部分構造である 2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (flaviolin) を基質に反応を行ったところ、フラキノシンではメチル基で置換されている 3 位の炭素にプレニル基が付加した。このことからメチル化がプレニル化の前に起きることによって正しい位置にプレニル基が付加するように酵素との結合状態が変化すると考えられた。また、2-methoxy 3-methyl flaviolin と Fur7 を反応させることで 6-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl) 5,7-dihydroxy 2-methoxy 3-methylnaphthalene 1,4-dione (fur-P1) が合成された。fur-P1 を *fur7* 破壊株に与えたところフラキノシンの生産が回復したことから、fur-P1 が生合成中間体であることを証明することができた。

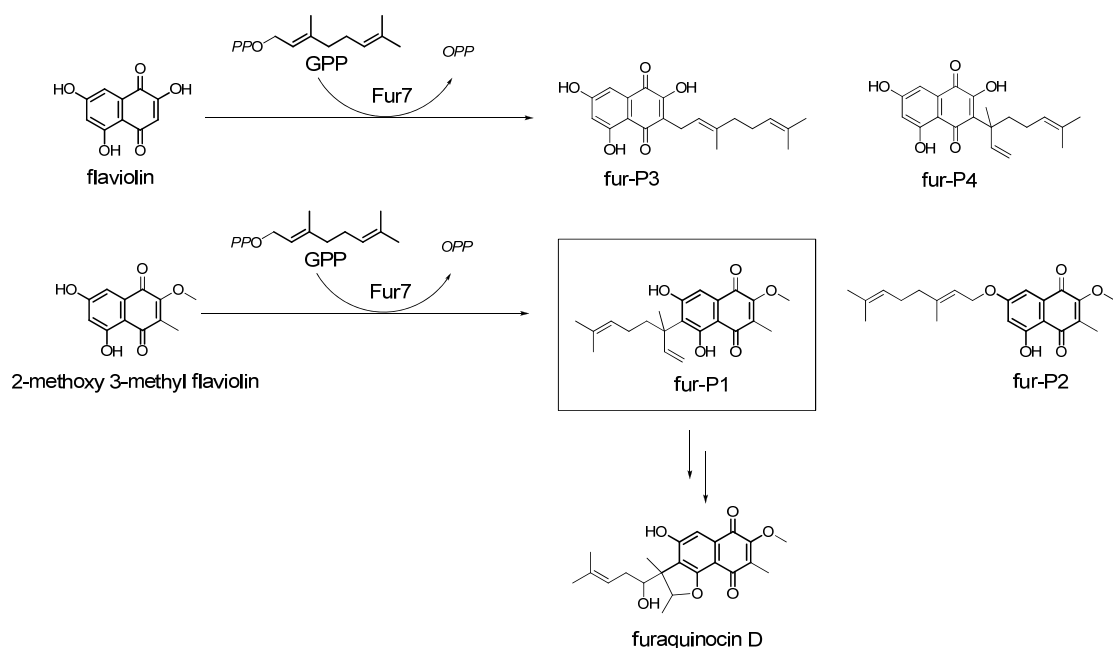


図 1 Fur7 の生理的基質および、フラキノシン生合成中間体

## 第 2 章 ナフテルピンの生合成

第 2 章ではナフテルピン生合成遺伝子クラスターに含まれるプレニルトランスフェラーゼ NphB の生理的基質の同定を目指した。基質の同定には至らなかったが、*nphB* 破壊株培養液と NphB を反応させることで、培養液中に存在していた生理的基質が NphB によってゲラニル化されたと考えられる *nph*-P3 を単離した。*nph*-P3 を *nphB* 破壊株培養液に加えたところナフテルピンの生産が回復したことから、*nph*-P3 がナフテルピン生合成中間体であることが明らかになった。ナフテルピンのテルペノイド部分は *cis* 型であるが、*nph*-P3 はテルペノイド側鎖は *trans* 体であったことから異性化酵素の存在が予測されるが相同性検索からはそのような活性をもつ酵素の特定はできなかった。今後は *nph*-P3 を基質に異性化酵素や環化酵素に関する研究を行うことが考えられる。また、副反応産物として *nph*-P1、*nph*-P2 が単離され、その構造から NphB がカルボニルの付け根の炭素と反応することが示唆された。

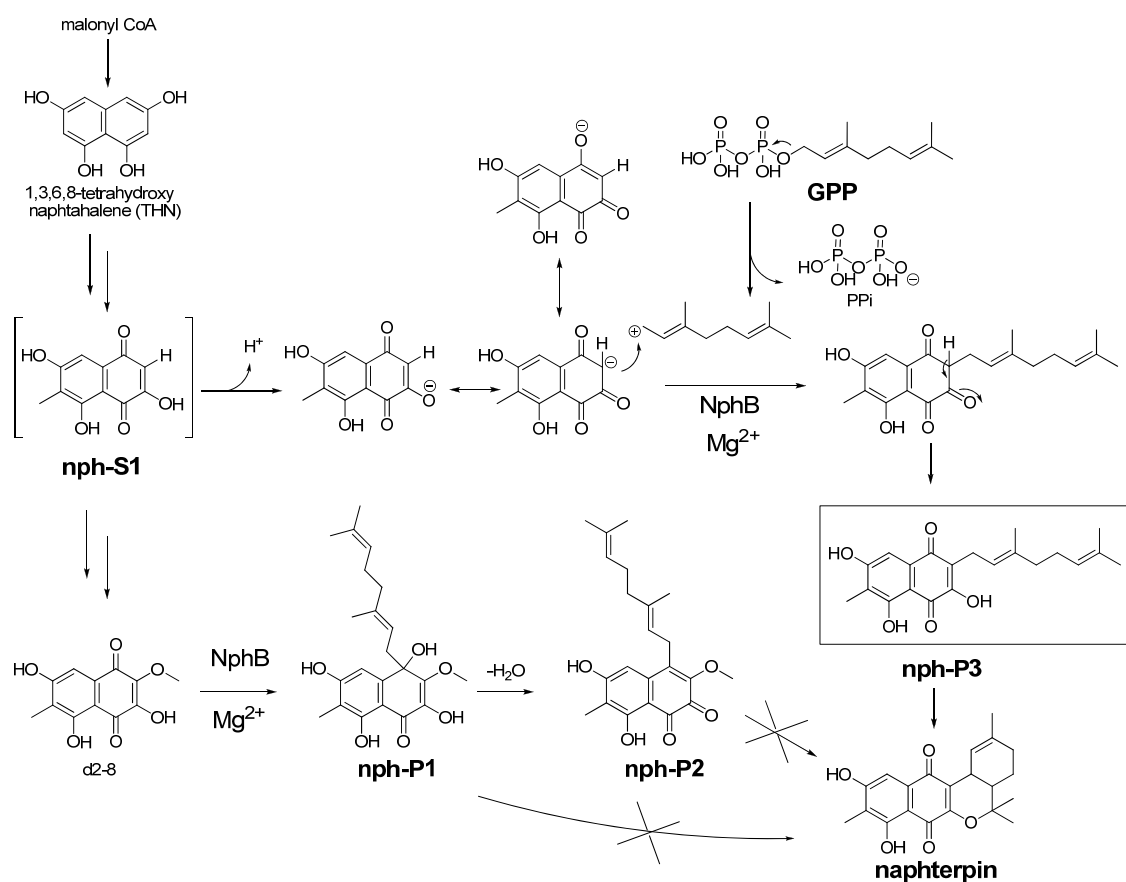


図 II NphB の推定反応機構とナフテルピン生合成中間体

### 第 3 章 プレニルトランスフェラーゼを利用したプレニル化化合物の合成

NphB、Fur7 と *Streptomyces coelicolor*A3(2) 由来の NphB ホモログ SCO7190 を用いて dihydroxy naphthalene (DHN) やフラボノイド、植物由来ポリケタイドのプレニル化を行った。その結果 NphB では 1,6-DHN, 2,7-DHN, フラボノイドであるナリンゲニン、アピゲニン、ゲニステイン、ダイゼイン、植物由来ポリケタイドであるオリベトールとレスベラトロールをゲラニル化することができた。また、Fur7 は 1,3-DHN, 2,7-DHN, resberatrol をプレニル化したがフラボノイドに対しては活性が検出できなかった。SCO7190 は 1,6-DHN, 2,7-DHN, ナリンゲニン、オリベトール、レスベラトロールに対して炭素数 5 のジメチルア

リル基を付加した。いずれの酵素もプレニル基を付加する位置は水酸基のオルト位か水酸基の酸素原子であった。今回合成したプレニル化合物の中には新規化合物も複数含まれており、基質特異性の寛容な酵素による化合物合成が新規化合物の合成という点で非常に簡便であり有用であることを示すことができた。

#### 第 4 章 変異酵素の作製と機能解析

ポリケタイド-テルペノイド生合成を行う放線菌由来プレニルトランスフェラーゼの中で NphB と NapT9 が  $Mg^{2+}$  依存性であり Fur7 と NapT8 は非依存性であった。アラインメントと NphB の結晶構造、Fur7 のモデリングから、この金属イオン依存性を決定するアミノ酸残基を NphB の S51, S64, Fur7 の R53, R67 であると予測し、NphB (S51R), NphB (S64R), NphB (S51R, S64R), Fur7 (R53S), Fur7 (R67S), Fur7 (R53S, R67S) を作製して活性を測定した。その結果 Fur7 (R53S, R67S) では  $Mg^{2+}$  への依存性が高くなり、NphB (S51R) では  $Mg^{2+}$  非存在下でもナリンゲニンに対して活性が検出された。 $Mg^{2+}$  依存性の酵素では  $Mg^{2+}$  によってプレニル二リン酸のジリン酸基でヘテロリシスが起こり、プレニルカチオンが生じて反応すると考えられているが、Fur7 ではアルギニン残基が  $Mg^{2+}$  の代わりを果たしていると考えらる。また、Y121 も NphB と NapT9 で保存され、Fur7 と NapT8 ではともにトリプトファンに置換されていたが NphB (Y121W)、Fur7 (W123Y) はともに金属イオン依存性に変化は観察されなかった。しかし、Fur7 (W123Y) ではプレニルカチオンの 3 級カチオンと反応する活性が減少し、1 級カチオンと反応する活性が増大していた。このことから W123 は 3 級カチオンの安定化に、Y121 は 1 級カチオンの安定化に寄与しているのではないかと考えられた。

## 第5章 形質転換体植物の生産するプレニル化化合物の同定

ミヤコグサ、ダイズ、トマトへ植物由来の N8DT、G6DT、放線菌由来の NphB、SCO7190 を導入し、形質転換体の抽出物を LC-MS で分析して、プレニル化化合物の同定を行った。抽出サンプルはすべて京都大学生存圏研究所、矢崎一史先生の研究室から供与していただいた。ミヤコグサでは N8DT 発現株で 8-dimethylallyl naringenin、G6DT 発現株で 6-dimethylallyl genistein、NphB 発現株で 7-*O*-geranyl genistein、SCO7190 発現株で 6-dimethylallyl genistein と 6-dimethylallyl naringenin が検出された。いずれの場合も基質として 0.1 mM のナリンゲニン、ゲニステインをシリンジで葉に直接添加した。添加しない場合はプレニル化化合物は検出できなかった。ダイズでは NphB、SCO7190、N8DT 発現株を分析した。ダイズ中にはダイゼインやゲニステインなどフラボノイドが多数存在するのでプレニル化化合物の生産が期待された。NphB や SCO7190 発現株のカルスで dimethylallyl apigenin と考えられる化合物が検出されたが葉からの抽出サンプルではプレニル化化合物を検出出来なかった。しかし、ダイズの葉でもミヤコグサと同様に 0.1 mM のナリンゲニンの添加により dimethylallyl daidzein や dimethylallyl genistein と考えられる化合物が検出された。これらはいずれも野生型のダイズでも検出されダイズに内在性の酵素によっても反応が起こっている可能性が示唆された。

トマトについては SCO7190、N8DT 発現株を分析し、SCO7190 発現株からは 3'-dimethylallyl naringenin が、N8DT 発現株からは 8-dimethylallyl naringenin が検出された。トマトでは基質の添加なしにこれらのプレニル化合物が検出できた。また、*in vitro* 反応では SCO7190 の反応産物は 6-dimethylallyl naringenin のみであるのでトマトで発現させたことによって *in vitro* では合成できない 3'-dimethylallyl naringenin が生産されたことは興味深い。



いずれの場合も *in vitro* で合成した標品を用いることで微量な生産物の同定ができた。ただし、*in vitro* では反応しにくいものや、*in vitro* 反応とは異なる反応産物が植物体では検出され、そういった化合物の同定が今後の課題である。また、定量実験を行うことで、よりプレニル化化合物の生産量の多い形質転換体のラインを選抜することも今後の課題である。

## 実 験 項

## 放線菌の培養、抽出、分析

### TSB 培地 (pH 7.3)

Pancreatic digest of casein	17.0 g
Papaic digest of soybean meal	3.0 g
NaCl	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5 g
Glucose	2.5g/L

### SKII 培地

Soluble starch	20 g
Yeast extract (エビオス)	5g
Poly peptone	3 g
Meat extract (魚肉)	3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.6 g/L

煮沸して Soluble starch を溶かしたあと NaOH で pH 7.6 に調整しオートクレーブ。

### KG 培地

Glucose	25 g
Soy bean	15 g
Dry yeast	2 g
CaCO <sub>3</sub>	4 g/L

HCl で pH 6.2 に調整後オートクレーブ。

#### NMMP 培地

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
Difco Casaminoacids	5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.6 g
PEG6000	50 g
Trace element *	1 ml/800 ml

オートクレーブ後に以下を培地 80 ml に対して添加

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> buffer (0.1 M, pH6.8)	15 ml
Sucrose (20%)	2.5 ml

#### 【放線菌の培養】

放線菌は SKII 培地または TSB 培地を大試験管に 10 ml 分注しバネを入れて 2 日間 30℃ で前培養した。それを、500 ml のバッフルつき三角フラスコに分注された KG 培地や NMMP 培地 100 ml に 2 ml 植菌し、3 日間 30℃ で本培養を行った。

#### 【放線菌培養液からの抽出】

培養終了後、培養液を遠心 (5000 rpm、10 min) し、培養上清、菌体に分離してそれぞれに抽出操作を行った。培養上清は等量の酢酸エチルで 2 回抽出した後、酢酸エチル層を取り、硫酸ナトリウムで脱水した。次に、エバポレーターで酢酸エチルを留去して、残渣をメタノールに溶解し、0.45 μm のフィルターでろ過して HPLC で分析した。

一方、菌体は 2 倍量のアセトンを加え、10 時間静置した後、抽出液をろ過して菌体を除き、エバポレートしてアセトンを除いた。このとき、残渣、および水が残る。そこに酢酸エチルを加え 2 回抽出を行い培養上清と同様にサンプルを調製し、HPLC にて分析した。

## 放線菌の形質転換

### TSB 培地 (pH 7.3)

Pancreatic digest of casein	17.0 g
Papaic digest of soybean meal	3.0 g
NaCl	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.5 g
Glucose	2.5g/L

### YEME 培地

Yeast extract	3 g
Poly Peptone	5 g
Malt extract	3.0 g
Glucose	10 g
Sucrose	340 g/L

20% glycine    25 ml

2.5 M MgCl<sub>2</sub>    2 ml

#### R2YE 培地

Sucrose	103 g
Glucose	10 g
Yeast extract	5 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.25 g
MgCl <sub>2</sub>	0.1 g
Casamino acid	10.12 g
Trace element*	2 ml
TES	5.73 g/850 ml
Agar	22 g

オートクレーブ後に以下を混合

0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	10ml
5M CaCl <sub>2</sub>	4 ml
20% proline	15 ml
1N NaOH	7 ml

#### P Buffer

Sucrose	10.3 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.025 g
MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.202 g
Trace element*	0.2 ml/80 ml

オートクレーブ後に以下を混合

0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 ml
3.68% CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 ml
5.73% TES Buffer (pH 7.2)	10 ml

\*Trace element

ZnCl <sub>2</sub>	40 mg
FeCl <sub>3</sub> 6H <sub>2</sub> O	200 mg
CuCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	10 mg
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	10 mg
NaB <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 10H <sub>2</sub> O	10 mg
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4H <sub>2</sub> O	10 mg/L

【放線菌 *Streptomyces albus* プロトプラストの作製】

1. TSB プレートに *S. albus* を植菌し 30°C で培養しシングルコロニーを TSB 培地に植菌し、30°C で 2 日間培養する。
2. TSB 培地から YEME 培地に 1%植菌し、30°C で 3~5 日間培養する。
3. 培養液 50 ml を 10.3%スクロース溶液で 2 倍に希釈する。
4. 4000 rpm 10 分遠心し、上清を捨てて菌体をさらに 0.3%スクロース溶液 30 ml に懸濁する。
5. 4000 rpm 10 分遠心し、上清を捨てて菌体を P Buffer 10 ml で懸濁する。
6. Lysozyme 20mg を P Buffer 10 ml に溶解し、0.45 μm のフィルターでろ過滅菌しながら菌体溶液に加え、30°C で 30~60 分インキュベートする。
7. 顕微鏡でプロトプラスト化しているのを確認する。
8. 綿せんをしたロートでろ過する。(2 回)
9. 4000 rpm 10 分遠心し上清を捨てて 1 ml の P Buffer に懸濁し、100 μl ずつエッペンに分注する。保存は-80°C で行う。

### 【放線菌の形質転換】

1. プロトプラストに DNA 5  $\mu$ l を加える。
2. PEG1000 1 g に P Buffer 3 ml を加えた溶液 500  $\mu$ l をプロトプラストに加え、1 分間静置する。
3. P Buffer を 5 ml 加える。
4. 遠心分離後、P Buffer 1 ml を加えて懸濁し、R2YE プレートに植菌して 30°C で培養する。
5. 培養 12~24 時間後にチオストレプトンをプレート枚数×1 ml の滅菌水に溶解し、重層する。
6. さらに 30°C で 2~5 日培養し出てきたコロニーを 30  $\mu$ g/ml チオストレプトンを含む TSB 培地に植継ぐ。



## 組換えタンパク質操作

### LB 培地

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
NaCl	5g/L

### LB 寒天培地

#### LB 培地

Bacto agar	15 g
------------	------

### TB 培地

Bacto tryptone	10 g
Bacto yeast extract	5 g
Glycerol	5.04 g
*KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.31 g
*K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	12.54 g/L
*別滅菌	

## Lysis Buffer

Wash Buffer(下記)に Tween 20 を 1% (v/v) 加える。

## Wash Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

0.5 M NaCl

20% (w/v) glycerol

20 mM Imidazole (pH 8.0)

milliQ water

## Elution Buffer

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

0.5 M NaCl

20% (w/v) glycerol

250 mM Imidazole (pH 8.0)

milliQ water

## 透析液

50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

0.1 M NaCl

10 mM 2-mercaptoethanol

milliQ water

### 【組換えタンパクの発現】

目的タンパクの遺伝子がクローニングされた大腸菌用発現ベクターpHis8 で *E. coli* BL21 (DE3) をトランスフォームした。これを 50 µg/ml のカナマイシンを含む LB 寒天培地に植菌し、37°C で 14 時間培養した。得られたコロニーを 50 µg/ml のカナマイシンを含む LB 培地に植菌し、37°C で 14 時間前培養を行った。

次に坂口フラスコに入った 50 µg/ml のカナマイシンを含む TB 培地 100 ml に、前培養した菌体液を 2 ml 加え本培養を行った。本培養は 37°C で約 2 時間 30 分培養し、OD<sub>600</sub>=1.5 になった後、坂口フラスコを氷水中で 10 分間冷やし、コールドショックを与え、終濃度 0.5 mM になるように IPTG を添加した。そして、18°C で 20 時間培養し、組換えタンパク質を発現した *E. coli* BL21 (DE3) を得た。

### 【組換えタンパクの精製】

まず、培養液を 5000 rpm で 10 分間遠心して集菌した。これを Lysis Buffer に懸濁し、超音波破碎した。破碎液を 16000 rpm で 20 分間遠心し、上清を Ni-NTA agarose (QIAGEN) カラムに通した。上清が全てカラムを通った後 Wash Buffer をカラム担体の 5 倍量流し非特異的にカラムに結合したタンパクを洗い流した。続いて Elution Buffer を同じくカラム担体の 5 倍量流し目的の組換えタンパク質を溶出した。ここに His-tag を切断するための Thrombin を終濃度 4 U/ml になるように加え、そのまま半透膜に入れて一晚透析を行った。

透析終了後、切断された His-tag を除くため再度 Ni-NTA agarose カラムを通した。続いて Thrombin を除くため Benzamidine Sepharose<sup>TM</sup> 6B (Amersham Biosciences) カラムを通した。最後にこの酵素液を Vivaspin (10 kDa molecular weight cut off) を用いて濃縮し、Protein assay (Bio-Rad) を用いてタンパク質濃度の定量を行った。また、各段階のサンプルを SDS-PAGE に供し精製度合いを確認した。

## プレニル化反応産物の抽出、分析

### 【抽出、TLC、HPLC による分析】

プレニル化反応終了後、反応液に等量の酢酸エチルを加え 3 回抽出操作を行った。酢酸エチル層を回収し硫酸ナトリウムを加え、2 時間置いて脱水し、エバポレーターで酢酸エチルをとばした。残渣をメタノールに溶解して 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターでろ過し、シリカゲル TLC または HPLC にて反応産物を確認した。シリカゲル TLC の展開溶媒はクロロホルム:メタノール=15:1 程度で適宜調節し、展開後 UV またはリンモリブデン発色により反応産物を検出した。HPLC 条件は結果に併記した通りである。反応産物は HPLC を用いて精製し、溶媒を乾固後、 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$  で保存した。

### 【HRMS and NMR analysis】

HPLC にて精製した化合物はエバポレーターで乾固し、サンプルバイアル (15 mm  $\times$  50 mm) に移し、NMR 測定用の重溶媒に溶かして NMR を測定した。

NMR 測定後、溶媒を乾固させ、再度 HPLC グレードのメタノールに溶解し、HRMS を測定した。

## 本研究で使用した機器

ESI-MS (HR-MS)	JEOL The Accu TOF JMS-T100LC
LC-MS/MS	Applide Biosystems API3000
HPLC カラム	Senshu Pak Pegasil ODS $2.0 \times 150$ mm
	Senshu Pak Pegasil ODS $4.6 \times 250$ mm
	Senshu Pak Pegasil ODS $20 \times 250$ mm
NMR	JEOL Superconducting Magnet 600 MHz
	$^1\text{H}$ NMR, 600 MHz, $^{13}\text{C}$ NMR, 150 MHz

## 本研究で使用した大腸菌

### *E. coli* BL21 (DE3)

F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*, (*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3)

### *E. coli* DH5 $\alpha$

*deoR*, *endA1*, *gyrA96*, *hsdR17* (*r<sub>k</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>k</sub>*<sup>-</sup>), *phoA*, *recA1*, *relA1*, *supE44*, *thi-1*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169,  $\phi$ 80*dlacZ* $\Delta$ M15, F<sup>-</sup>,  $\lambda$ <sup>-</sup>

## 本研究で使用した大腸菌用ベクター

Plasmid	Description	reference or source
pT7blue	<i>E.coli</i> cloning vector; Amp <sup>r</sup> ; pUCori	Novagen
pETDuet-1	<i>E.coli</i> coexpression vector; Amp <sup>r</sup> ; pBR322ori	Novagen
pHis8	<i>E.coli</i> expression vector; Kan <sup>r</sup> ; pBR322ori	[54]
pACYCDuet-1	<i>E.coli</i> coexpression vector; Cm <sup>r</sup> ; p15Aori	Novagen
pET28a	<i>E.coli</i> expression vector; Kan <sup>r</sup> ; pBR322ori	Novagen
pWHM3	<i>Streptomyces-E.coli</i> shuttle vector; Thiostrepton <sup>r</sup> , Amp <sup>r</sup>	[55]

## HRMS、NMR の測定結果

(E)-3-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl)-2,5,7-trihydroxynaphthalene-1,4-dione (fur-P3) was converted from flaviolin by recombinant Fur7.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub> (*M*<sup>-</sup>), 341.13890; found 341.13531. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.47 (s, 3H, H-10'), 1.53 (s, 3H, H-8'), 1.64 (s, 3H, H-9'), 1.85 (m, 2H, H-4'), 1.95 (m, 2H, H-5'), 3.01 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-1'), 4.98 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-6'), 5.07 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-2'), 6.41 (s, 1H, H-6), 6.81 (s, 1H, H-8), 13.60 (s, 1H, C-5-OH), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 16.6 (C-9'), 18.1 (C-10'), 22.0 (C-1'), 26.1 (C-8'), 26.8 (C-5'), 39.9 (C-4'), 107.6 (C-8), 108.7 (C-4a), 108.7 (C-6), 108.9 (C-8a), 120.1 (C-3), 122.8 (C-2'), 124.8 (C-6'), 131.3 (C-7'), 134.7 (C-3'), 162.2 (C-2), 162.9 (C-7), 163.3 (C-5), 183.2 (C-1), 189.9 (C-4).

3-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl) 2,5,7-trihydroxynaphthalene 1,4-dione (fur-P4) was converted from flaviolin by recombinant Fur7.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>O<sub>5</sub> (*M*<sup>-</sup>), 341.13890; found 341.14055. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.41 (s, 3H, H-7'), 1.44 (s, 3H, H-10'), 1.49 (s, 3H, H-7'), 1.72 (m, 1H, H-2'), 1.83 (m, 2H, H-3'), 1.99 (m, 1H, H-2'), 4.76 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H, H-9'), 4.82 (d, *J* = 18.0 Hz, 1H, H-9'), 4.98 (t, *J* = 6.8 Hz, 1H, H-4'), 6.22 (dd, *J* = 10.3, 18.0 Hz, 1H, H-8'), 6.45 (s, 1H, H-6), 6.84 (s, 1H, H-8), 13.18 (s, 1H, C-5-OH), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 17.9 (C-7'), 24.1 (C-3'), 25.9 (C-7'), 26.5 (C-10'), 40.8 (C-2'), 44.2, (C-1'), 107.0 (C-8), 108.7 (C-6), 109.0 (C-4a), 109.2 (C-9'), 124.0 (C-3), 125.6 (C-4'), 130.8 (C-5'),

131.7 (C-8a), 149.2 (C-8'), 159.8 (C-2), 163.0 (C-7), 163.4 (C-5), 182.3 (C-1), 190.0 (C-4).

(E)-3-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyl) 2,5,7-trihydroxynaphthalene 1,4-dione (fur-P5) was converted from flaviolin by recombinant Fur7.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.64 (s, 3H, H-5'), 1.74 (s, 3H, H-4'), 3.17 (d,  $J = 6.8$  Hz, 2H, H-1'), 5.14 (m, 1H, H-2'), 6.46 (s, 1H, H-6), 6.96 (s, 1H, H-8)

3-(3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-yl) 2,5,7-trihydroxynaphthalene 1,4-dione (fur-P6) was converted from flaviolin by recombinant Fur7.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.52 (s, 6H, H-4', H-5'), 6.24 (dd,  $J = 10.9, 16.5$  Hz, 1H, H-2'), 6.47 (s, 1H, H-6), 6.96 (s, 1H, H-8)

4-geranyl 1,6-DHN was converted from 1,6-DHN by recombinant NphB.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.50 (s, 3H, H-10'), 1.54 (s, 3H, H-8'), 1.84 (s, 3H, H-9'), 1.94 (m, 2H, H-4'), 2.03 (m, 2H, H-5'), 3.67 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H-1'), 5.00 (m, 1H, H-6'), 5.14 (m, 1H, H-2'), 6.51 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, H-2), 6.97 (m, 2H, H-3, H-7), 7.17 (s, 1H, H-5), 8.05 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-8)

5-geranyl 1,6-DHN was converted from 1,6-DHN by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub> (*M*<sup>-</sup>), 295.16980; found 295.17000. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.50 (s, 3H, H-10'), 1.54 (s, 3H, H-8'), 1.84 (s, 3H, H-9'), 1.94 (m, 2H, H-4'), 2.03 (m, 2H, H-5'), 3.67 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1'), 5.00 (m, 1H, H-6'), 5.14 (m, 1H, H-2'), 6.58 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-2), 6.97 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-7), 7.16 (dd, *J* = 8.3, 7.6 Hz, 1H, H-3), 7.27 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-4), 7.91 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-8)

2-geranyl 1,6-DHN was converted from 1,6-DHN by recombinant NphB.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.50 (s, 3H, H-10'), 1.54 (s, 3H, H-8'), 1.84 (s, 3H, H-9'), 1.94 (m, 2H, H-4'), 2.03 (m, 2H, H-5'), 3.67 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1'), 5.00 (m, 1H, H-6'), 5.14 (m, 1H, H-2'), 6.98 (m, 2H, H-3, H-7), 7.05 (m, 2H, H-4, H-5), 8.05 (m, 1H, H-8)

1-geranyl 2,7-DHN was converted from 2,7-DHN by recombinant NphB and Fur7.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub> (*M*<sup>-</sup>), 295.16980; found 295.16599. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.50 (s, 3H, H-10), 1.53 (s, 3H, H-8'), 1.85 (s, 3H, H-9'), 1.95 (m, 2H, H-4'), 2.03 (m, 2H, H-5'), 3.62 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1'), 5.01 (m, 1H, H-6'), 5.15 (m, 1H, H-2'), 6.81 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-6), 6.86 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-3), 7.10 (s, 1H, H-8), 7.42 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-5), 7.55 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-4)



1,6-digeranyl 2,7-DHN was converted from 2,7-DHN by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>30</sub>H<sub>39</sub>O<sub>2</sub> (*M*<sup>-</sup>), 431.29500; found 431.29322. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.45 (s, 3H, H-10'), 1.47 (s, 3H, H-8'), 1.58 (s, 3H, H-10''), 1.68 (s, 3H, H-8''), 1.69 (s, 3H, H-9'), 1.83 (s, 3H, H-9''), 1.92 (m, 2H, H-5'), 2.00 (m, 2H, H-4'), 2.04 (m, 2H, H-5''), 2.10 (m, 2H, H-4''), 3.59 (m, 2H, H-1'), 3.60 (m, 2H, H-1''), 5.01 (m, 2H, H-6'), 5.38 (m, 2H, H-6''), 6.86 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-3), 7.11 (s, 1H, H-8), 7.35 (s, 1H, H-4), 7.35 (m, 1H, H-5)

6-geranyl naringenin was converted from naringenin by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub> (*M*<sup>-</sup>), 407.18515; found 407.18454. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.48 (s, 3H, H-10''), 1.55 (s, 3H, H-8''), 1.65 (s, 3H, H-9''), 1.85 (m, 2H, H-4''), 1.94 (m, 2H, H-5''), 2.63 (dd, *J* = 17.2, 2.8 Hz, 1H, H-3eq), 3.07 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1''), 3.16 (dd, *J* = 17.2, 13.1 Hz, 1H, H-3ax), 4.99 (m, 1H, H-6''), 5.08 (m, 1H, H-2''), 5.34 (dd, *J* = 13.1, 2.8 Hz, 1H, H-2), 5.91 (s, 1H, H-8), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.26 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-2', H-6'), 9.64 (br, s, C-4'-OH), 12.39 (s, 1H, C-5-OH), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 16.4 (C-9''), 18.0 (C-10''), 21.1 (C-1''), 26.0 (C-8''), 26.7 (C-5''), 39.9 (C-4''), 42.6 (C-3), 78.8 (C-2), 95.0 (C-8), 101.9 (C-4a), 108.1 (C-6), 115.7 (C-3'), 115.7 (C-5'), 123.0 (C-2''), 124.6 (C-6''), 128.8 (C-2'), 128.8 (C-6'), 129.6 (C-1'), 131.2 (C-7''), 134.3 (C-3''), 158.2 (C-4'), 161.0 (C-8a), 161.1 (C-5), 165.4 (C-7), 196.8 (C-4).

7-*O*-geranyl naringenin was converted from naringenin by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub>O<sub>5</sub> (*M*<sup>-</sup>), 407.18515; found 407.18732. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.50 (s, 3H, H-10''), 1.57 (s, 3H, H-8''), 1.63 (s, 3H, H-9''), 1.97 (m, 2H, H-4''), 2.01 (m, 2H, H-5''), 2.66 (dd, *J* = 17.2, 2.8 Hz, 1H, H-3eq), 3.25 (dd, *J* = 17.2, 13.0 Hz, 1H, H-3ax), 4.53 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1'), 5.00 (m, 1H, H-6''), 5.32 (m, 1H, H-2''), 5.42 (dd, *J* = 13.1, 2.8 Hz, 1H, H-2), 6.01 (s, 1H, H-8), 6.03 (s, 1H, H-6), 6.75 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.27 (d, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-2', H-6'), 9.67 (br, s, C-4'-OH), 12.05 (br, s, C-5-OH), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 16.7 (C-9''), 18.1 (C-10''), 26.0 (C-8''), 26.2 (C-5''), 39.5 (C-4''), 42.5 (C-3), 65.7 (C-1''), 79.1 (C-2), 94.8 (C-8), 95.7 (C-6), 103.0 (C-4a), 115.7 (C-3'), 115.7 (C-5'), 119.3 (C-2''), 124.2 (C-6''), 128.9 (C-2'), 128.9 (C-6'), 129.2 (C-1'), 131.7 (C-7''), 141.8 (C-3''), 158.3 (C-4'), 161.0 (C-8a), 163.6 (C-5), 167.2 (C-7), 197.4 (C-4)

6-geranyl apigenin was converted from apigenin by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub> (*M*<sup>-</sup>), 405.17027; found 405.17115 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.48 (s, 3H, H-10''), 1.54 (s, 3H, H-8''), 1.70 (s, 3H, H-9''), 1.88 (m, 2H, H-4''), 1.96 (m, 2H, H-5''), 3.19 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'), 4.99 (m, 1H, H-6''), 5.17 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-2''), 6.44 (s, 1H, H-3), 6.67 (s, 1H, H-8), 6.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.84 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, H-2', H-6'), 13.15 (br, 1H, C-5-OH), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 16.5 (C-9''), 18.0 (C-10''), 21.6 (C-1''), 26.0 (C-8''), 26.7 (C-5''), 39.9 (C-4''), 93.9 (C-8), 103.0 (C-3), 103.2 (C-4a), 111.7 (C-6), 116.5 (C-3'), 116.5 (C-5'), 121.7 (C-1'), 122.9 (C-2''), 124.7 (C-6''), 128.8 (C-2'), 128.8 (C-6'), 161.9 (C-2), 131.1 (C-7''), 134.4 (C-3''), 155.8 (C-4'), 158.7 (C-8a), 161.9 (C-5), 163.7 (C-7), 181.9 (C-4)

7-*O*-geranyl apigenin was converted from apigenin by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub> (*M*<sup>-</sup>), 405.17027; found 405.16686 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.52 (s, 3H, H-10''), 1.57 (s, 3H, H-8''), 1.69 (s, 3H, H-9''), 2.02 (m, 2H, H-4''), 2.04 (m, 2H, H-5''), 4.63 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1''), 4.99 (m, 1H, H-6''), 5.17 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-2''), 6.30 (s, 1H, H-3), 6.72 (s, 1H, H-8), 6.76 (s, 1H, H-6), 6.85 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.88 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, H-2', H-6'), 12.93 (br, 1H, C-5-OH), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 16.9 (C-9''), 18.1 (C-10''), 26.0 (C-8''), 26.3 (C-5''), 39.9 (C-4''), 65.9 (C-1''), 93.8 (C-8), 99.0 (C-4a), 103.0 (C-3), 105.1 (C-6), 116.8 (C-3'), 116.8 (C-5'), 119.4 (C-2''), 120.5 (C-1'), 124.3 (C-6''), 129.1 (C-2'), 129.1 (C-6'), 131.6 (C-7''), 141.8 (C-3''), 157.7 (C-4'), 161.7 (C-8a), 163.3 (C-2), 164.8 (C-5), 164.8 (C-7), 182.3 (C-4)

7-*O*-geranyl genistein was converted from genistein by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>5</sub> (*M*<sup>-</sup>), 405.17027; found 405.16781 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.52 (s, 3H, H-10''), 1.57 (s, 3H, H-8''), 1.68 (s, 3H, H-9''), 2.02 (m, 2H, H-4''), 2.04 (m, 2H, H-5''), 4.63 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, H-1''), 5.02 (m, 1H, H-6''), 5.39 (m, 1H, H-2''), 6.35 (s, 1H, H-8), 6.60 (s, 1H, H-6), 6.78 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.34 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 8.35 (s, 1H, H-2), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 16.9 (C-9''), 18.1 (C-10''), 25.9 (C-8''), 26.2 (C-5''), 39.8 (C-4''), 65.9 (C-1''), 93.5 (C-8), 99.1 (C-6), 105.9 (C-4a), 115.7 (C-3'), 115.7 (C-5'), 119.2 (C-2''), 121.5 (C-1'), 123.0 (C-3), 124.2 (C-6''), 130.7 (C-2'), 130.7 (C-6'), 131.7 (C-7''), 142.0 (C-3''), 154.8 (C-2), 158.0 (C-8a), 158.0 (C-4'), 162.3 (C-5), 164.9 (C-7), 180.9 (C-4)

7-*O*-geranyl daidzein was converted from daidzein by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub> (*M*<sup>-</sup>), 389.17528; found 389.17653 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.58 (s, 3H, H-10''), 1.61 (s, 3H, H-8''), 1.78 (s, 3H, H-9''), 2.09 (m, 2H, H-4''), 2.13 (m, 2H, H-5''), 4.70 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1''), 5.07 (m, 1H, H-6''), 5.47 (m, 1H, H-2''), 6.83 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.02 (s, 1H, H-8), 7.03 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-6), 7.36 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, H-2', H-6'), 8.09 (d, *J* = 13.0 Hz, 1H, H-5), 8.17 (s, 1H, H-2), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 14.5 (C-9''), 17.1 (C-10''), 24.6 (C-8''), 26.0 (C-5''), 39.3 (C-4''), 64.7 (C-1''), 93.5 (C-8), 99.1 (C-6), 104.9 (C-4a), 115.7 (C-3'), 115.7 (C-5'), 117.7 (C-5), 118.9 (C-2''), 122.9 (C-3), 123.7 (C-6''), 125.0 (C-1'), 130.2 (C-2'), 131.5 (C-7''), 141.9 (C-3''), 153.6 (C-2), 157.5 (C-4'), 158.5 (C-8a), 164 (C-7), 176.7 (C-4).

8-geranyl daidzein was converted from daidzein by recombinant NphB.

HR-MS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>25</sub>O<sub>4</sub> (*M*<sup>-</sup>), 389.17528; found 389.17653 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.57 (s, 3H, H-10''), 1.60 (s, 3H, H-8''), 1.89 (s, 3H, H-9''), 2.04 (m, 2H, H-4''), 2.11 (m, 2H, H-5''), 3.63 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1''), 5.05 (m, 1H, H-6''), 5.31 (m, 1H, H-2''), 6.90 (d, *J* = 4.8 Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.02 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-6), 7.43 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-2', H-6'), 7.98 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-5), 8.27 (s, 1H, H-2), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 15.0 (C-9''), 16.3 (C-10''), 21.4 (C-1''), 24.5 (C-8''), 26.2 (C-5''), 39.4 (C-4''), 114.2 (C-6), 114.9 (C-3', C5'), 115.6 (C-8), 116.9 (C-4a), 121.6 (C-2''), 123.0 (C-1'), 123.9 (C-6''), 124.2 (C-3), 124.0 (C-5), 130.1 (C-2'), 130.7 (C-7''), 135.2 (C-3''), 153.3 (C-2), 156.2 (C-4'), 157.3 (C-8a), 160.5 (C-7), 177.3 (C-4).

2-geranyl olivetol was converted from olivetol by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub> (*M*<sup>-</sup>), 389.17528; found 389.17653 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-5'), 1.32 (m, 6H, H-2', H-3', H-4'), 1.55 (s, 3H, H-10''), 1.60 (s, 3H, H-8''), 1.71 (s, 3H, H-9''), 1.94 (t, *J* = 6.8, 7.6 Hz, 2H, H-4''), 2.04 (c, *J* = 6.8, 6.8, 7.6 Hz, 2H, H-5''), 2.43 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-1'), 3.21 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1''), 5.04 (m, 2H, H-2'', H-6''), 6.10 (s, 1H, H-6), 6.12 (s, 1H, H-4), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.1 (C-5'), 15.0 (C-9''), 16.4 (C-10''), 22.4 (C-1''), 23.8 (C-4'), 24.5 (C-8''), 26.4 (C-5''), 30.8 (C-3'), 31.9 (C-2'), 33.0 (C-1'), 39.5 (C-4''), 99.8 (C-4), 107.1 (C-6), 117.5 (C-2), 124.1 (C-2''), 124.8 (C-6''), 130.7 (C-7''), 132.7 (C-3''), 142.8 (C-1), 155.1 (C-5), 155.7 (C-3)

4-geranyl olivetol was converted from olivetol by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub> (*M*<sup>-</sup>), 389.17528; found 389.17653 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H, H-5'), 1.29 (m, 6H, H-2', H-3', H-4'), 1.54 (s, 3H, H-10''), 1.59 (s, 3H, H-8''), 1.73 (s, 3H, H-9''), 1.93 (t, *J* = 6.8, 7.6 Hz, 2H, H-4''), 2.04 (c, *J* = 6.8, 7.6, 6.8 Hz, 2H, H-5''), 2.37 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-1'), 3.22 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1''), 5.05 (m, 1H, H-6''), 5.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H, H-2''), 6.11 (s, 2H, H-2, H-6), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 13.1 (C-5'), 14.5 (C-9''), 16.4 (C-10''), 21.7 (C-1''), 22.3 (C-4'), 24.5 (C-8''), 26.4 (C-5''), 30.9 (C-3'), 31.3 (C-2'), 35.4 (C-1'), 39.6 (C-4''), 106.5 (C-2), 106.5 (C-6), 112.2 (C-4), 123.7 (C-2''), 124.3 (C-6''), 130.6 (C-7''), 133.2 (C-3''), 141.0 (C-1), 155.6 (C-3), 155.6 (C-5)

4-geranyl resveratrol was converted from resveratrol by recombinant NphB.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub> (*M*<sup>-</sup>), 363.19602; found 363.19137 <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.53 (s, 3H, H-10''), 1.59 (s, 3H, H-8''), 1.73 (s, 3H, H-9''), 1.92 (m, 2H, H-4''), 2.02 (m, 2H, H-5''), 3.25 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, H-1''), 5.20 (m, 2H, H-2'', H-6''), 6.47 (s, 2H, H-2, H-6), 6.73 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, H-β), 6.75 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.89 (d, *J* = 15.8 Hz, 1H, H-α), 7.31 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-2', H-6'), <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 15.0 (C-9''), 16.4 (C-10''), 21.9 (C-1''), 24.6 (C-8''), 26.4 (C-5''), 39.6 (C-4''), 104.5 (C-2), 104.5 (C-6), 114.6 (C-4), 115.2 (C-3'), 115.2 (C-5'), 123.2 (C-2''), 124.1 (C-6''), 125.9 (C-α), 127.0 (C-2'), 127.3 (C-β), 127.3 (C-6'), 129.4 (C-1'), 130.9 (C-7''), 133.7 (C-3''), 136.3 (C-1), 155.8 (C-3), 155.8 (C-5), 156.6 (C-4').

1-*O*-geranyl 1,3-DHN was converted from 1,3-DHN by recombinant Fur7.

HRMS (ESI<sup>-</sup>) calcd. for C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub> (*M*<sup>-</sup>), 295.16980; found 295.17000. <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.59 (s, 3H, H-10'), 1.63 (s, 3H, H-8'), 1.77 (s, 3H, H-9'), 2.03 (m, 2H, H-4'), 2.10 (m, 2H, H-5'), 4.67 (d, *J* = 6.9 Hz, 2H, H-1'), 5.10 (m, 1H, H-2'), 5.55 (m, 1H, H-6'), 6.47 (s, 1H, H-2), 6.65 (s, 1H, H-4), 7.16 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-7), 7.31 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-6), 7.52 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5), 8.01 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-8)

2-geranyl resveratrol was converted from resveratrol by recombinant Fur7.

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ: 1.40 (s, 3H, H-10''), 1.46 (s, 3H, H-8''), 1.73 (s, 3H, H-9''), 1.84 (m, 2H, H-4''), 1.91 (m, 2H, H-5''), 3.22 (d, *J* = 6.2 Hz, 2H, H-1''), 4.91 (m, 2H, H-2'', H-6''), 6.16 (s, 1H, H-4), 6.43 (s, 2H, H-6), 6.70 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, H-3', H-5'),

6.75 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, H- $\beta$ ), 6.96 (d,  $J = 15.8$  Hz, 1H, H- $\alpha$ ), 7.28 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-2', H-6')

5-dimethylallyl 1,6-DHN was converted from 1,6-DHN by recombinant Sco7190.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.57 (s, 3H, H-5'), 1.77 (s, 3H, H-4'), 3.56 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-1'), 5.07 (m, 1H, H-2'), 6.58 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-7), 6.59 (d,  $J = 6.8$  Hz, 1H, H-2), 7.16 (dd,  $J = 8.2, 7.6$  Hz, 1H, H-3), 7.18 (d,  $J = 8.2$  Hz, 1H, H-4)

1-dimethylallyl 2,7-DHN was converted from 2,7-DHN by recombinant Sco7190.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.59 (s, 3H, H-5'), 1.78 (s, 3H, H-4'), 3.48 (d,  $J = 6.2$  Hz, 2H, H-1'), 5.06 (m, 1H, H-2'), 6.86 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-3'), 6.87 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-6), 6.97 (s, 1H, H-8), 7.41 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-5), 7.53 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H, H-4)

6-dimethylallyl naringenin was converted from naringenin by recombinant Sco7190.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.54 (s, 3H, H-5''), 1.62 (s, 3H, H-4''), 2.58 (dd,  $J = 13.1, 2.8$  Hz, 1H, H-3eq), 3.01 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2H, H-1''), 3.09 (dd,  $J = 17.2, 13.1$  Hz, 1H, H-3ax), 5.04 (t,  $J = 6.2, 6.9$  Hz, 1H, H-2''), 5.29 (dd,  $J = 13.1, 2.8$  Hz, 1H, H-2), 5.81 (s, 1H, H-8), 6.73 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-3', H-5'), 7.25 (d,  $J = 8.3$  Hz, 2H, H-2', H-6'), 12.36 (s, 1H, C-5-OH),  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 18.1 (C-4''), 21.1 (C-5''), 26.0 (C-1''), 42.4 (C-3), 78.7 (C-2), 95.4 (C-8), 108.3 (C-4a), 108.4 (C-6), 115.7 (C-3'), 115.7 (C-5'), 123.3 (C-2''), 128.8 (C-2'), 128.8 (C-6'), 129.7 (C-1'), 130.7 (C-3''), 157.9 (C-4'), 160.9 (C-8a), 161.0 (C-5), 165.4 (C-7), 196.8 (C-4).

2- dimethylallyl olivetol was converted from olivetol by recombinant Sco7190.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 0.89 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, H-5'), 1.32 (m, 6H, H-2', H-3', H-4'), 1.63 (s, 3H, H-5''), 1.71 (s, 3H, H-4''), 2.42 (m, 2H, H-1'), 3.20 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, H-1''), 5.03 (m, 2H, H-2''), 6.09 (s, 1H, H-6), 6.11 (s, 1H, H-4)

4- dimethylallyl olivetol was converted from olivetol by recombinant Sco7190.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 0.88 (t,  $J$  = 6.9, 7.5 Hz, 3H, H-5'), 1.29 (m, 6H, H-2', H-3', H-4'), 1.62 (s, 3H, H-5''), 1.72 (s, 3H, H-4''), 2.37 (t,  $J$  = 6.9, 7.6 Hz, 2H, H-1'), 3.21 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 2H, H-1''), 5.18 (m, 2H, H-2''), 6.11 (s, 1H, H-2, H-6)

2-dimethylallyl resveratrol was converted from resveratrol by recombinant Sco7190.

<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$ : 1.64 (s, 3H, H-5''), 1.78 (s, 3H, H-4''), 3.34 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 2H, H-1''), 5.08 (m, 1H, H-2''), 6.20 (s, 1H, H-4), 6.53 (s, 1H, H-6), 6.74 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-3', H-5'), 6.80 (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H, H- $\beta$ ), 7.10 (d,  $J$  = 16.5 Hz, 1H, H- $\alpha$ ), 7.29 (d,  $J$  = 8.3 Hz, 2H, H-2', H-6')



## Refernce

1. Yazaki, K., K. Sasaki, and Y. Tsurumaru, *Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites*. Phytochemistry, 2009. **70**(15-16): p. 1739-45.
2. Liang, P.H., T.P. Ko, and A.H. Wang, *Structure, mechanism and function of prenyltransferases*. Eur. J. Biochem., 2002. **269**: p. 3339-3354.
3. Tarshis, L.C., et al., *Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1996. **93**: p. 15018-15023.
4. Takahashi, S. and T. Koyama, *Structure and function of cis-prenyl chain elongating enzymes*. Chem. Rec., 2006. **6**: p. 194-205.
5. Reiss, Y., M.S. Brown, and J.L. Goldstein, *Divalent cation and prenyl pyrophosphate specificities of the protein farnesyltransferase from rat brain, a zinc metalloenzyme*. J. Biol. Chem., 1992. **267**: p. 6403-6408.
6. Basso, A.D., P. Kirschmeier, and W.R. Bishop, *Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors*. J. Lipid. Res., 2006. **47**: p. 15-31.
7. Leung, K.F., R. Baron, and M.C. Seabra, *Thematic review series: lipid posttranslational modifications. geranylgeranylation of Rab GTPases*. J. Lipid. Res., 2006. **47**: p. 467-475.
8. Epstein, W.W., et al., *Quantitation of prenylcysteines by a selective cleavage reaction*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1991. **88**: p. 9668-9670.
9. Meganathan, R., *Biosynthesis of menaquinone (vitamin K<sub>2</sub>) and ubiquinone (coenzyme Q): a perspective on enzymatic mechanisms*. Vitam Horm, 2001. **61**: p. 173-218.
10. Meganathan, R., *Ubiquinone biosynthesis in microorganisms*. FEMS. Microbiol. Lett., 2001. **203**: p. 131-139.

11. Suzuki, K., et al., *Evidence that Escherichia coli ubiA product is a functional homolog of yeast COQ2, and the regulation of ubiA gene expression*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1994. **58**: p. 1814-1819.
12. Ashby, M.N., et al., *COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase*. J. Biol. Chem., 1992. **267**: p. 4128-4136.
13. Ohara, K., et al., *Functional characterization of OsPPT1, which encodes p-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in Oryza sativa*. Plant. Cell. Physiol., 2006. **47**: p. 581-590.
14. Okada, K., et al., *The AtPPT1 gene encoding 4-hydroxybenzoate polyprenyl diphosphate transferase in ubiquinone biosynthesis is required for embryo development in Arabidopsis thaliana*. Plant. Mol. Biol., 2004. **55**: p. 567-577.
15. Tahara, S., *A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids*. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007. **71**: p. 1387-1404.
16. Brigham, L.A., P.J. Michaels, and H.E. Flores, *Cell-specific production and antimicrobial activity of naphthoquinones in roots of Lithospermum erythrorhizon*. Plant. Physiol., 1999. **119**: p. 417-428.
17. Sasaki, K., et al., *Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of Sophora flavescens*. Plant. Physiol., 2008. **146**: p. 1075-1084.
18. Wang, J., et al., *The determinant step in ergot alkaloid biosynthesis by an endophyte of perennial ryegrass*. Fungal. Genet. Biol., 2004. **41**: p. 189-198.
19. Unsold, I.A. and S.M. Li, *Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in Aspergillus fumigatus: gene expression, purification, and characterization of fumigaclavine C synthase FGAPT1*. Chembiochem., 2006. **7**: p. 158-164.

20. Unsold, I.A. and S.M. Li, *Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from Aspergillus fumigatus*. Microbiology., 2005. **151**: p. 1499-1505.
21. Pojer, F., et al., *CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 2003. **100**: p. 2316-2321.
22. Funa, N., et al., *A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms*. Nature, 1999. **400**(6747): p. 897-9.
23. Botta, B., et al., *Prenylated isoflavonoids: Botanical distribution, structures, biological activities and biotechnological studies. An update (1995-2006)*. Curr. Med. Chem., 2009. **16**: p. 3414-3468.
24. Ahmed Belkacem, A., et al., *Flavonoid structure-activity studies identify 6-prenylchrysin and tectochrysin as potent and specific inhibitors of breast cancer resistance protein ABCG2*. Cancer. Res., 2005. **65**: p. 4852-4860.
25. Pan, L., H. Becker, and C. Gerhauser, *Xanthohumol induces apoptosis in cultured 40-16 human colon cancer cells by activation of the death receptor- and mitochondrial pathway*. Mol. Nutr. Food. Res., 2005. **49**: p. 837-843.
26. Kim, D.W., et al., *Effects of sophoraflavanone G, a prenylated flavonoid from Sophora flavescens, on cyclooxygenase-2 and in vivo inflammatory response*. Arch. Pharm. Res., 2002. **25**: p. 329-335.
27. Stevens, J.F., et al., *Inhibition of peroxynitrite-mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha,beta-unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore*. Chem. Res. Toxicol., 2003. **16**: p. 1277-1286.
28. Shirataki, Y., et al., *In vitro biological activity of prenylflavanones*. Anticancer. Res., 2001. **21**: p. 275-280.

29. Zierau, O., et al., *Naringenin-type flavonoids show different estrogenic effects in mammalian and teleost test systems*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005. **326**: p. 909-916.
30. Botta, B., et al., *Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation*. Trends Pharmacol Sci, 2005. **26**(12): p. 606-8.
31. Miura, Y., et al., *Production of the carotenoids lycopene, beta-carotene, and astaxanthin in the food yeast Candida utilis*. Appl. Environ. Microbiol., 1998. **64**: p. 1226-1229.
32. Shindo, K., et al., *Conversion from arenes having a benzene ring to those having a picolinic acid by simple growing cell reactions using Escherichia coli that expressed the six bacterial genes involved in biphenyl catabolism*. J Am Chem Soc, 2004. **126**(46): p. 15042-3.
33. Abe, I., *Engineering of plant polyketide biosynthesis*. Chem Pharm Bull (Tokyo), 2008. **56**(11): p. 1505-14.
34. Abe, I., et al., *Structure-based engineering of a plant type III polyketide synthase: formation of an unnatural nonaketide naphthopyrone*. J Am Chem Soc, 2007. **129**(18): p. 5976-80.
35. Kawasaki, T., et al., *Biosynthesis of a natural polyketide-isoprenoid hybrid compound, furaquinocin A: identification and heterologous expression of the gene cluster*. J. Bacteriol., 2006. **188**: p. 1236-1244.
36. Funa, N., et al., *Alteration of reaction and substrate specificity of a bacterial type III polyketide synthase by site-directed mutagenesis*. Biochem. J., 2002. **367**: p. 781-789.
37. Funa, N., et al., *A novel quinone-forming monooxygenase family involved in modification of aromatic polyketides*. J. Biol. Chem., 2005. **280**: p. 14514-14523.

38. Winter, J.M., et al., *Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization: cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster*. J. Biol. Chem., 2007. **282**: p. 16362-16368.
39. Haagen, Y., et al., *A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in Streptomyces cinnamonensis DSM 1042*. Chembiochem., 2006. **7**: p. 2016-2027.
40. Kim, S.Y., et al., *Cloning and heterologous expression of the cyclooctatin biosynthetic gene cluster afford a diterpene cyclase and two p450 hydroxylases*. Chem. Biol., 2009. **16**: p. 736-743.
41. Saleh, O., et al., *Aromatic prenylation in phenazine biosynthesis: dihydrophenazine-1-carboxylate dimethylallyltransferase from Streptomyces anulatus*. J. Biol. Chem., 2009. **284**: p. 14439-14447.
42. Kuzuyama, T., J.P. Noel, and S.B. Richard, *Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 983-7.
43. Haagen, Y., et al., *A soluble, magnesium-independent prenyltransferase catalyzes reverse and regular C-prenylations and O-prenylations of aromatic substrates*. FEBS. Lett., 2007. **581**: p. 2889-2893.
44. Shin-ya, K., et al., *Biosynthetic studies of naphterpin, a terpenoid metabolite of streptomyces*. Tetrahedron. Lett., 1990. **31**: p. 6025-6026.
45. Shin-ya, K., et al., *7-Demethylnaphterpin, a new free radical scavenger from Streptomyces prunicolor*. J Antibiot (Tokyo), 1992. **45**(1): p. 124-5.
46. Shin-ya, K., et al., *Isolation and structural elucidation of an antioxidative agent, naphterpin*. J. Antibiot. (Tokyo.), 1990. **43**: p. 444-447.

47. Kuzuyama, T., J.P. Noel, and S.B. Richard, *Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products*. Nature., 2005. **435**: p. 983-987.
48. Botta, B., et al., *Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology*. Curr Med Chem, 2005. **12**(6): p. 717-39.
49. Ozaki, T., et al., *NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids*. J Antibiot (Tokyo), 2009. **62**(7): p. 385-92.
50. Metzger, U., et al., *The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14309-14.
51. Akashi, T., et al., *Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin*. Plant Physiol, 2009. **149**(2): p. 683-93.
52. Miranda, C.L., et al., *Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells*. Cancer Lett, 2000. **149**(1-2): p. 21-9.
53. Stevens, J.F. and J.E. Page, *Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!* Phytochemistry, 2004. **65**(10): p. 1317-30.
54. Jez, J.M., et al., *Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase*. Biochemistry, 2000. **39**(5): p. 890-902.
55. Vara, J., et al., *Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in Saccharopolyspora erythraea (Streptomyces erythreus)*. J Bacteriol, 1989. **171**(11): p. 5872-81.

## 謝 辞

本研究を行うにあたり多くの方々より多数のご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに改めて厚く御礼申し上げます。

東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究室西山真教授には実験及び研究室生活全般について温かくご指導いただきました。心より感謝致します。また同研究室葛山智久准教授には実験の指導をしていただくとともに、研究室生活や学会等で貴重な体験を与えて下さり深く感謝致します。同研究室富田助教には実験と研究室生活全般について多くのご助言をいただきました。心より感謝致しております。

富山県立大学大利徹先生にはフラキノシン生合成遺伝子クラスターを快く御分与いただきました。深く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科発酵学研究室鮎信学先生にはフラビオリンを快く御分与いただきました。深く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科降旗一夫先生には NMR の測定及び化合物の構造決定にあたって多くのご助言をいただきました。心より感謝致します。

北里研究所大村智先生にはフラキノシン生産菌 *Streptomyces* sp. KO-3988 株を快く御分与いただきました。心より感謝致します。

京都大学の矢崎一史先生にはプレニルトランスフェラーゼ発現植物のサンプルを御供与いただきました。心より感謝いたします。