

博士論文（要約）

ポリエンの合成を担う II 型ポリケタイド合成酵素の機能解析

ト タンヤオ

本論文で用いた略記号

以下に本論文に用いた略記号のうち、特に使用頻度の高いものを一覧として載せる。

略記号	名称
ACP	acyl carrier protein
AT	acyltransferase
CLF	chain length factor
CoA	coenzyme A
COSY	correlated spectroscopy
DH	dehydratase
DMSO	dimethyl sulfoxide
ER	enoylreductase
EtOAc	ethyl acetate
FAS	fatty acid synthase
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
iTC	isothermal titration calorimetry
IPTG	isopropyl- β -D(-)-thiogalactopyranoside
KR	ketoreductase
KS	ketosynthase
minPKS	minimal PKS
MAT	malonyl-CoA:ACP transacylase
MeOH	methanol
MPLC	medium performance liquid chromatography
LCMS	liquid chromatography-mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
Ni ²⁺ -NTA	nickel-nitrilotriacetic acid
NMR	nuclear magnetic resonance
NRPS	nonribosomal peptide synthetase
PCR	polymerase chain reaction
PKS	polyketide synthase
rmsd	root-mean-square deviation
RT	retention time
SARP	<i>Streptomyces</i> antibiotic regulatory protein
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SNAC	S-N-acetylcysteamine
TE	thioesterase
UV	ultraviolet

目次

目次	2
第一章 序論	4
1.1. 天然物創薬	4
1.2. ポリケタイドとその生合成	6
1.2.1. ポリケタイド化合物群	6
1.2.2. ポリケタイド合成酵素 (PKS) の起源となる脂肪酸合成酵素 (FAS)	8
1.2.3. ポリケタイド合成酵素 (PKS)	13
1.2.4. アシルキャリアプロテイン (ACP)	23
1.2.5. ポリケタイド生合成における立体制御	25
1.4. Crosslink 技術を利用した PKS、NRPS 酵素ドメイン間相互作用の解析	28
1.5. 研究目的と研究の流れ	30
第二章 SARP ファミリー転写活性化因子の強制発現による休眠生合成遺伝子クラスターの活性化	32
2.1. 背景	32
2.1.1. 放線菌における休眠生合成遺伝子クラスターの活性化による新規天然物の探索	32
2.1.2. SARP ファミリー転写活性化因子	33
2.1.3. 放線菌 <i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 とそのドラフトゲノム解析	34
2.2. 結果	35
2.2.1. JE08 株のゲノムマイニング	35
2.2.2. JE08 株の転写活性化因子強制発現株の構築	38
2.2.3. 転写活性化因子強制発現株の代謝解析	39
2.2.4. Ishigamide の単離と構造決定	42
2.3. 考察	46
2.4. 実験項	48
2.4.1. 菌株と培地	48
2.4.2. JE08 株のゲノム抽出	49
2.4.3. 転写活性化因子強制発現株の構築	49
2.4.4. LC-ESIMS による代謝産物比較	51
2.4.5. Ishigamide の単離と構造解析	51
第三章 ishigamide 生合成遺伝子クラスター (<i>iga</i> cluster) の同定とその <i>in silico</i> 解析	53

3.1. 概要.....	53
3.2. 結果.....	53
3.2.1. 遺伝子破壊による ishigamide 生合成遺伝子クラスターの同定.....	53
3.2.3. ishigamide の予想生合成経路.....	60
3.2.4. IgaPKS の <i>in silico</i> 解析.....	63
3.3. 考察.....	72
3.4. 実験項.....	73
3.4.1. KS 破壊株の作製.....	73
第四章 Ishigamide ポリエン骨格生合成の <i>in vitro</i> 再構成.....	77
4.1. 背景.....	77
4.2. 結果.....	78
4.2.1. 組換えタンパク質の調製.....	78
4.2.2. Iga13 精製酵素の <i>in vitro</i> 解析.....	80
4.2.3. Iga16 精製酵素の <i>in vitro</i> 解析.....	85
4.2.4. Iga10 精製酵素を用いた <i>in vitro</i> 反応.....	87
4.2.5. Iga11-Iga12 精製酵素を用いた <i>in vitro</i> 反応.....	88
4.2.6. IgaPKS を用いた <i>in vitro</i> ポリエン合成経路の再構築.....	89
4.3. 考察.....	92
4.4. 実験項.....	94
4.4.1. 菌株と培地.....	94
4.4.2. PKS 組換え酵素の大腸菌発現用ベクターの構築.....	94
4.4.3. 組換えタンパク質の取得.....	96
4.4.4. Iga10 の LC-MS 解析.....	98
4.4.5. Iga13 の <i>in vitro</i> 解析.....	98
4.4.6. Iga16 の <i>in vitro</i> 解析.....	99
4.4.7. Iga10 の自己アシル化.....	99
4.4.9. Iga11-Iga12 の <i>in vitro</i> 解析.....	99
4.4.10. IgaPKS を用いた polyene 合成.....	100
4.4.11. 有機合成.....	101
第七章 総括.....	111
引用文献.....	115
謝辞.....	124

第一章 序論

放線菌の二次代謝産物は高い構造多様性と様々な生理活性を有しており、創薬過程におけるリード化合物として重要な位置を占めている。本研究の前半では天然物創薬を目指し、放線菌由来新規化合物の探索を行った。

生合成研究より、生合成酵素が触媒する様々な化学反応を明らかにすることは学術的に有意義である。また、生合成研究より得られた知見を生合成経路のリエンジニアリング、酵素工学、コンビナトリアル生合成に応用し、目的産物の設計・生産を成し遂げることは医薬品の開発に大きく貢献できると考えられる。特に、現段階では、生合成酵素の構造や酵素間相互作用に関する理解の不十分さが、酵素活性/生合成経路の自在な改変を妨げていると考えられている。したがって、そうした情報の充実が新規化合物の創出に繋がると期待される。本研究の後半では、酵素の活性解析、構造解析を含む新規化合物の生合成研究を行った。その研究対象である新規化合物は本研究の前半で見出された有名な放線菌二次代謝産物として知られているポリケタイドである。

新規天然物の探索手法について、第二章で詳細に取り上げる。序論では、ポリケタイド生合成に関する知見の紹介に重点を置く。

1.1. 天然物創薬

現在、医薬品の約 50%は天然物やそれを誘導化、一部改変したものが占めている¹。生物が生産する天然物は、合成化合物と比べ、複雑かつ多様な構造を示す。それに基づき、数多くの天然物が種々の有用な生理活性を示す。例えば、*Taxus brevifolia* の樹皮中から単離された paclitaxel とミクソバクテリア属細菌から発見された epothilone は、有糸分裂阻害活性を示し、抗癌剤として注目された。これまでに見出された生理活性物質において、生理活性を示すのに重要な構造が同定されつつある。それらの情報に基づいて天然物に化学修飾を施し、その溶解性、活性を向上させ、より薬用に適するものを開発した例が多く報告されている。また、生合成研究によって、化合物の構造多様性の基盤となる各化学反応に携わる酵素の触媒能や反応機構を明らかにすることで、天然における物質生産のストラテジーを理解できる。そこから得られた情報を利用して、コンビナトリアル生合成より新規化合物群を創出することが可能となりつつある。

そうした天然物創薬の根底には、新規天然物の発見がある。これまでに生理活性物質のスクリーニングより、多数の医薬品のリードとなる天然化合物が見出されてきたが、近年天然から単離される新規化合物は減少傾向にある。にもかかわらず、多剤耐性菌の

出現により、強力な生理活性や新規な作用機序を有する医薬品の開発が必要とされている。そのため、新規医薬品シード化合物探索に向けた有力な手法の開発が急務となっている。近年では、新規天然物の発見を目指して、新規生物種（難培養性微生物、極限環境微生物等）からのスクリーニングといった研究が盛んに行われている。同時に、ゲノム解析技術の進歩により、放線菌はこれまでに単離された化合物の数を遥かに上回る生合成遺伝子クラスターを有していることが明らかになっている。これらの生合成遺伝子クラスターは、通常の実験室培養条件では発現しないか、発現が非常に低いため今まで見逃されてきた。これら休眠遺伝子クラスターの活性化により、放線菌より新規二次代謝産物を取得することができると考えられる。「休眠生合成遺伝子の活性化」については第二章で詳細に述べる。

多様な天然物を生産する生物種として、土壌微生物である放線菌が挙げられる。そのため、自然界に生息する膨大な数の放線菌は医薬品シードを探索するための宝庫であると言える。2015年にノーベル生理学・医学賞を受賞した大村智博士が開発した抗寄生虫薬 ivermectin B_{1a} は放線菌 *Streptomyces avermitilis* の二次代謝産物である avermectin を元としている。Avermectin 以外にも、放線菌の二次代謝産物が医薬品の資源として活用されている例が多数ある。実際に、streptomycin や erythromycin、vancomycin をはじめとする抗生物質、bleomycin や daunomycin といった抗ガン剤、殺虫剤である noactin、免疫抑制剤として使われている FK506 などは放線菌によって生産される。

本論文の第二章では一株の放線菌を研究対象とし、それが生産する未同定の二次代謝産物の探索を目指した。後続の章ではその結果単離、同定された新規ポリケタイド化合物 ishigamide に関する生合成研究を行った。そこから得られた情報は天然物創薬に役立つと期待されるものである。

1.2. ポリケタイドとその生合成

1.2.1. ポリケタイド化合物群

有名な天然物クラスとして、ポリケタイド、非リボソームペプチド、リボソーム翻訳系翻訳後修飾ペプチド、テルペン、アルカロイド等が挙げられる。本論文では、ポリケタイドに関する研究を行っているため、この節では、これまでに明かされたポリケタイド生合成に関する知見を詳細に述べる。

ポリケタイドは酢酸ユニットが複数回縮合して形成するポリケトメチレン鎖が様々な修飾、環化を受けて生合成された化合物の総称である。ポリケタイドは二次代謝産物として植物や微生物により生産されており、ポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase, PKS) によって合成される。ポリケタイドの構造は多様であり、芳香環、ラクトン環、ポリエーテル、ポリエンなどの骨格を有するものが知られている。その構造多様性は基質の種類、縮合反応の回数、ポリケトメチレン鎖伸長中の修飾、ポリケトメチレン鎖の環化、芳香化、酵素から脱離した後のポリケタイドの修飾 (水酸化、糖化、プレニル化) などに起因する²。ポリケタイドは構造の多様性に応じて、様々な生理活性を示す。これまでに、ポリケタイドは免疫抑制剤、抗菌剤、抗癌剤等として活用されており、医薬品資源として重要な位置を占めてきた³。Figure 1-1 に多様な構造と生理活性を示すポリケタイドの代表例を羅列した。

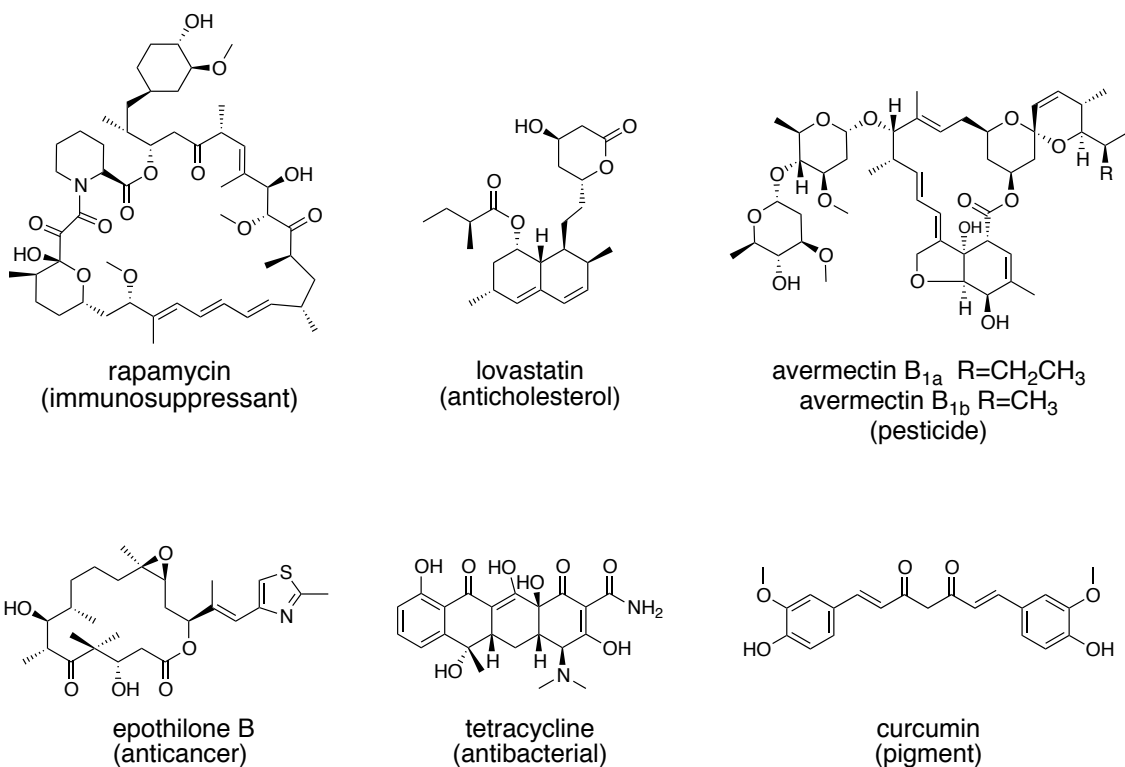


Figure 1-1. 代表的なポリケタイドの構造とそれらの生理活性。

土壌放線菌 *Streptomyces hygroscopicus* の生産物である rapamycin は免疫抑制作用と抗癌作用や延命効果を示す。 *Aspergillus terreus* から単離された lovastatin は製品化された最初の HMG-CoA 還元酵素 (メバロン酸経路の律速酵素) 阻害薬である。肝臓のコレステロール生合成を妨げ、血液中のコレステロール濃度を下げる作用があるため、高脂血症の治療薬として用いられている。放線菌 *Streptomyces avermitilis* から単離された avermectin は 18 員環ラクトン環を構造中に有する化合物群であり、抗寄生虫活性を示す。その化学誘導体である ivermectin B_{1a} は抗寄生虫薬として活用されている。 *Myxobacteria* 属細菌が生産するマクロライド化合物である epothilone は細胞分裂を阻害し、抗癌活性を示す。また、抗生物質として erythromycin A (Figure 1-8) や tetracycline などが挙げられる。ウコンから単離された黄色色素である curcumin はポリフェノールの一種であり、抗酸化活性を有している。Curcumin は食用色素や健康食品の添加剤として利用されている。

1.2.2. ポリケタイド合成酵素 (PKS) の起源となる脂肪酸合成酵素 (FAS)

ポリケタイドの生合成は脂肪酸の生合成と密接な関係を有しており、ポリケタイドの生合成を担う PKS も脂肪酸合成酵素 (FAS) と相同性を示す。PKS が触媒する反応を説明するにあたり、まず FAS の反応機構⁴ について説明する (Figure 1-2)。

FAS は acyl carrier protein (ACP)、malonyl-CoA:ACP acyltransferase (MAT)、ketosynthase (KS、FAS の場合 ketoacyl synthase から略して KAS と呼ぶこともある)、ketoreductase (KR)、dehydrase (DH)、enoyl reductase (ER)、thioesterase (TE) などの触媒ドメインにより構成される。そのうち、ACP は反応の足場として機能する。MAT は基質の取り込みを担い、活性型 holo-ACP (1.2.4.節で詳細に記述) の 4'-ホスホパントテン (Ppant) アーム末端のチオール基に malonyl-CoA 由来の malonyl 基をロードし、malonyl-ACP を合成する⁵。KS は炭素鎖の伸長を担い、acyl-CoA / ACP と malonyl-ACP の脱炭酸を伴う Claisen 縮合反応を触媒し、 β -ketoacyl-ACP を合成する。生じた β -ketoacyl-ACP の β -ケト基は KR により還元され、水酸基になる。この水酸基は DH により除去され、生じた二重結合はさらに ER により還元される。このように、FAS は縮合、ケト還元、脱水、エノール還元などの触媒サイクルを繰り返して、炭素鎖を C2 単位で伸長させ、長鎖脂肪酸を生成する。縮合の段階に応じて、異なる種類の KS が縮合反応を触媒する。脂肪酸合成の開始は KAS III より触媒される。この時、KAS III は acetyl-CoA をスターター基質に、 β -ketoacyl-ACP を合成する。生じた β -ketoacyl-ACP は KR、DH と ER がそれぞれ触媒するケト還元、脱水とエノール還元反応を経て、C₄ の acyl-ACP に変換される。次に、KAS I がこの C₄ の脂肪酸鎖をスターター基質に、脂肪酸伸長サイクルを 6 回触媒し、C₁₆ の脂肪酸鎖を生成する。KAS II は C₁₆ 脂肪酸鎖から C₁₈ 脂肪酸鎖への鎖伸長を触媒する。KAS III が CoA 体をスターター基質として認識するのに対し、KAS I と KAS II は ACP 上の acyl 基をスターター基質として取り込む。また、さらなる相違点として、KAS III は Cys-His-Asn からなる活性三残基を持つが、KAS I と KAS II は Cys-His-His からなる活性三残基を持つ。脂肪酸生合成の最終段階として、TE が触媒するチオエステル結合の加水分解により、伸長した長鎖脂肪酸は ACP から切り離される。一般的に FAS の主最終産物は C₁₆ や C₁₈ の長鎖飽和脂肪酸である。一部の FAS は単価不飽和脂肪酸や分岐脂肪酸も生合成できる。

FASはその構造よりI型とII型に分類される。I型FASでは複数の機能ドメインが一つのポリペプチド上にコードされており、主にC₁₆の直鎖飽和脂肪酸を生合成する。I型FASはさらにカビ・酵母型と脊椎動物型に大別される^{4,6}(Figure 1-3)。カビ・酵母型I型PKSの触媒ドメインは2本のポリペプチド(α-chain: acyltransferase(AT)-ER-DH-malonyl/palmitoyl transferase(MPT), β-chain: ACP-KR-KS-Phosphopantetheinyl transferase(PPT))に分かれて存在し、6本ずつの各ポリペプチドがバレル状の高次構造を形成する⁷。バレル骨格中に各触媒ドメインが嵌っており、ACPはバレル中を移動し、各ドメインに脂肪酸生合成中間体を輸送する。一方、脊椎動物型の多くの場合、KS-AT-DH-ER-KR-ACP-TEの順番に繋がったペプチド鎖がホモダイマーを形成し、縮合wingと修飾wingを有するダイナミックなX字型高次構造を示す^{8,9}。各ポリペプチド鎖が形成する反応チャンバーの内部で脂肪酸生合成が行われる。

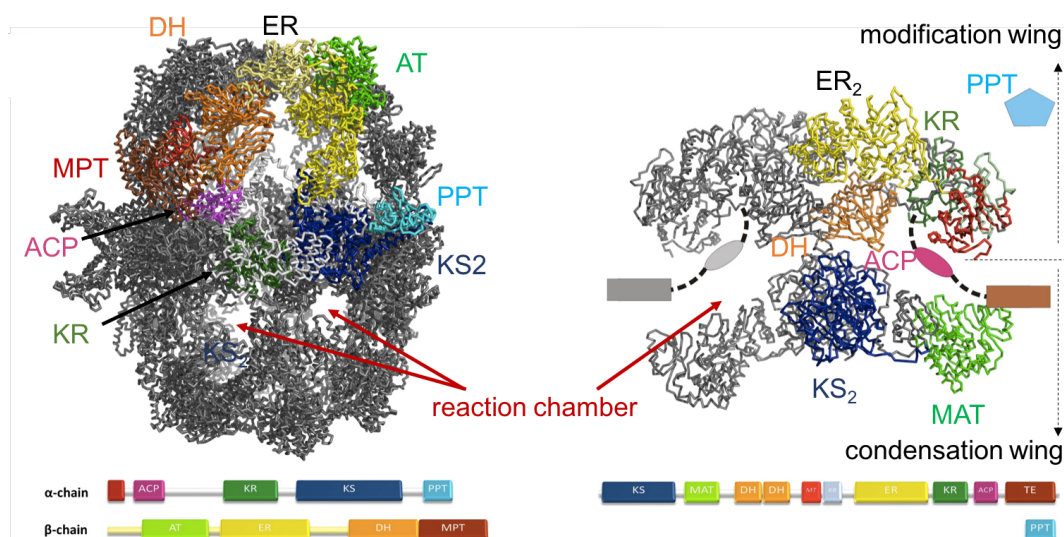


Figure1-3. I型FASの構造。(左)真菌のFASはバレル構造(高さ260 Å、幅230 Å)を形成する。真菌のFASはMPTにより、malonylユニットのロードと palmitoylユニットのオフロードを行い、ATによりacylスターターユニットを取り込む。(右)哺乳類のFASは対称的なX型構造(高さ210 Å、幅180 Å、深さ90 Å)を示す。哺乳類のFASはMATにより、malonylユニットのロード、ATによりacylスターターユニットを取り込む、TEよりpalmitoylユニットのオフロードを担う。図はP. Johansson, 2009¹⁰より一部改変。

一方、II型 FAS の触媒サブユニット (Fab と呼ばれる) はそれぞれ単独のタンパク質としてコードされる¹¹ (Figure 1-4)。多くの微生物と植物が持つ FAS は II 型である。II 型 FAS は直鎖飽和脂肪酸の他に一価不飽和脂肪酸や分岐脂肪酸を合成できる。不飽和脂肪酸の合成には二重結合を異性化する活性を有する FabA (β -hydrodecanoyl-ACP dehydratase) が関与している。FabA の触媒により生じる enoyl-ACP が FabB (KAS I) の基質として認識され、脂肪酸合成サイクルに導入されることにより不飽和脂肪酸が生成される。また、一部の細菌は分岐アミノ酸を α -ケト酸に変換し、さらに脱炭酸させ、分岐鎖 acyl-CoA を合成する経路を有している。このような細菌が持つ FabH (KAS III) は基質に acetyl-CoA より分岐鎖 acyl-CoA を好み、分岐脂肪酸を合成する。

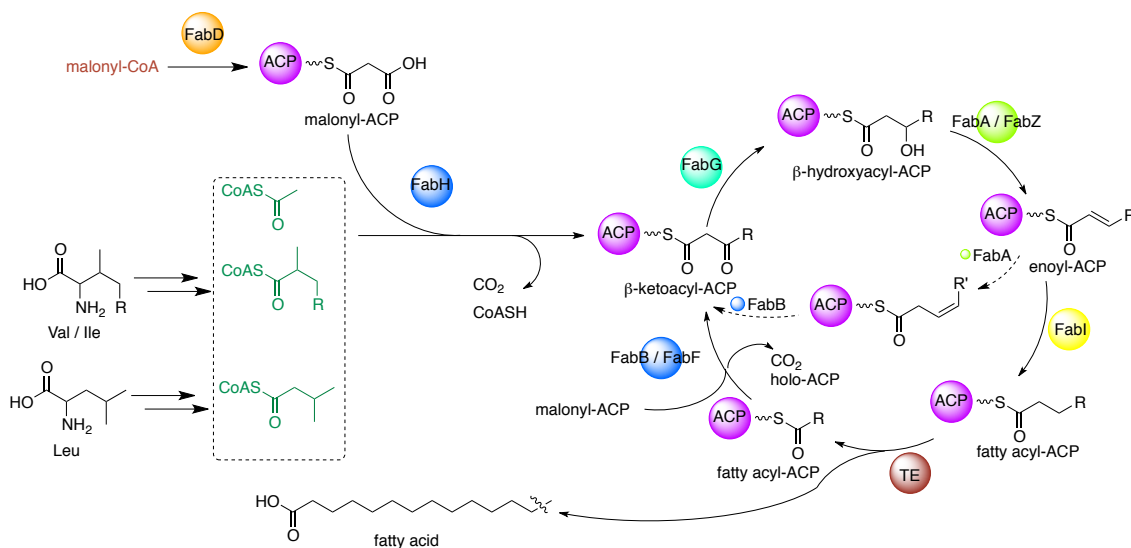


Figure 1-4. II 型 FAS が触媒する反応。スターター基質を緑で、伸長鎖基質を赤で表す。KAS のうち、FabH は KAS III、FabB は KAS I、FabF は KAS II に相当する。実線で示した反応サイクルにより飽和脂肪酸が生成され、点線で示した経路経路を一回辿ると一価不飽和脂肪酸が生成される。また、FabH がスターター基質に分岐鎖アミノ酸由来の分岐鎖 acyl-CoA を取り込むと、分岐脂肪酸が生成される。

II 型 FAS の構造解析は 2000 年代初期から行われており、各 FAS 構成ドメインの X 線結晶構造が報告されている。これまでに、*Brucella abortus*、*Bacillus subtilis*、*Escherichia coli*、*Yersinia pestis*、*Vibrio cholerae* 由来の FabB と、*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*、*Yersinia pestis*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Streptococcus pneumoniae*、*Vibrio cholerae*、*Saphylococcus aureus* 由来の FabF 結晶構造が報告されている。また、FabB や FabF の KS 阻害剤との共結晶が報告されている。さらに、*E. coli* 由来の FabB と ACP が形成する複合体 (PDB: 5KOF) も報告されている。複合体の調製には Ppant アームの先端に Br 脱離

基を有する crosslink ケミカルプローブが用いられた。Crosslink 手法に関しては 1.4 節で取り上げる。

ここで代表例として *E. coli* 由来の FabB (PDB: 1G5X)、*E. coli* FabB と同源の ACP、AcpP が形成する複合体 (PDB: 5KOF)、*B. subtilis* 由来の FabF (PDB: 4LS5)、*B. subtilis* 由来の FabF と KS 阻害剤である cerulenin の共結晶 (PDB: 4LS8) の構造を示す (Figure 1-5)。FabB (KAS I) と FabF (KAS II) はホモダイマーを形成している。各ホモダイマーは thiolase superfamily に共通して見られる $\alpha\beta\alpha$ 構造を示す。また、各モノマーにおいて Cys-His-His からなる触媒三残基が保存されており、それぞれ脂肪酸伸長反応を触媒する。各モノマーの活性ポケットはその Cys からダイマー境界面に向けて伸展する。

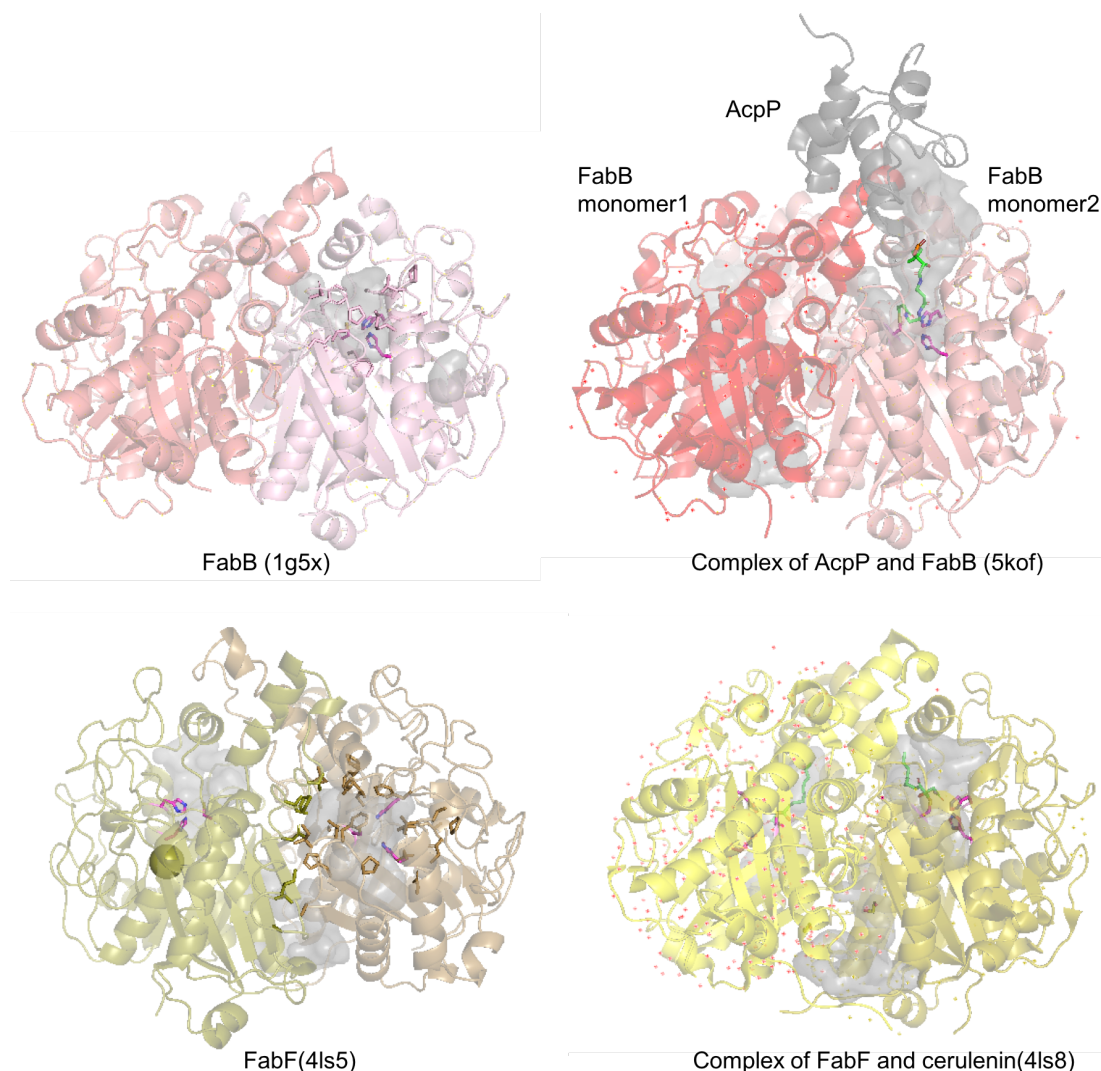


Figure 1-5. II 型 FAS の KS ホモダイマー構造のリボン図。それぞれの KS モノマーを違う色で示した。活性残基をマゼンタ、反応ポケットを灰色のサーフェス、Ppant アナログと cerulenin を緑で示す。リボンの透明度を 40%、サーフェスの透明度を 60%に設定した。

1.2.3. ポリケタイド合成酵素 (PKS)

PKSはFASと類似した機構により、ポリケトメチレン鎖の伸長、還元、脱水、環化、芳香化などの反応を触媒し、最終的なポリケタイド産物を合成する (Figure 1-6)。異なる点として、FASは前述の縮合、ケト還元、脱水、エノール還元すべての反応を欠かさず触媒するのに対し、PKSは還元、脱水の一部を触媒せずに次の伸長が行われる。修飾反応の欠落度合いにより、還元度合いの異なるポリケタイドが合成される。実際、ポリケタイドの構造中には脂肪酸では見られないケトン、水酸基や二重結合といった多様な官能基が存在する。また、PKSが用いるスターター基質 (malonyl-CoA や propionyl-CoA、isovaleryl-CoA、cyclohexanoyl-CoA、benzoyl-CoA など) や伸長基質 (malonyl-CoA 以外にも methylmalonyl-CoA など) もFASと比べて多様である。さらに、PKSにはFASでは見られない修飾や環化様式が存在しており、これらはポリケタイドの構造多様性に貢献している。

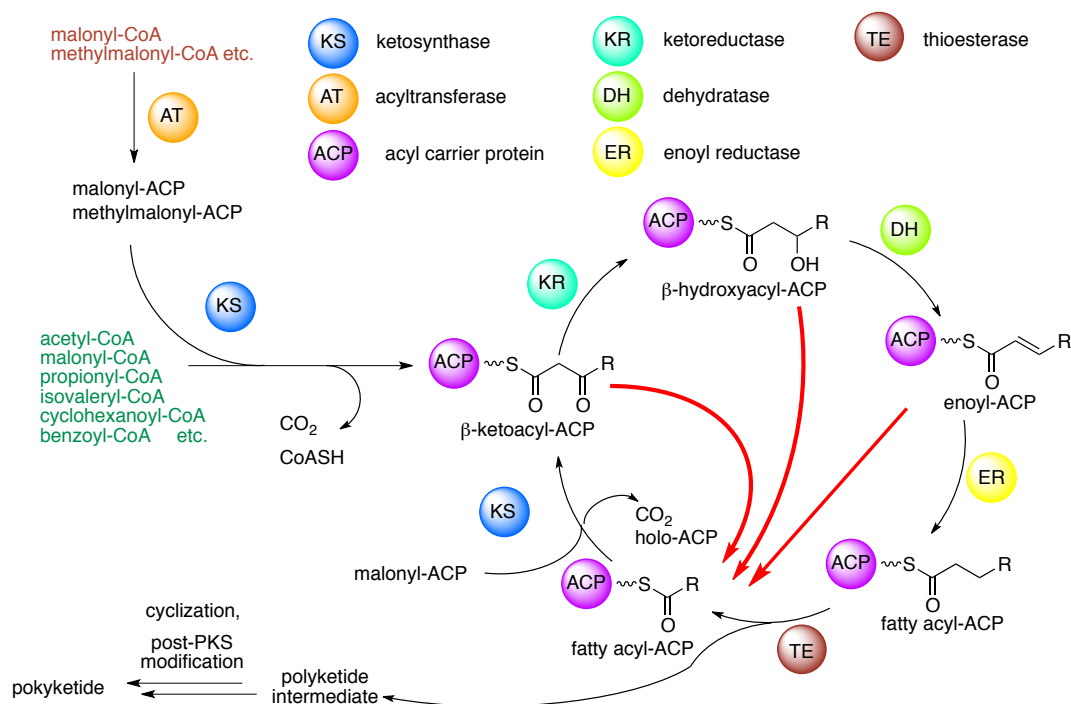
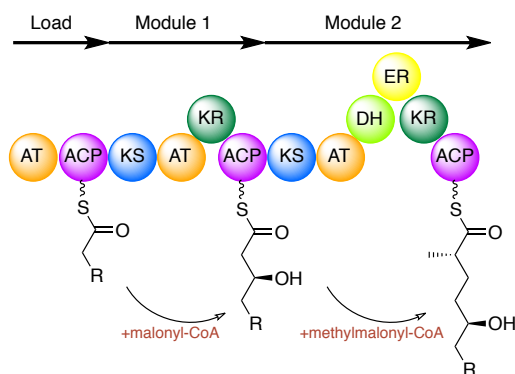


Figure1-6. PKSが触媒するポリケタイドの合成。スターター基質を緑、伸長鎖基質を赤で表す。

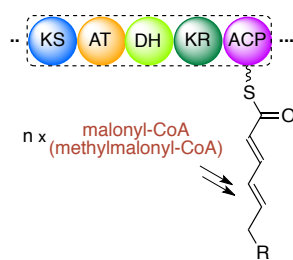
ポリケタイド合成酵素 (PKS) が作り上げる構造多様なポリケタイドは医薬品をはじめとする有用化合物の資源として重要であるため、PKSに関する研究は古くから世界中で精力的に行われてきた。PKSの基本構成単位として、KS、AT、ACPドメインが挙げられる。ATはCoAエステル基質の選択、導入を担い、ACPは反応の足場として機能し、KSはポリケタイドの鎖伸長を触媒する。その他に、KR、DH、ERからなるポリケタイ

ド中間体 β 位の修飾を担うドメインや環化を触媒する aromatase (ARO)、cyclase (CYC) ドメイン等が PKS の構成単位として存在する。PKS はその構造および反応様式により、I 型、II 型、III 型に分類される²。FAS の分類と同様に、I 型 PKS は複数の機能ドメインを持つ巨大タンパク質であり、II 型 PKS は異なる機能を持つ複数のタンパク質から構成される。III 型 PKS は特殊な PKS であり、ACP と AT を持たず、KS ホモダイマーのみでポリケタイドの生合成を触媒する。I 型 PKS は、さらにモジュール型と反復型に分類できる。各タイプの PKS の構造と反応様式を Figure 1-7 にまとめた。それぞれのタイプに関する詳細な知見は下の節で順次紹介する。

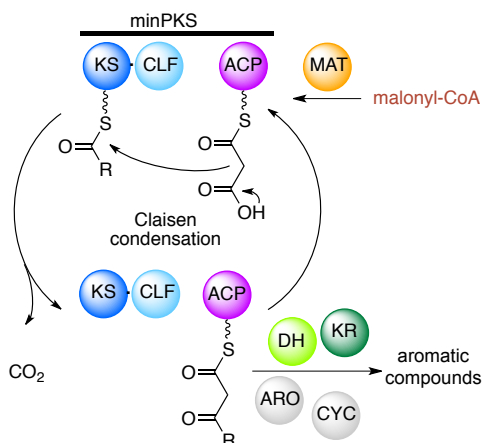
A. Type I PKS (module)



B. Type I PKS (iterative)



C. Type II PKS



D. Type III PKS

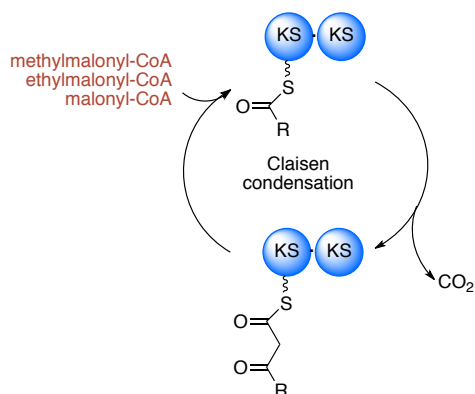


Figure 1-7. PKS の分類。赤い文字で伸長鎖基質を示した。A、I 型 PKS は複数の機能ドメインが連なったモジュール構造を有している。モジュール型 I 型 PKS では、一つもしくは複数のモジュールが一つのポリペプチド上に繋がり、それぞれの機能ドメインが順番に酵素反応を触媒し、ポリケタイドを合成する。(B) iterative 型の I 型 PKS は一つのモジュールを繰り返し触媒に用いる。(C) II 型 PKS は異なるタンパク質として存在する機能サブユニットからなる。(D) III 型 PKS は KS のホモダイマーのみにより構成される。

1) I型 PKS

I型 PKS は複数の機能ドメインが一つのポリペプチド上に連なった構造を有しており⁴、それぞれの機能ドメインが異なる酵素反応を触媒する。構造とその反応様式により、I型 PKS はさらにモジュール型 (modular type) と反復型 (iterative type) に分類できる。

そのうち、モジュール型 I型 PKS (Figure 1.7 A) は原核微生物に見られ、多くの場合、大環状マクロライドやポリエンを合成する。モジュール型 I型 PKS は脊椎動物型 I型 FAS と類似した構造を有する。各モジュールが形成する反応チャンバー内において、1回の伸長反応サイクルが触媒される。その際、モジュール中の各ドメインは一定の構造変化を示す。そのうち、ACP が最も動的であり、生合成中間体は ACP により各触媒ドメインへ運搬される。また、連なったモジュール間においてポリケタイド中間体が順次受け渡され、複数回の伸長サイクルを経て、ポリケタイド鎖が生成される。ポリケタイド中間体の切り離しを担う TE ドメインは I型 PKS の最終モジュールにのみ存在する。TE は中間体と酵素の間のチオエステル結合を加水分解、もしくは分子内の水酸基などを利用した求核攻撃によるマクロ環化反応を触媒する。

Erythromycin や pikromycin のマクロライド骨格はモジュール型 I型 PKS 生成物の代表例であり、それらの生合成を担う 6-deoxyerythronolide B 合成酵素 (DEBS) と PikPKS の構造解析やそれらの産物の生合成研究がなされている^{4,12-15}。Figure 1-8 に DEBS が触媒する反応様式とその構造を示す。

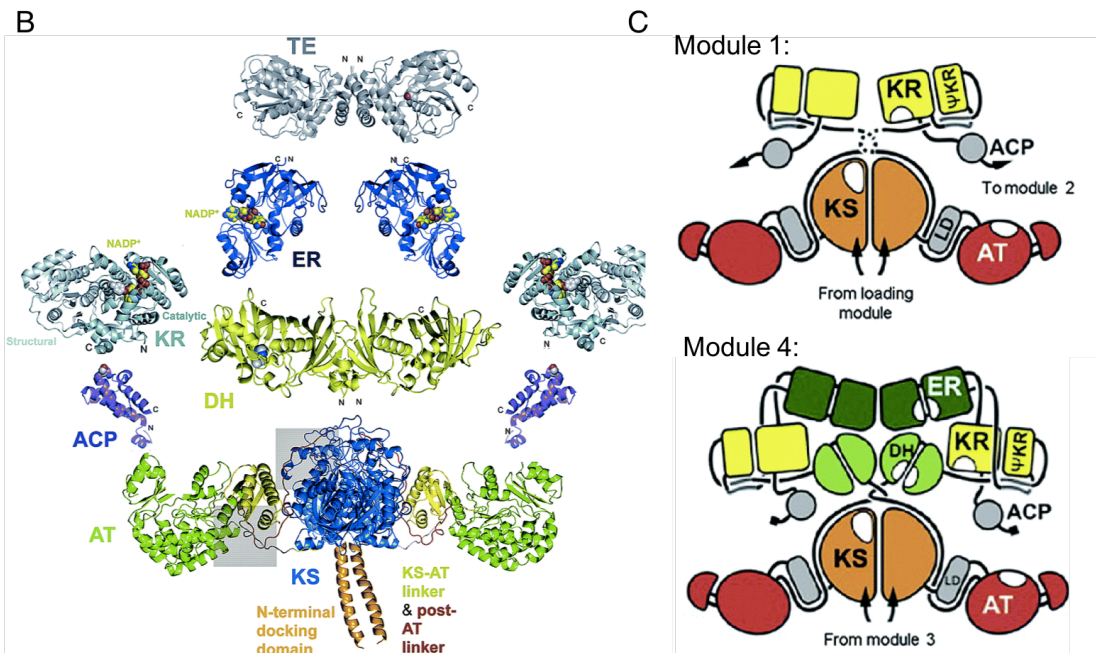
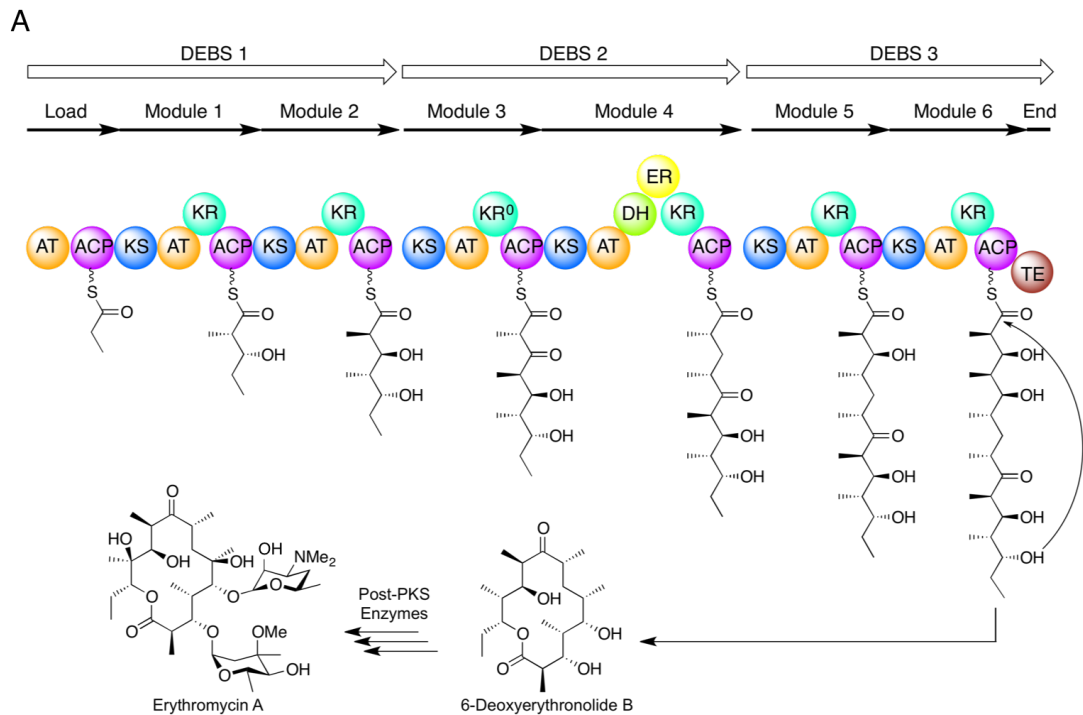


Figure 1-8. DEBS の構造とそれが触媒する反応。A、DEBS が触媒する反応の模式図。ローディングモジュールの AT が開始基質を ACP にチオエステル結合させる。その後各モジュールにより鎖伸長と修飾が触媒され、ポリケタイド鎖が伸長する。最後に、ポリペプチド鎖末端にある TE により、伸び切ったポリケタイド鎖が ACP から切り離され、マクロ環化を経て 6-deoxyerthronolide B が生成される。さらなる post-PKS の修飾により、erythromycin A が生成する。B、DEBS 各ドメイン / ジドメインの高解像度結晶構造。C、DEBS モジュールのモデル構造。(B, C の図は Kira J. Weissman, 2015¹² より引用)

一方、反復型 I 型 PKS (Figure 1-7. B) はカビ、糸状菌や一部の原核微生物に見られ、単一のモジュールで繰り返し鎖伸長サイクルを触媒する。その構造は糸状菌の I 型 FAS と類似している¹⁶。

反復型 I 型 PKS はその最終産物の還元度合いにより非還元型、部分還元型、高還元型に細分化される (Figure 1-9)。ポリケタイドの還元度合いはモジュール中の修飾ドメインに依存する。KR、DH、ER が触媒する修飾反応がスキップされるほど、還元度の低い化合物が生合成される。非還元型 PKS は基本単位である KS、AT、ACP のみを構造中に有しており、ポリケトメチレン骨格を生成する。部分還元型 PKS はその他に KR や DH を構造中に有しており、水酸基や二重結合を合成できる。高還元型 PKS はさらに ER を有し、飽和脂肪鎖を合成できる。

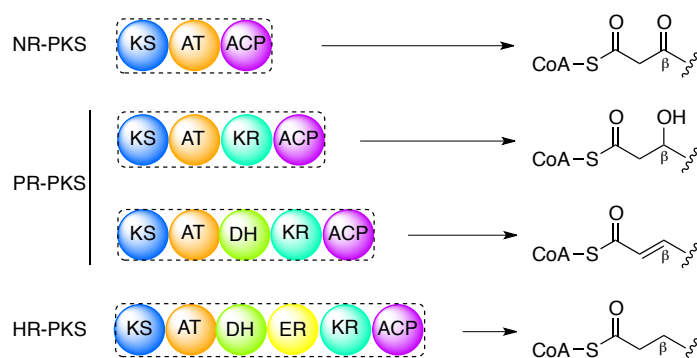
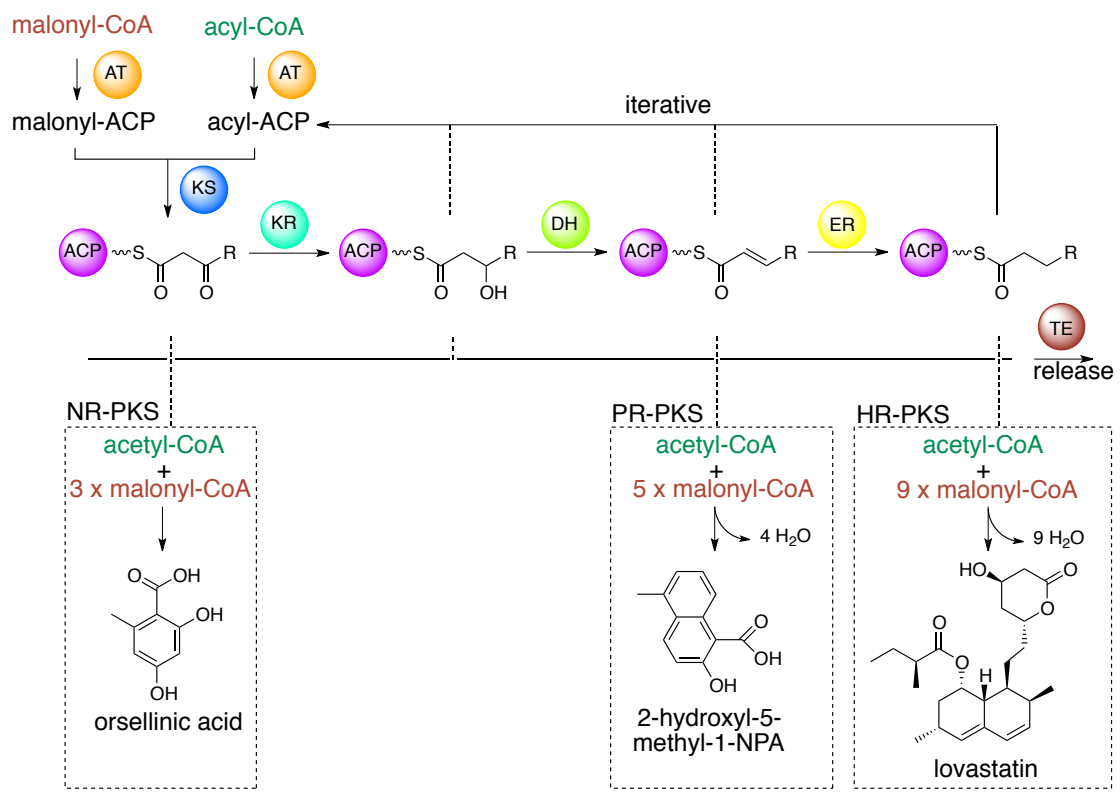
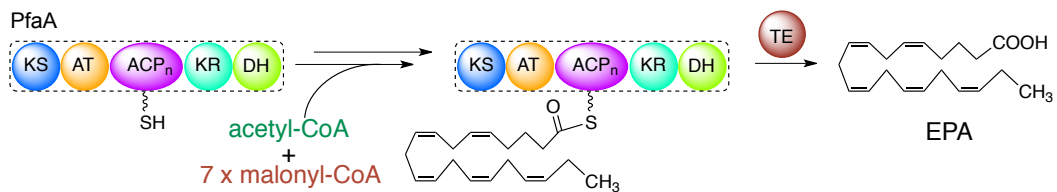


Figure 1-9. 反復型 I 型 PKS の分類と修飾酵素によるポリケタイド中間体 β 位の構造の制御。

反復型 I 型 PKS が触媒する反応の例を Figure 1-10 にまとめた¹⁷。反復型 I 型 PKS は異なる還元度合いの芳香族化合物を合成できる。非還元型 PKS の生産物として、有機酸である orsellinic acid が挙げられる (Figure 1-10. A)。Orsellinic acid はテトラケタイドの環化により生じる最もシンプルな生産物である。部分還元型 PKS 産物の例として、抗癌剤 neocarzinostatin 構成単位中の naphthalinic acid (NPA) が挙げられる。また、高脂血症の治療薬である lovastatin の骨格は高還元型 PKS より合成される。海洋微生物由来の反復型 I 型 PKS は高還元度の PUFA を合成する。PUFA の例として、構造中に多数の *cis* 型二重結合を有するエイコサペンタエン酸 (EPA) やドコサヘキサエン酸 (DHA) が有名である。PUFA 生合成クラスター中にタンデムに並ぶ 5-9 個の ACP は特徴的である (Figure 1-10. B)。放線菌において、最も代表的な反復型 I 型 PKS 産物は特殊な 9 または 10 員環構造を持つ enediyene 抗生物質である。その生合成クラスターは PUFA のものとかかなり類似している (Figure 1-10. C)。Enediyene 生合成において、高還元度のポリケトメチレン鎖中間体が合成される。その後、この中間体はさらに還元や環化などの修飾を受け、enediyene コア構造となる。



B. iterative PKS for PUFA biosynthesis



C. iterative PKS for enediene biosynthesis

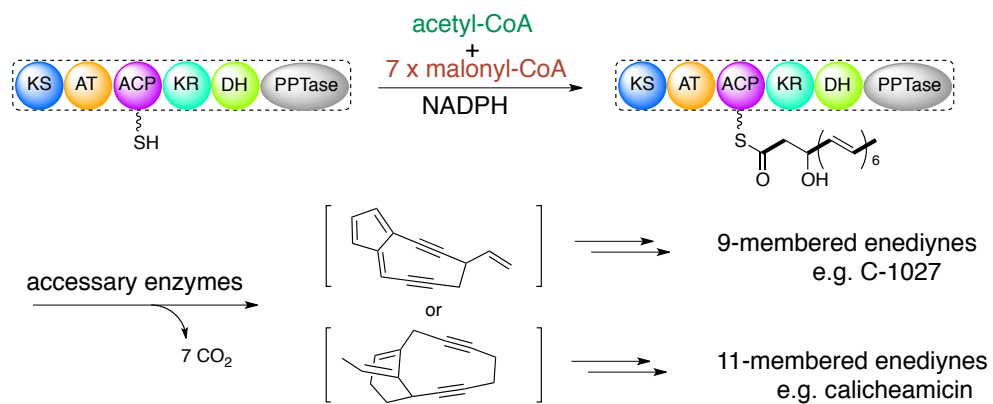


Figure 1-10. 反復型 I 型 PKS のドメイン構成とそれが触媒する反応。

2) II 型 PKS

II 型 PKS において、各触媒ドメインは独立したタンパク質としてコードされており、複数のタンパク質が一時的に複合体を形成し、ポリケタイド生合成を触媒する¹⁸ (Figure 1-7. C)。II 型 PKS は植物や放線菌といった原核微生物に存在し、一般的に芳香環が連なった構造を有する芳香族ポリケタイドを合成する。

II 型 PKS におけるポリケタイド鎖の伸長反応は KS と chain length factor (CLF) が形成するヘテロダイマーにより触媒される。KS は KS_α、CLF は KS_βとも呼ばれる。CLF は KS と配列相同性を示すが、Claisen 縮合の触媒に必須な活性三残基 Cys-His-His が保存されておらず、多くの場合、Gln-Asp-Arg に置換されている¹⁹。そのため、CLF は触媒活性を失っていると考えられている。その代わりに、CLF は KS とヘテロダイマーを形成し、共に反応キャビティーを形成する。キャビティー内において、KS がポリケトメチレン鎖-ACP の伸長を反復的に触媒する。伸長反応の回数はキャビティーの大きさにより制御されるため、CLF は伸長反応の回数、つまりポリケトメチレン鎖の長さを制御すると考えられている²⁰。

また、I 型 PKS と異なり、II 型 PKS は通常、伸長基質である malonyl-CoA の malonyl 基を ACP へ転移させる専用の AT を持たず、FAS の MAT を malonyl-ACP の合成に利用する²¹。同時に、II 型 PKS の ACP は malonyl-CoA 由来の malonyl 基を自身に転移する self-malonylation 活性を有することが *in vitro* 実験により確認されている²²。しかし、malonyl-CoA の濃度が低い生体内で malonyl 基の転移が実際どのように起こるのかは不明である。

前述の II 型 PKS の KS、CLF、ACP から構成されるポリケトメチレン鎖の伸長反応に必須な最小単位をミニマル PKS (minPKS) と呼ぶ。minPKS により伸長されたポリケトメチレン鎖はさらに、KR、DH などの修飾酵素による修飾を受け、aromatase (ARO)、cyclase (CYC) によって環化され、芳香族化合物となる。その際、CYC や ARO の種類によって環化の様式は大きく異なる。

興味深いことに、II 型 PKS では KS-CLF と修飾ドメインが交互に反応を触媒する例が報告されていない。基本的に、KS-CLF が触媒する連続的な縮合反応によりポリケトメチレンが生じ、それに修飾ドメインが作用する。そのため、II 型 PKS は高還元型のポリケタイドを合成できず、比較的還元度の低い芳香族化合物合成に特化していると考えられてきた。高還元型、部分還元型、非還元型に分類される反復型 I 型 PKS と対応させるなら、II 型 PKS は非還元型、非還元型であると考えられてきた。

II型PKSの代表例となる*S. colicolor* A3(2)由来のactinorhodin合成酵素(ActPKS)の反応様式をFigure 1-11に示す。Actinorhodin生合成は連続的なポリケトメチレン鎖伸長反応から始まる。FASから借用したMATにより、malonyl-CoAがActI-3(ACP)にロードされ、malonyl-ACPが生成される。ActI-1(KS)とActI-2(CLF)が形成するヘテロダイマーはmalonyl-ACPの脱炭酸を触媒し、acetyl-ACPを合成する。ActKS-ActCLFヘテロダイマーは生成されたacetylユニットとmalonyl-ACPの縮合を7回繰り返し触媒し、octaketide-ACPを合成する。その後、ActIII(KR)の触媒により、octaketide中間体のC9位のケト基が部位特異的に還元される。還元された中間体はさらにC9位の水酸基の脱水と一連の環化、二量体化を受けて、actinorhodinへと変換される。*In vitro*解析において、修飾酵素を加えず、minPKSのみで反応を行った場合、不安定なオクタケタイトド中間体は非酵素的に環化され、SEK4やSEK4bに変換される。環化を触媒するAROやCYCが欠損している場合にも、非酵素的にシャント化合物が生成される。上記の結果から、適切な触媒サブユニットの存在が、正確な天然物生合成に重要であることが示唆された。

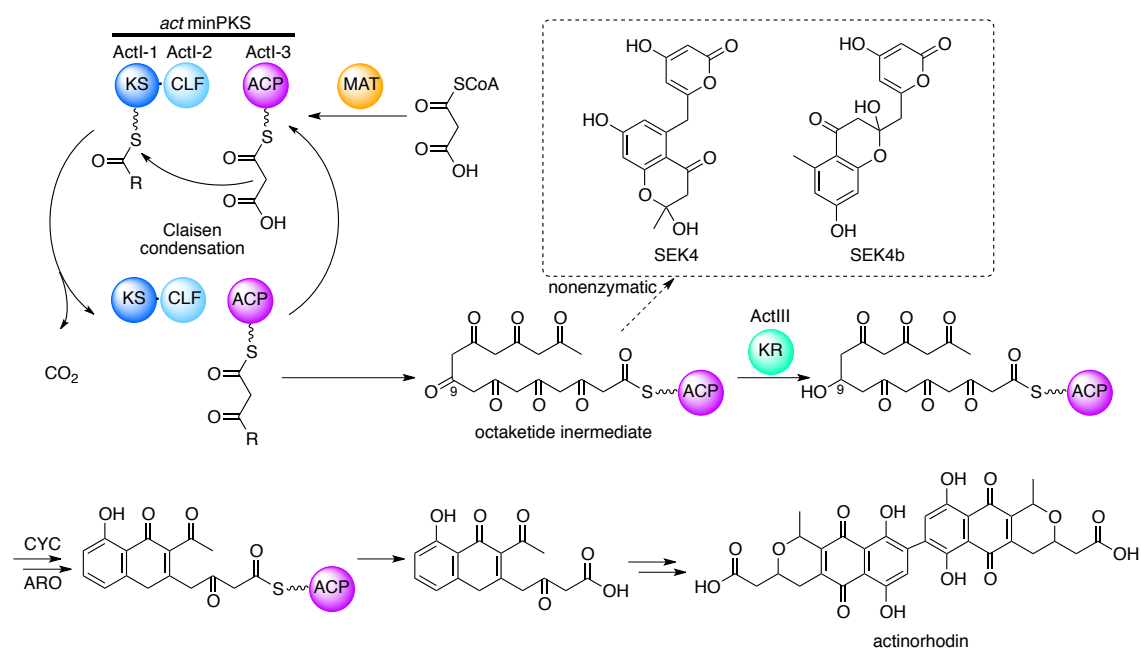


Figure 1-11. Actinorhodinの推定生合成経路。

Actinorhodin 生合成において、最も重要な鎖伸長反応を触媒する ActKS-ActCLF について詳しく説明する。ActKS-ActCLF は溶液中でヘテロダイマーとして存在する (Figure 1-12. A)²³。ActKS、ActCLF は FabB、FabF と同様に、いずれも thiolase superfamily に共通する $\alpha\beta\alpha$ 構造を示す。ActKS は KS の活性三残基を有しており、ポリケトメチレン鎖の伸長反応を触媒する (Figure 1-12. B)。開始基質である malonyl-CoA や伸長中のポリケトメチレン鎖は活性 Cys にロードされる。2つの活性 His は malonyl ユニットの脱炭酸とポリケトメチレン中間体の α -ケト基の安定化に関与する。ActKS の活性 Cys から ActCLF に向けて、反応キャビティーが伸展している。キャビティーの底に存在する ActCLF 由来の Phe'116 により、伸長中のポリケトメチレン鎖の長さが制限される。ActCLF は KS の活性三残基が保存されておらず、独自の反応キャビティーも有さない。そのため ActCLF は脱炭酸も鎖伸長も触媒せず、ポリケトメチレン鎖の鎖長制御のみに関与すると考えられる。

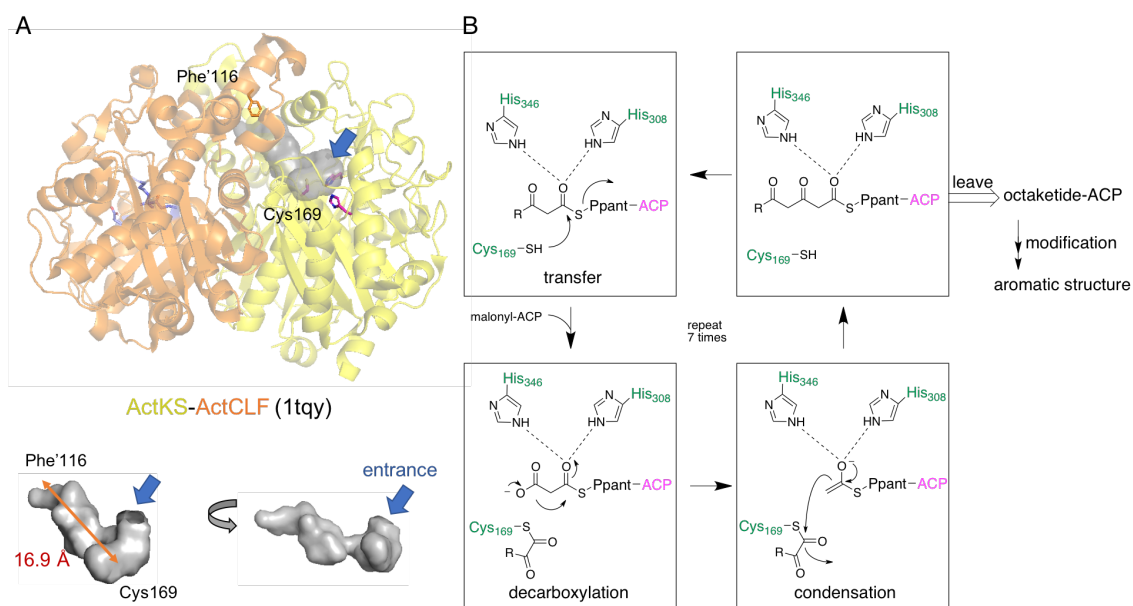


Figure 1-12. ActKS-ActCLF 複合体の立体構造とその触媒機構。A、ActKS-ActCLF(PDB ID: 1TQY) のリボン図とその反応ポケット。黄色で KS、オレンジで CLF を表す。ActKS では Cys-His-His (マゼンダ) からなる活性残基が保存されているが、ActCLF においてそれに相当するものが Gln-Asp-Arg (ラベンダー) に置換されている。伸長反応中のポリケトメチレン鎖は KS 活性 Cys から CLF Phe 116' (オレンジ、スティック) へ伸長する約 16.9 Å のキャビティーに收容される。青矢印でキャビティーの入り口を示す。B、ActKS-ActCLF の触媒機構。

3) III 型 PKS

III 型 PKS は AT や ACP を必要とせず、CoA 体を直接反応に用い、KS ホモダイマー単独で複数回の伸長反応を触媒する^{24,25}。III 型 PKS が触媒する一連の縮合、環化、芳香化反応により、芳香族ポリケタイドが合成される。III 型 PKS には多様な基質特異性、鎖伸長回数、環化様式が存在する。そのため、III 型 PKS はフラボノイド骨格、スチルベン骨格、アクリドン骨格、ベンザルアセトン骨格といった多様な骨格を合成できる。代表的な III 型 PKS、chalcone 合成酵素 (CHS) の反応様式と結晶構造を Figure 1-13 に示す²⁶。CHS はホモダイマーを形成しており、各 KS モノマーにおいて、KAS III の活性三残基である Cys-His-Asn が保存されている。そのため、ポリケタイド合成は両方のモノマーにおいて行われる。CHS は *p*-coumaroyl-CoA をスターター基質として認識し、それを伸長鎖基質である malonyl-CoA と 3 回繰り返し縮合させ、naringenin の前駆体である chalcone を合成する。

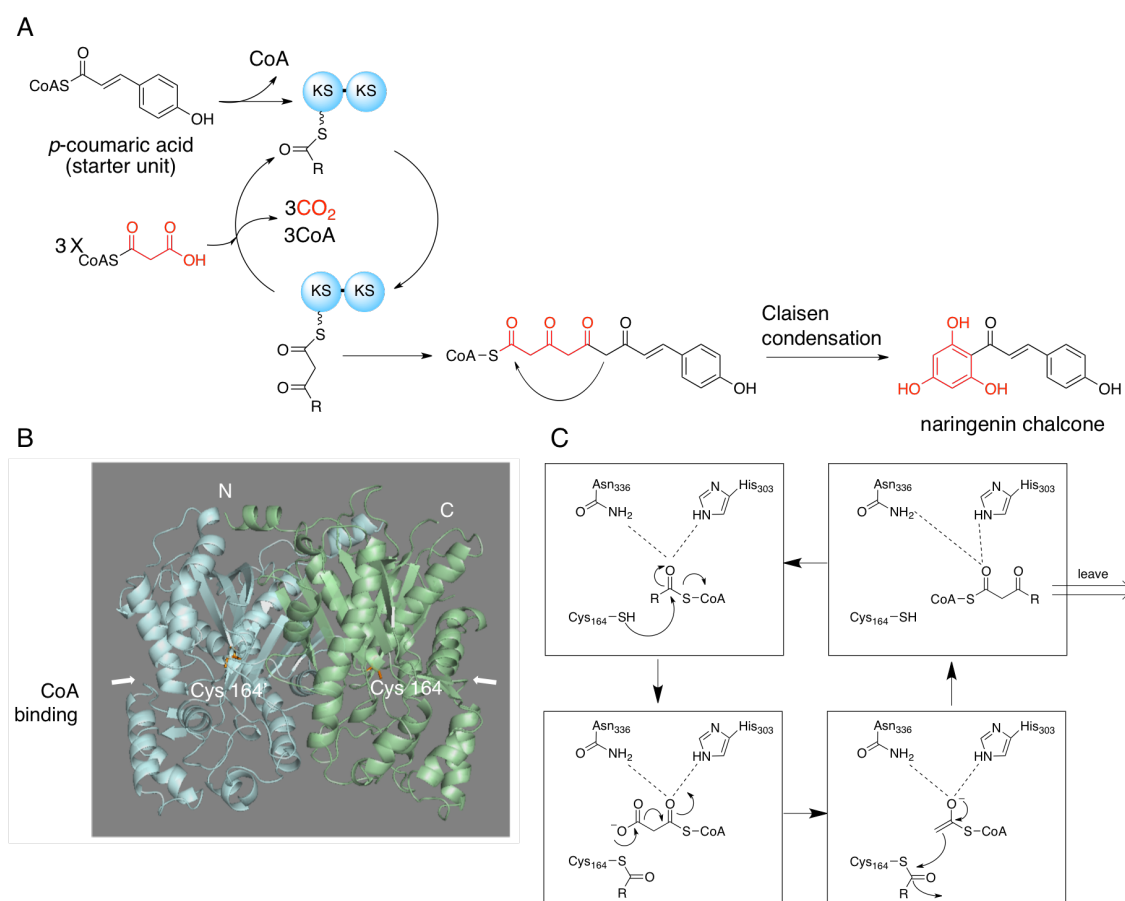


Figure 1-13. CHS が触媒する反応とその立体構造。A、CHS が触媒する反応。B、CHS ホモダイマー (PDB ID: 1CGK) の立体構造のカートゥーン図。2つの KS モノマーをそれぞれ水色と緑色のリボンで表した。緑色の鎖の方の N 末と C 末を標識した。オレンジ色のスティックで活性残基 Cys164 を示した。矢印で基質の入り口を示した。伸長鎖基質である malonyl-CoA 由来の部位を青色で示した。C、CHS が malonyl-CoA を縮合する際の反応メカニズム。

1.2.4. アシルキャリアプロテイン (ACP)

III 型 PKS は CoA エステルを直接生合成に用いることができるが、I 型と II 型の FAS / PKS では共通して ACP を足場に生合成反応が進行する (Figure 1-14. A)。ACP は活性のない apo 型として翻訳される。その後、holo-ACP synthase / phosphopantetheinyl transferase (PPtase) の触媒により、apo-ACP の Ser 残基に CoA 由来の phosphopantetheine (Ppant) アームがロードされ、活性型の holo-ACP が形成される²⁷。脂肪酸 / ポリケタイド生合成において、生合成中間体はチオエステル結合を介して、holo-ACP の Ppant アームに結合した状態で各触媒ドメインに輸送される。

N-acetylcysteamine (NAC) (Figure 1-14. B) は、Ppant アームの部分構造を有しているため、ACP や CoA のアナログとして、FAS や PKS の *in vitro* 解析に用いられる。Intermediate-ACP や intermediate-CoA の調製が煩雑であるのに対し、intermediate-SNAC 体は比較的容易に有機合成できる。本論文の第三章の実験においても、SNAC 体を用い、PKS の *in vitro* 解析を行った。

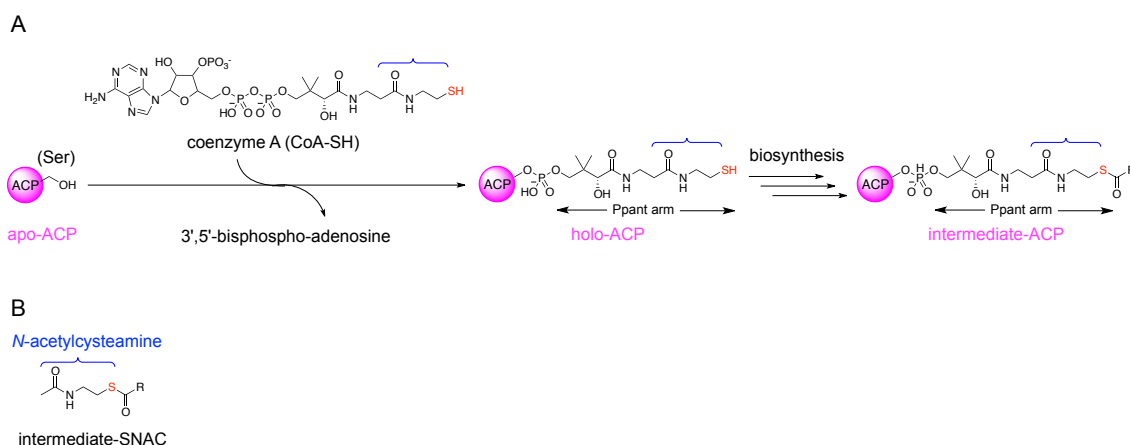


Figure 1-14. ACP の翻訳後修飾、及びそれを模倣する小分子。A、holo-ACP、及び脂肪酸 / ポリケタイド生合成過程において生じる intermediate-ACP の構造とそれらの形成。B、intermediate-ACP を模倣する小分子 intermediate-SNAC 化合物。青い括弧で *N*-acetylcysteamine 部位を示す。

ACP は一般的に分子量 10 kDa 前後の小さいタンパク質である。異なる生合成経路由来の ACP は低い配列相同性 (identity 20%程度) を示すが、高い構造類似性を示す。一般的に、ACP は 4 本の helix より構成され、helix の間で疎水性キャビティーを形成する。II 型 FAS / PKS システム由来の ACP は生合成中間体をこの疎水性キャビティーに収容し、保護する²⁸。一方 I 型システムでは、このような中間体の収容は行われない²⁹。それは、I 型 FAS / PKS の生合成中間体が既に溶液から隔離された反応チャンバー内に存在することに起因すると思われる。Figure 1-15 に異なる生合成中間体を収容した *S. coelicolor* A3(2)脂肪酸合成経路由来 ACP の構造を示す³⁰。

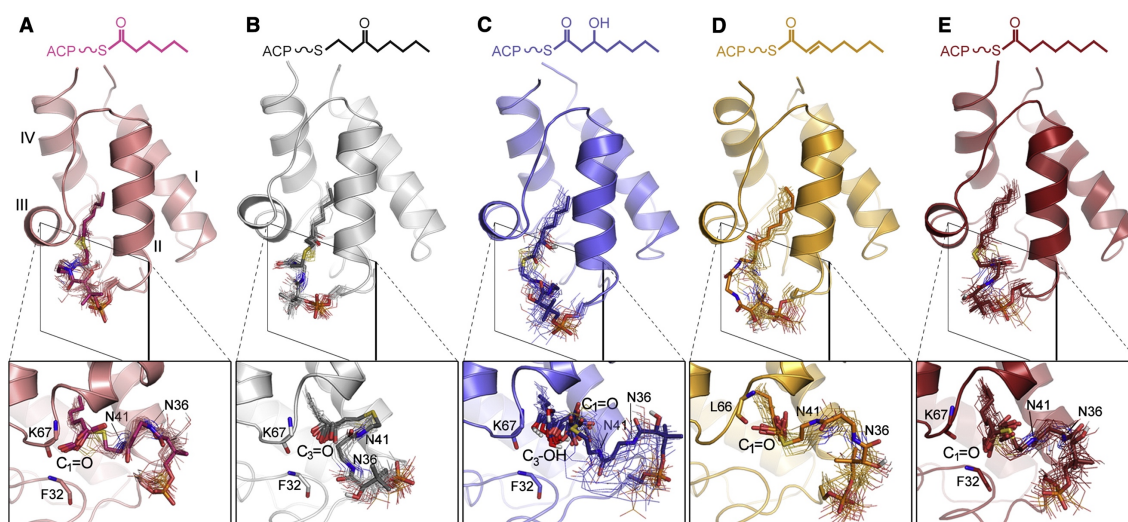


Figure 1-15. 各 ACP の全体構造 (上) と 4'-Pant アームの詳細なコンフォメーション (下)。溶液 NMR より得られたタンパク質の平均構造をリボンで、Ppant 部位をスティックで示す。異なる化学種を収容している ACP はマイルドに異なるコンフォメーションを示す。いずれの場合でも、ACP は脂肪酸生合成中間体を自身の helix II と helix III 間のキャビティーに収容する。(E. Ploskon, 2010³⁰ より図を引用)

1.2.5. ポリケタイド生成における立体制御

ポリケタイドの立体構造はその生理活性に大きく影響する。PKS の各触媒ドメインは厳密な立体特異性を示し、生成物の立体制御を行っている^{31,32}。例えば、I 型 PKS において、KR が触媒する還元反応は、立体特異的に進む。その立体選択性は KR ドメインのアミノ酸配列上に存在する幾つかのフィンガープリントから予測できる (Figure 1-16)³³。KR に続き、DH ドメインが PKS モジュール内に存在する場合、水酸基が脱水され、生じる二重結合の *Z/E* 体も KR 立体特異性により決定される。(S) 体の水酸基が脱から *Z* 体の二重結合が生じ、(R) 体の水酸基のから *E* 体の二重結合が生じる。

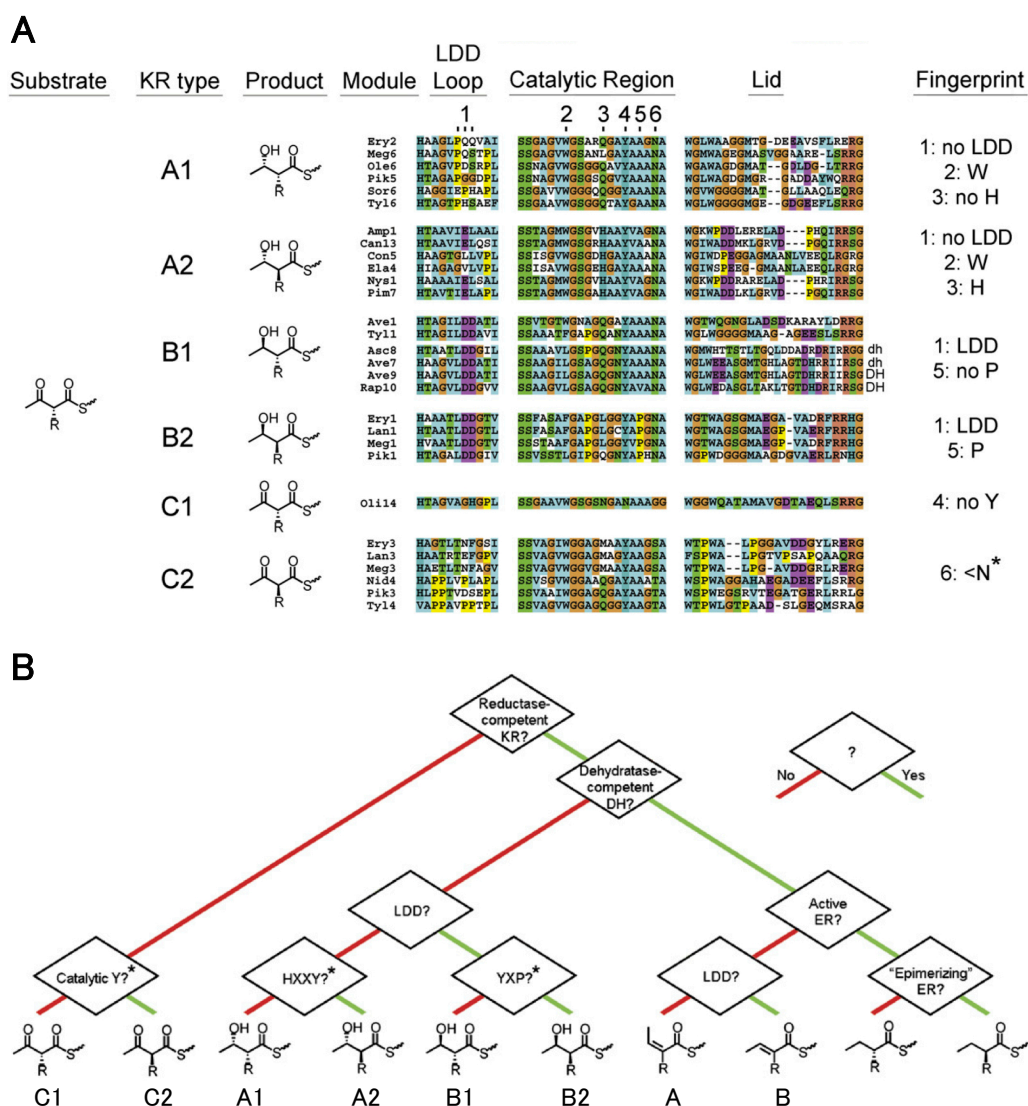


Figure 1-16. KR ドメインの分類法とそれによるポリケタイド生成物の立体構造の予測 (Keatinge-Clay, 2007³³ より一部改変)。(A) KR ドメイン配列上のフィンガープリントによるタイプ分け。(B) KR ドメインのタイプ分けのフローチャート。

1.3. 非リボソームペプチド

ポリケタイド以外にも非リボソームペプチドが有名な天然物として知られている。非リボソームペプチド (NRP) はアミノ酸を構成単位とした、リボソームを経由せずに、非リボソームペプチド合成酵素 (Nonribosomal peptide synthetases, NRPS) の触媒により合成される化合物の総称である³⁴。NRP は多様な構造を有しており、様々な生理活性を示す。その例として、抗生物質である vancomycin や tyrocidine、真菌により生産される免疫抑制剤である環状ポリペプチド cyclosporine などがあげられる。また、ポリケタイドと非リボソームペプチドのハイブリッド化合物もしばしば天然から単離されており、それらのうちには有用な生理活性を示すものが多く存在する。

I 型 PKS と類似して、NRPS は直列に並んだ複数のモジュールにより構成される (Figure 1-17)^{35,36}。NRPS のモジュールはさらに複数の機能ドメインにより構成される。鎖伸長に必須なコアドメインとして adenylation (A) ドメイン、peptidyl carrier protein (PCP) ドメイン、condensation (C) ドメインの3つが挙げられる。NRP 生合成の際 (Figure 1-12)、PCP は PKS における ACP と同様に、PPTase により Ppant 化され、反応の足場として機能する。A ドメインはアミノ酸基質の認識を担い、基質となるアミノ酸を AMP 体に変換し、PCP へロードする。この時に非タンパク質性のアミノ酸が取り込まれることもあり、その結果、NRP の構造が多様になる。A ドメインの基質選択性はそのアミノ酸配列からある程度予測できる。よく使われる予測ツールとし NRPSpredictor2³⁷ が挙げられる。隣り合う PCP に結合しているアミノ酸残基は C ドメインの触媒により縮合し、ペプチド結合が形成される。この時、C ドメインはその C 末端側 PCP ドメインに結合したアミノ酸内の NH₂ 基が、N 末端側 PCP ドメインのチオエステル結合に対する求核攻撃を触媒する。コアドメイン以外に、NRPS のモジュール中に C ドメインの代わりに存在するヘテロ環化 (Cy) ドメイン、修飾反応を触媒する酸化ドメイン (Ox)、エピマー化 (E) ドメインなどの修飾ドメインが存在し得る。多くの修飾や多様な環化様式は NRP の構造多様性に貢献する。一般的に、NRPS の最終部位に TE ドメインが存在する。それによりポリペプチドの切り離しが触媒される。その際に、単純なチオエステル結合の加水分解により直鎖ペプチドが形成される場合とポリペプチド鎖のアミノ基や水酸基がチオエステル結合に対して行う求核攻撃により環状ペプチドが形成される場合がある。また、NRP 生合成の際に、特定のモジュールがスキップされることにより、短縮したポリペプチド鎖が生じることもある。

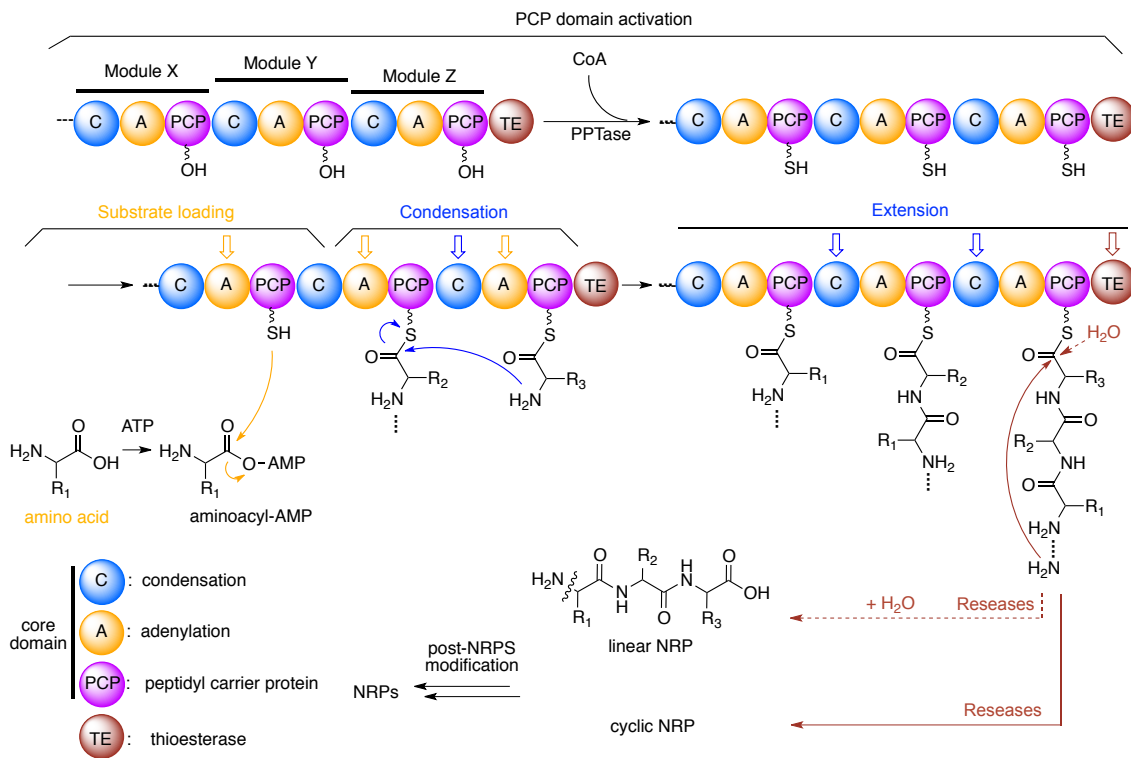


Figure 1-17. NRPS コアドメインと TE ドメインが触媒する NRPs 生合成の模式図。各機能ドメインが触媒する反応を異なる色の矢印で示している。

1.4. Crosslink 技術を利用した PKS、NRPS 酵素ドメイン間相互作用の解析

タンパク質間の一時的な相互作用を捕捉する手法として crosslink 手法が挙げられる。Crosslink 手法では、ポリケタイド / 脂肪酸 / 非リボソームペプチド生合成中間体を模倣し、かつマルチサブユニット間の相互作用をトラップするケミカルプローブを apo-ACP の活性 Ser (本来翻訳後修飾により Ppant アームがロードされる部位) に載せ、crypto-ACP (CoA アナログを載せた ACP) を調製する。利用するケミカルプローブは近傍にあるタンパク質と非特異的に架橋する分子団を弾頭にしたもの (eg. UV 照射により架橋する benzoyl-L-phenylalanine³⁸) や、触媒ドメインの活性残基と特異的に共有結合を形成するもの (eg. 触媒ドメインの活性残基に結合する阻害剤をミミックしたもの) が開発されている。そのため、Crypto-ACP は触媒ドメインと安定な複合体を形成できる。Crosslink に用いる幾つかのケミカルプローブの例を Figure 1-18 に示す。Crosslink 手法と mutagenesis 技術を組み合わせることにより、相互作用に重要なアミノ酸残基をある程度同定できる。変異導入により、crosslink 複合体が生じにくくなれば、変異導入した残基が相互作用に重要であることが示唆される。また、crosslink 手法を用いることにより、PKS-NRPS システムの ACP=trans AT、FAS システムの ACP=DH、ACP=KS (crosslink より形成される共有結合を=で表す) の安定な複合体が調製され、結晶構造が解かれた^{39,40,41}。結晶構造より、PKS / FAS / NRPS システム内におけるタンパク質間の相互作用部位が同定され、キャリアプロテインが仲介する生合成経路における ACP の役割に関する知見が得られた。一般的に、PKS / FAS ACP は触媒ドメインと電荷的に相補する相互作用面を有しており、Ppant アームを介して、基質を触媒ドメインの奥深い活性ポケット内に輸送する。

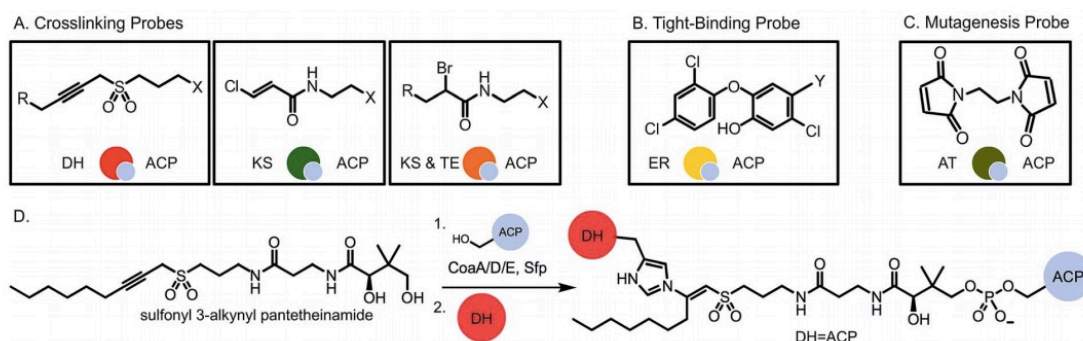


Figure 1-18. Crosslink 手法に用いられるケミカルプローブの例。A、触媒メカニズムベースのプローブ。B、ER の阻害剤構造を有する Tight binding プローブ。C、チオールと非特異的に結合する mutagenesis プローブ。D、Sulfonyl-3-alkynyl pantetheinamide プローブと結合した ACP の調製、及びそれを利用した ACP と DH の複合体形式。図は Chen, 2018, *Nat. Prod. Rep.* より引用⁴³。

最近では、オキセタン構造を有するポリケタイドアナログの開発がさらに報告された。それを利用して調製した DpsC (スターター基質のプライミングを触媒する KSIII) と malonyl 伸長ユニットアナログの複合体結晶構造が報告された⁴²。この実験はケミカルプローブを ACP にロードしない状態で行われているが、このように、crosslink probe 弾頭構造を触媒ドメインの基質を模倣できるように設計すれば、基質の触媒ドメイン内における配向や基質と触媒ドメイン間の相互作用様式を調べることができる。

1.5. 研究目的と研究の流れ

本研究では天然物創薬に向けた、新規構造を有する化合物の探索及びその生合成機構の解明を目的とした。それにあたり Figure 1-19 に示すフローチャートに示す流れで研究を行った。本研究は、放線菌休眠遺伝子クラスターの活性化から始まり、そこから、新規化合物の同定、生合成経路の解明、生合成メカニズムの解析へと進むものである。

放線菌休眠遺伝子クラスターの活性化においては、古典的な放線菌培養条件の検討と SARP ファミリー転写活性化因子の過剰発現を併用した。当手法が放線菌休眠遺伝子クラスター活性化に有用であることが本論文第二章の結果より示された。

次に、休眠遺伝子クラスターの活性化により生産が促進された化合物の単離と同定を行い、新規化合物 *ishigamide* を発見した。遺伝子破壊実験により、*ishigamide* の生合成遺伝子クラスターを同定した。*In silico* 解析により、*ishigamide* ポリエン骨格の生合成に新規な高還元型 II 型 PKS、IgaPKS が関与することが示唆された。IgaPKS の各構成要素を組換えタンパク質として調製し、そのポリエン合成能を *in vitro* 解析により明らかにした。それにより、PKS の進化、分類、触媒能に関する知見を広げた。

その上で、IgaPKS の X 線結晶構造解析を行った。本論文において、ActKS-ActCLF に続く KS-CLF 結晶構造の二例目、基質結合型 KS-CLF、KS-CLF と ACP が形成する三者複合体結晶構造の初の例を記述する。構造から IgaPKS の触媒における分子メカニズムに関する知見を得られた。また、これら結晶構造の解明により、異なる II 型 FAS / PKS システム由来の KS ホモダイマー、KS-CLF ヘテロダイマーの相違点や ACP と KS-CLF 間の相互作用についての議論が可能になった。

最後に、IgaPKS システムにおけるタンパク質間相互作用について調べた。それにより、ACP が仲介するポリケタイド中間体輸送に関する知見が得られた。

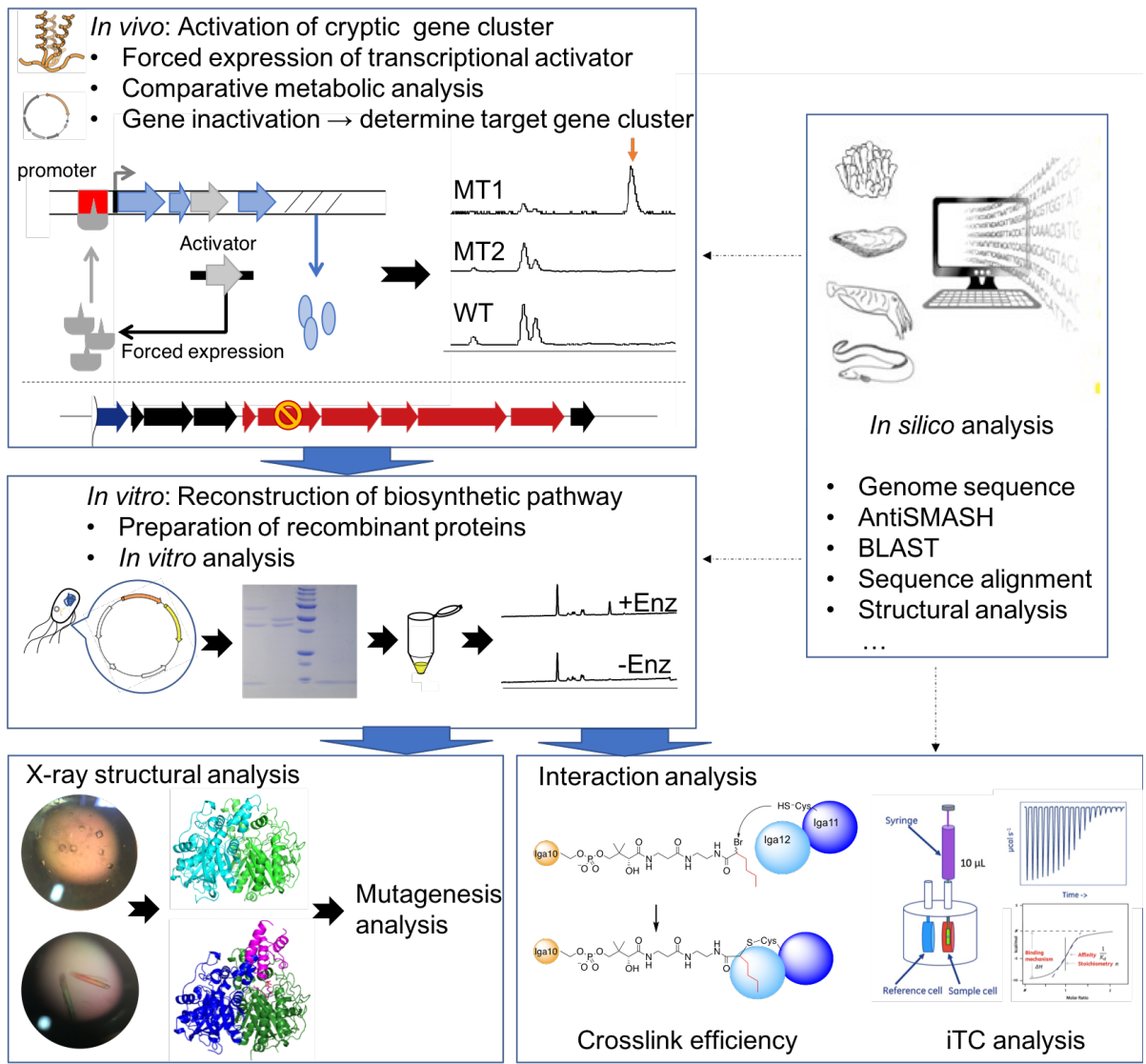


Figure 1-19. 本研究の流れ。

第二章 SARP ファミリー転写活性化因子の強制発現による休眠生合成遺伝子クラスターの活性化

2.1. 背景

2.1.1. 放線菌における休眠生合成遺伝子クラスターの活性化による新規天然物の探索

これまでに *Streptomyces* 属放線菌から、様々な生理活性を持つ二次代謝産物が単離された。しかし、近年急速に蓄積しつつある放線菌のゲノム情報から、これまでに報告された化合物の数を遥かに上回る推定二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかとなった⁴⁴。これは放線菌が潜在的に持つさらなる物質生産能を示している。生合成遺伝子が同定されているにもかかわらず、その二次代謝産物が見出されていない理由の一つとして、二次代謝産物遺伝子クラスターが実験室で用いられている条件では発現せず、「休眠」していることが考えられる。このような休眠遺伝子クラスターの活性化により、新規な構造や機能を有する化合物の取得が期待できる。

これまでに多くの休眠遺伝子クラスターの活性化手法が報告されている^{45,46}。1つの微生物が異なる培養条件においては異なる物質を生産することが知られている。この現象を利用し、微生物の培養条件を検討することで微生物の新たな代謝産物を探索する one strain many compounds (OSMAC) 手法⁴⁷は昔から新規天然物の探索に活用されてきた。また、微生物の遺伝子情報に依存せず、ターゲットを絞らずに休眠遺伝子クラスターの活性化を目指す研究手法として、リボソーム工学⁴⁸、複合培養⁴⁹、小分子誘導剤の添加⁵⁰などが挙げられる。さらに、近年発展しつつある遺伝子操作を利用し、遺伝子クラスターの異種発現⁵¹や転写制御因子活性化/不活性化^{52,53}などにより、休眠二次代謝遺伝子を活性化する手法が開発されている。これら遺伝子情報に依存する手法のうち、推定生合成遺伝子クラスターの活性化因子の強制発現にはクラスター全体に関する正確な情報を必要しない。加えて、操作するのがクラスターではなく、1つの遺伝子だけであるため、比較的労力と時間も要さない。また、本来の化合物の生産菌を直接操作することにより、微生物ゲノム上の離れた遺伝子座に生合成遺伝子クラスターが存在しても、それにアクセスできるといった利点がある。本章では、転写活性化因子の強制発現により、休眠生合成遺伝子クラスターの活性化を試みることにした。

2.1.2. SARP ファミリー転写活性化因子

本章では放線菌が有する *Streptomyces* antibiotic regulatory protein (SARP) ファミリー転写因子を強制発現させることにした。SARP はその大きさやドメイン構成によって分類できる⁵⁴。SARP は基本的に N 末端の helix-turn-helix (HTH) DNA 結合ドメインと転写シグナルを認識する bacterial transcriptional activator domain (BTAD) ドメインを有しており、遺伝子クラスターのプロモーター領域に結合し、その下流の転写を活性化する。この2つのドメインだけを有する比較的小さい 300 aa 程度の SARP は small SARP と呼ばれる。一般的に、small SARP は、二次代謝産物生合成クラスターの近辺に cluster-situated regulator (CSR) としてコードされており、そのクラスターの経路特異的な転写活性化因子として働く。*S. coelicolor* A3(2)の actinorhodin 生合成クラスターにコードされている ActII-ORF4⁵⁵ は経路特異的な CSR small SARP の代表例である。一方、small SARP が自身の位置するクラスター以外の生合成遺伝子クラスターに影響を与える例も報告されている。例えば、*S. antibioticus* 由来の休眠 II 型 PKS 生合成遺伝子クラスターを *S. coelicolor* A3(2) で異種発現する際に、ActII-ORF4 がこのクラスターを活性化することが知られている⁵⁶。CdaR と相同性を示す長さ 600 aa 程度の SARP は medium SARP と呼ばれる。DNA 結合ドメインと BTAD 以外に、ATPase ドメインと tetratricopeptide repeats (TPRs) を有する SARP は large SARP と呼ばれ、その長さは 1000 aa 程度である。Large SARP は、特定の二次代謝産物生合成遺伝子クラスター中にコードされておらず、グローバルに二次代謝に影響することが報告されている。例えば、AfsR 型の SARP はリン酸化リレーなどを介して、グローバルに放線菌の二次代謝や形態分化を制御している⁵⁷。

SARP の強制発現は休眠遺伝子クラスターの活性化に有用であると考えられる。また、SARP の分類に関わらず、1 つの SARP の強制発現が多くの代謝産物に影響を与える可能性が期待される。

2.1.3. 放線菌 *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 とそのドラフトゲノム解析

Streptomyces sp. MSC090213JE08 (以下 JE08 株と略す) は石垣島で単離された放線菌であり、streptazone E と okicenone (Figure 2-1) の生産菌である⁵⁸。この2つの化合物は珍しい骨格を有しており、その生合成に大変興味を持たれた。

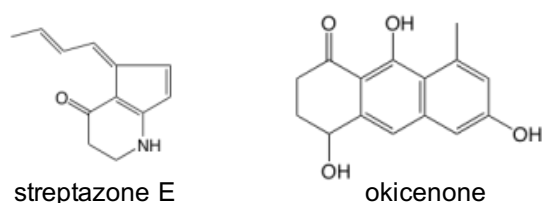


Figure 2-1. streptazone E と okicenone の構造。

Streptazone E と okicenone の生合成遺伝子クラスターを同定するため、JE08 株のドラフトゲノムシーケンスが行われた。ドラフトゲノム解析より、streptazone E と okicenone の生合成遺伝子クラスターが予測された。当研究室の大野らが行った実験において、streptazone E 生合成クラスター中の I 型 PKS 遺伝子や環化酵素を破壊した際に streptazone E の生産が消失し⁵⁸、okicenone 生合成クラスター中に存在する II 型 PKS の KS 遺伝子をアプラマイシン耐性遺伝子に置き換えた際に okicenone の生産が消失した。この結果から、予測された生合成遺伝子クラスターが確かに上記2つの化合物の生合成を担っていることが明らかになった。上記2つの生合成遺伝子クラスター中には SARP 遺伝子がそれぞれ存在しているが、その強制発現による化合物の生産量の増大は見られなかった。(大野、2013、修士論文)

また、バイオインフォマティクス解析により、JE08 株のドラフトゲノムには、streptazone E と okicenone の生合成遺伝子クラスター以外にも幾つかの推定二次代謝産物生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかになった。そこには放線菌 JE08 株の新規二次代謝産物生産能が潜んでいると考え、JE08 株を休眠生合成遺伝子クラスター活性化の研究対象にすることにした。

2.2. 結果

2.2.1. JE08 株のゲノムマイニング

antiSMASH⁵⁹ を用いて JE08 株のドラフトゲノムを解析したところ、27 の推定二次代謝生合成遺伝子クラスターが見出された。そのうちの 5 つが PKS、4 つが PKS-NRPS ハイブリッド、3 つが NRPS、3 つが siderophore、3 つが terpene の生合成遺伝子クラスターであり、残りの 9 つがほかの代謝産物関連の遺伝子クラスターであると予想された。27 の推定二次代謝生合成遺伝子クラスターのうち、生成物が同定されているのは streptazone E と okicenone のみである。残り 25 個のクラスターは生産物が同定されておらず、実験室条件では発現していない休眠生合成遺伝子である可能性が考えられた。転写活性化因子の強制発現によりこれらの遺伝子クラスターを活性化し、その生産物を探索することにした。

そこでまず、放線菌 JE08 株がコードする転写活性化因子の探索を行った。Actinorhodin 生合成遺伝子クラスターにおける SARP ファミリー転写活性化因子 ActII-ORF4 (AAK32147.1) をクエリーに用いて、JE08 株ドラフトゲノムにコードされるタンパク質ライブラリーから BLASTp 検索を行った。その結果、10 個の転写活性化因子が見出された (Figure 2-2)。これらのタンパク質を SARP1 から SARP10 と命名した。

これらの SARP のドメイン構成 (Figure 2-3)、ActII-ORF4 との相同性や周辺遺伝子の情報を Table 2-1 にまとめた。SARP1、6、7、10 は HTH DNA 結合ドメインと BTAD ドメインのみを有しており、small SARP に分類される。一方、SARP2、3、4、5、8 と 9 は前述の 2 つのドメイン以外にも ATPase ドメインと TPRs 配列を有しており、large SARP に分類される。また、SARP4 遺伝子は streptazone E 生合成クラスター中に、SARP6 遺伝子は okicenone の生合成クラスター中に存在していた。残り 8 つの SARP 遺伝子はそれぞれゲノム上の離れた位置にコードされている。そのうち、SARP1、3、7、10 は CSR SARP であり、経路特異的な転写活性化因子として機能する可能性が高い。CSR SARP の強制発現より、対応するクラスターが活性化され、新たな二次代謝産物の生産に繋がると期待される。一方、SARP2、5、8、9 の近傍には明確な生合成遺伝子クラスターが存在しておらず、これらの SARP が放線菌の代謝プロファイルにグローバルに影響する stand alone な large SARP であると予想される。これらの SARP を強制発現することにより、幾つかの二次代謝産物の生産が活性化されると期待される。今回、ゲノムマイニングにより見出された未知の代謝産物の生産に関与すると思われる 4 つの CSR SARP と 3 つの stand alone large SARP (Table 2-1、アスタリスク) を強制発現し、それらが制御しているクラスターの代謝産物を探索することにした。


```

1          10          20          30          40          50          60
Act-ORF4 MRFNLLGRVHVITDAGCVIPLKSSKATQFLVLLLRHEV
SARP1     MIAATLAAGRA
SARP2     MEEFVLCGLEVRTDGSRPVVRVPEVKVRMLLADLAHQGOV
SARP3     MADVSPADAHVPLGLVLCGLVTAWDADGNTIALKGRPHRSVTLARLTVARGRV
SARP4     MWERVLCGLEVVTSE-RVPLIGGSKORATLGYLLHPNOT
SARP5     MVSDSLQGEVCLGRRGCENAPVRYCVLCGLTTOALRPDGTTPVIGGARLRLATLTVLARGGRS
SARP6     MVTENVLCGLEVIAGGRDLAPT-APRVKAVLALAINANRV
SARP7     MYISLLGPLLIGDGO-RTVGLRAKIRVMTMLANPQOV
SARP8     MDCVPRVPEQRHDFAQDAAEPAALRFVLCGLVRAWR-GEEQLATGSPQORALLAALLREGRT
SARP9     MRYRILGLVTOAEDDQGTVPVGGPRLRALLTALLRPGHL
SARP10    MSVPCLQADLALRYEELLCGRVTR-GGVDLTPPEQPKLTKKLLLRACKT
70          80          90          100         110         120         130
Act-ORF4 VGGSGVLEELWADHPPRSAM-TTLOTYVYHTRRLLEGEHRVTSDDRELVLTOPPGYFALIDEDELD
SARP1     VSNEDELDELWSSGHAIGN-SRNALQATGTRLRRALEPALS-RGGSVLRGVNNGYLLLEVPACVD
SARP2     VPAARLLEDELWGGSTFTARPTASLOAKVSQLRRALQDAEPGA--RELVAHRPPGYLLDIPADALD
SARP3     VPAARLLEDELWDDPAD-PVGAALRTFVAALRRALPEPDRSPRTPARLLEVTGEGPYALRVPMDAID
SARP4     LPTSKELEALWSSVEEAPMTARKILONAIWGLRRALLPS-QDESTSVALRTQSPGYLDDVPPDHID
SARP5     VPAGLLENEVWDGDPPTDAH-GALOALVGRLLRRLG-----ADAVASVEGCVRLVAAPDDID
SARP6     VSTDTLFAELWDDRRPPRSAA-TTLOTYVYQLRRIL-DPLPQGERRCDIVTRAPGYMLDTVPEALD
SARP7     VAFDELLEDELWG-EVPLKNTRNALQANVGRMRRLAEFGFEDPDQTLIRTVDNQGYLLDVPPEALD
SARP8     ATAALELIDALWGEPPSQAL-AALQTYASRLRKLID-----AGVLVSESGGYAVRGLTEGALD
SARP9     TSPDTLLEDDVWAGAPPHDAP-AALQALVARLRRTLG-----KSALTAPGCVRLTATKDDVD
SARP10    VPGERLVAELWEQPPRCAP-ASLRVYVSQLRKILNGP--TGTSPIATTSPPGYILD-VSGATTD
140         150         160         170         180         190
Act-ORF4 VAVAERLIRTCGRLLLEENRLEALASLDAGLDELWRGPALSTVPCGRVLESNIAHLEELRIFGMOL
SARP1     GNRFLDLASQGAHVLPMPERSLEVLQSAALDLWRGPALLDAGDGLRVRGAAALFDERRLTACED
SARP2     AGRFRALVGR--ARAVEDPVKRAALYTEALTLWRGPALFAEFADQPCVRPNAASLEERLITAVEE
SARP3     -AWWFEQAVSDAPKLP--PEEATVRLDEALDRWRGPAYAEFAEQPWARDSRLTELRHLHVEL
SARP4     LHLFHRVWKDGRSRLEAGEPDEAGRLNGALELWRGPALLDVTEGLSWPELSTLESTRLDVLED
SARP5     LHFERLVVGEGLRALADGDPKAAAGALDDALALWRGPALADLPDR--TAAARQETRLDALRA
SARP6     AERELLAETAEQGRCLWRQGHAAEAERLRQALGLWRGRALADINLGPELTIHKHLCELRVLELD
SARP7     AHRFLRMAEKG-AGLVGERPYEARDLRQSLSMWRGPALLDVSDGPRCRAVALRDEQRKTARED
SARP8     LGVAQELAAEAEKARGARDLRCRAEVLRLALALWDCGEVLAVGPG-PYAEAQRVRLBEWRQLRBS
SARP9     LFVEERLVEHGTAAALQDDPSTAAHTLTTALALWRGPALADLPDR--TAAATRPEALRIEATRT
SARP10    FQEEVLYTRGRERYGAADFLHASELLRRASSLWRGPILEGITQGSLDIESFAAVHEERINCLBL
200         210         220         230         240         250         260
Act-ORF4 RIDANWRLCRIGPMIPELRSLVISHPLNETLHAKLMGALCOMGRRAEALESYRNLRRILSDEELGV
SARP1     LVGALISVCDDEARAHAEIRQLLVALHPLRERFCLELMVALYRTGROGEALDLERWTRGRLEDEELGI
SARP2     HAGVRELGEHSLLVGELTELVLVGOHPLREGLRGALMVALYQACRSDDALDHENDLRRLEDEELGI
SARP3     REEALMSLGEADRAAADVRAHAAEHPWRENAWRLALALYRTGROADALEVLHGARTLADQELGI
SARP4     FFETQLVVCGRHQAVLGDLESVVENEPRLRERACGLMRALYRCGROSDALGVFSRLRNLVEDFGL
SARP5     RHAAALALCHADQSLPELTAICDTHPLDEPLQALRLRALRDTGRTAEALAAVEGVRDLADRLGS
SARP6     RIQADARLGRHQELIPELRSLVAEHRLNERLHAQLIDSLRAAGYRAEALRAYQDLRRLVKTTELGL
SARP7     LIEAQIQACEAGVVVAELIKQLLAQYPERERERFSEQLMIALYRCGROSEALIDIFHRTRKWLDEELGI
SARP8     RLDMDEEQGCHAAEAVSDELTAETAEHPLRERLRELMLALYRSRGROEAALAVVADTRRLLADEELGV
SARP9     RMEADLRRGRARSAPPELRELTATHPYDEPLHALLIRALRDTSRPADALAAVEAARRALADGLGT
SARP10    SIDSATLGRHHEVLEDLKLGLVRHPLREPFYRQLMVALYRACROGDALGVRTARRMIREELGI
270         280         290         300         310         320
Act-ORF4 DEETPELORMHMEELNGEK-----
SARP1     QEGAPLORLHAEELAQDPVLR
SARP2     TEGPSLEALQQALTLRHDPVLARPEP-----AAPPA
SARP3     DPGGLRMLLEQDILTRQAEHLDRGNGLDETDRRVRG-----
SARP4     EPPSRELQQLQQALLNHDPDLALVLG
SARP5     DPGPELRSIHGELLRP-TEDAYRGGTGSRTRGAIAYESVHAARIRHDIDTGAVAHDPGPADTDM
SARP6     EEPAEVQRLEQAEVLSGVRSGS-----
SARP7     KPSRRLLHSTYQALQLQADPSSL
SARP8     DPREGLREHQORLQADPALAEPASAPAAEPAAVRVR-----
SARP9     DPGPOLRLAHAEELLSPEADTSPGAPPARTS-----DP---PTPYR
SARP10    EPGPTLRLLAHEALLRADPARLEAAG--VIPAIR
330         340         350         360         364
Act-ORF4 -----VIV
SARP1     ALTPVAEEPVASASPLVGRDEDVGAIRTLSSRRRLVTLT
SARP2     -----RSGGAGR
SARP3     APPPPTGNLRARLTSFVGRESIDALRGDLTAARLVTL
SARP4     -----VSTL
SARP5     PAQLPATVPDFTGRASVSELGEVLASAGGRVMAVSAIA
SARP6     ARPERTGNLRPRLTSFVGRELELDAIRSELHRARLVTL
SARP7     -----
SARP8     -----
SARP9     -----
SARP10    -----

```

Figure 2-2. BLASTp より見出された SARP 転写活性化因子の HTH DNA 結合ドメインと BTAD ドメイン部位のアミノ酸配列アライメント。Actinorhodin 生合成における経路特異的転写活性化因子である ActII-ORF4 (AAK32147.1) をクエリーに BLAST 検索を行った。E-values $<1 \times 10^{-10}$ のものを羅列した。

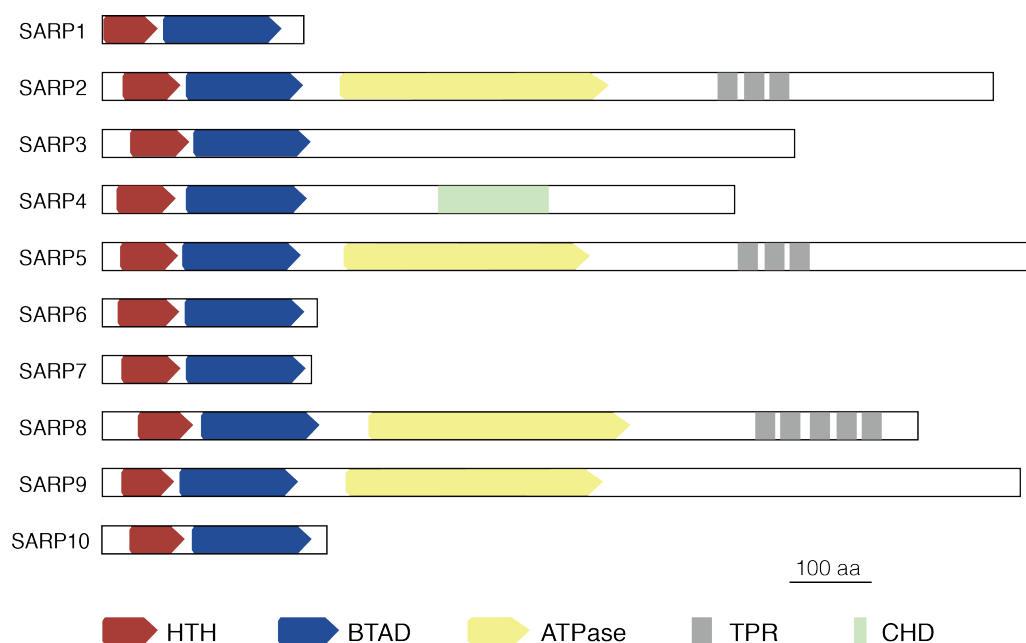


Figure 2-3. BLAST より見出された SARP 転写活性化因子のドメイン構成。HTH: helix-turn-helix DNA binding domain; BTAD: bacterial transcriptional activator domain; ATPase: ATPase domain; TPR, tetratricopeptide repeats; CHD: cyclase homology domain。

Table 2-1. BLAST より見出された SARP 転写活性化因子に関する情報。

	aa	Type	E value	Identity (%)	Product ^[a]
SARP1*	242	small SARP, CSR	5.42×10^{-20}	32.7	prodigiosin-like
SARP2*	1079	large SARP, stand-alone	5.67×10^{-29}	35.3	unknown
SARP3*	837	large SARP, CSR	3.72×10^{-25}	32.1	PK-NRP hybrid
SARP4	791	large SARP, CSR	3.58×10^{-30}	32.4	streptazone E
SARP5	1167	large SARP, stand-alone	7.39×10^{-31}	34.5	unknown
SARP6	260	small SARP, CSR	1.26×10^{-50}	43.9	okicenone
SARP7*	148	small SARP, CSR	3.09×10^{-27}	31.5	PK-NRP hybrid
SARP8*	986	large SARP, stand-alone	2.24×10^{-25}	35.2	unknown
SARP9*	1110	large SARP, stand-alone	4.48×10^{-34}	36.4	unknown
SARP10*	271	small SARP, CSR	7.37×10^{-31}	35.5	polyketide

*強制発現実験に選抜された SARP。

^[a]SARP 遺伝子周辺の遺伝子群により生合成されると予想される二次代謝産物。

2.2.2. JE08 株の転写活性化因子強制発現株の構築

転写活性化因子の強制発現株を構築するために、接合伝達により JE08 株に転写活性化因子の強制発現ベクターを導入した。強制発現ベクターとして、恒常発現する *ermE** プロモーターを有するゲノム組込み型のシャトルベクターである pTYM19ep と恒常発現する *ermE2* プロモーターを有する高コピープラスミド型ベクターである pHKO3 を利用した。pTYM19ep を用いて、SARP1、2、3、7、10 の強制発現株の構築に成功したが、SARP8 と SARP9 の強制発現株を構築することができなかった (形質転換の段階で失敗)。pTYM19ep を用いた SARP8 や SARP9 遺伝子の強制発現が放線菌の生育に悪影響を与える可能性があると考え、比較的発現がマイルドなプロモーター (*ermE2*) を有する pHKO3 を利用した強制発現を試みることにした。実際、pHKO3 を用いて、SARP8 と SARP9 強制発現株の構築に成功した。構築した強制発現株を Table 2-2 にまとめた。また、ネガティブコントロールとして、空ベクターを保持している JE08 株も同様に形質転換により構築した。

Table 2-2. 転写活性化因子の強制発現株と空ベクター保持株の構築。

Strain	Description
JE08NC	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pTYM19ep (empty vector)
JE08NC2	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pHKO3 (empty vector)
JE08S1	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pTYM19ep-SARP1
JE08S2	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pTYM19ep-SARP2
JE08S3	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pTYM19ep-SARP3
JE08S7	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pTYM19ep-SARP7
JE08S8	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pHKO3-SARP8
JE08S9	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pHKO3-SARP9
JE08S10	<i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 harboring pTYM19ep-SARP10

2.2.3. 転写活性化因子強制発現株の代謝解析

pTYM19ep ベクターを用いて構築した転写活性化因子強制発現株と空ベクター保持株 (JE08NC) は MS 固体培地において、野生株と同等な生育速度や胞子形成能を示した。これらの株の代謝比較により、転写活性化因子の強制発現が放線菌の代謝産物に与える影響を調べることにした。一方、pHKO3 ベクターを用いて構築した株は生育速度の低減が観察された。また、pHKO3 空ベクターを導入した株 (JE08NC2) の生育が非常に遅いため、これを代謝比較のネガティブコントロールとして使用するのは不適切であると判断した。従って、2つの pHKO3 ベクターを用いて構築した転写活性化因子強制発現株間の代謝比較、及びそれらと野生株間の代謝比較を行うことにした。

7つの強制発現株と JE08NC を4種類の二次代謝産物生産培地 (ISP2、Bennett Maltose、Q、YMP) で培養し、培養2日目、4日目と7日目においてサンプリングし、amberlite FPX66 レジンを用いて固相抽出を行った。得られた抽出物を LC-ESIMS 解析に供し、各株の代謝プロファイル进行调查し、代謝比較を行った。

その結果、JE08S7 を ISP2 培地で培養した際に、JE08NC 株ではほとんど生産されない化合物 **1** の生産が確認された (Figure 2-4)。後述の実験から、化合物 **1** は不飽和脂肪酸と β -alanine がペプチド結合したものであることが明らかになり、この化合物を ishigamide と命名した。

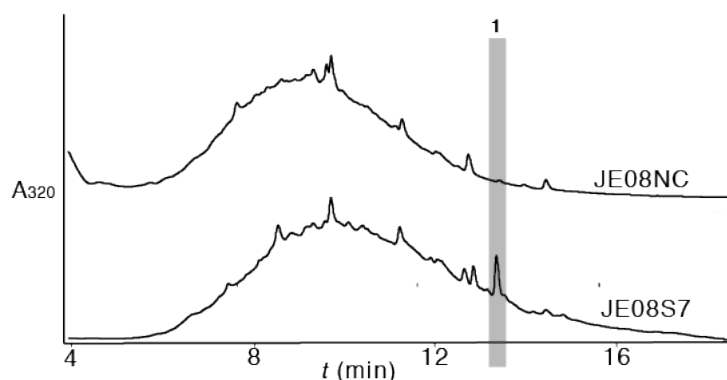


Figure 2-4. LC-MS 分析による JE08NC と JE08S7 の代謝産物の比較。SARP7 の強制発現株 JE08S7 において化合物 **1** (ishigamide) の生産が促進された。

SARP7 以外の CSR SARP (SARP1、SARP3、SARP10) の強制発現が JE08 株の代謝プロファイルに与える影響は、今回の培養、解析条件下において検出されなかった。

一方、stand alone small SARP を強制発現させた三株の強制発現株はそれぞれネガティブコントロールと異なる代謝プロファイルを示した。

JE08S2 を Bennett maltose 培地で培養したところ、2つの化合物 (2、3) の生産が培養初期 (培養2日、4日目) において誘導された。UV スペクトルから、2つの化合物は類縁化合物であると予想される。JE08NC において、化合物 2、3 の生産は培養7日目に見られた。SARP2 の強制発現により、これら化合物の生産時期が早まったと考えられる。この2つの化合物の単離を試みたが、化合物 3 は不安定であり、精製過程において完全分解した。一方、20 L の JE08S2 培養液から 2.1 mg の化合物 2 の単離精製に成功した。HR-ESIMS 解析により、化合物 2 の分子量が 661.10166 であることが示唆された。化合物 2 は親水性が高く、大抵の有機溶媒に溶けず、水、DMSO、MeOH のみに溶ける。そのため、これらの重溶媒を用い、化合物 2 の NMR 解析を行った。一次元の ^1H 、 ^{13}C NMR、Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer (DEPT) 及び二次元の double quantum filtered-correlation spectroscopy (DQF-COSY)、heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy (HMBC)、heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy (HMQC) と nuclear Overhauser effect spectroscopy (NOESY) を測定したが、得られる NMR のシグナルが少なく、構造決定までには至らなかった。この化合物は四級炭素が多い、または対称性が高い化合物であると考えている。

また、JE08S8 を YMP 培地で培養した時に、3つの野生株に生産されない化合物 (4、5、okicenone) の生産が誘導された。Okicenone の生合成遺伝子クラスターは強制発現させた SARP8 遺伝子と 100 kbp 以上離れており、間に ishigamide の生合成遺伝子クラスター (後述) が存在している。このことから、SARP8 は経路特異的でなく、グローバルに JE08 株の二次代謝に影響し、okicenone を含む3つの化合物の生産を促進していると予想される。さらに、JE08S9 を Bennett Maltose で培養した時にも、3つの化合物 (6、7、8) の生産が誘導され、SARP9 もグローバルに放線菌 JE08 株の二次代謝を制御している可能性が示唆された。この結果は2つの転写活性化因子のドメイン構成から推測した機能と一致している (large SARP ファミリーに属する転写活性化因子はグローバルに放線菌の二次代謝を制御する)。

Large SARP の強制発現により生産が促進された化合物群は構造決定に至らなかったため、詳細な記述は省略する (修士論文、投稿論文⁶⁰に記述あり)。

SARP の強制発現が放線菌 JE08 の代謝プロファイルに与えた影響を Table 2-3 にまとめた。7つの SARP 強制発現株のうち4つが特定の培養条件において、ネガティブコントロールと異なる代謝プロファイルを示した。この結果から、特定の培養条件において、SARP の強制発現は放線菌 JE08 における特定の (休眠) 生合成遺伝子クラスターの活性化に有効であることが示唆された。

Table 2-3. Streptomyces sp. MSC090213JE08 に存在する転写活性化因子の強制発現により新たに検出された化合物の数。

Strain	Expression	Culture medium			
	vector	ISP2	Bennett maltose	Q	YMP
JE08S1	pTYM19ep	n.d	n.d	n.d	n.d
JE08S2	pTYM19ep	n.d	2	n.d	n.d
JE08S3	pTYM19ep	n.d	n.d	n.d	n.d
JE08S7	pTYM19ep	1	n.d	n.d	n.d
JE08S8	pHKO3	n.d	n.d	n.d	2
JE08S9	pHKO3	3	n.d	n.d	n.d
JE08S10	pTYM19ep	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: 転写活性化因子強制発現株とネガティブコントロール株の間に代謝プロファイルの差が観察されていない。

2.2.4. Ishigamide の単離と構造決定

Ishigamide の構造を決めるため、JE08S7 株の大量培養を行った。その後、amberlite FPX66 レジンによる固相抽出、EtoAc と水の液液分配、Octa Decyl Silyl (ODS) カラム、ゲルろ過、逆相 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 等の一連の精製方法を用いて、5 L の ISP2 培養液から 0.8 mg の ishigamide を単離した。

HR-ESIMS の解析により、ishigamide ナトリウム塩の分子式が $C_{17}H_{25}NO_4Na$ (m/z 330.16760; calcd. for 330.16813) であることが示唆された。精製した ishigamide を更に NMR 解析に供した。一次元の 1H 、 ^{13}C NMR 及び二次元の DQF-COSY、HMBC、HMQC と NOESY を測定した (Figure 2-5)。NMR 解析から得られた 1H と ^{13}C のケミカルシフトを Table 2-4 にまとめた。

解析の結果、この化合物が 3-((2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)13-hydroxytetradeca-2,4,6,8-tetraenamido)propanoic acid であることが示された (Figure 2-6)。

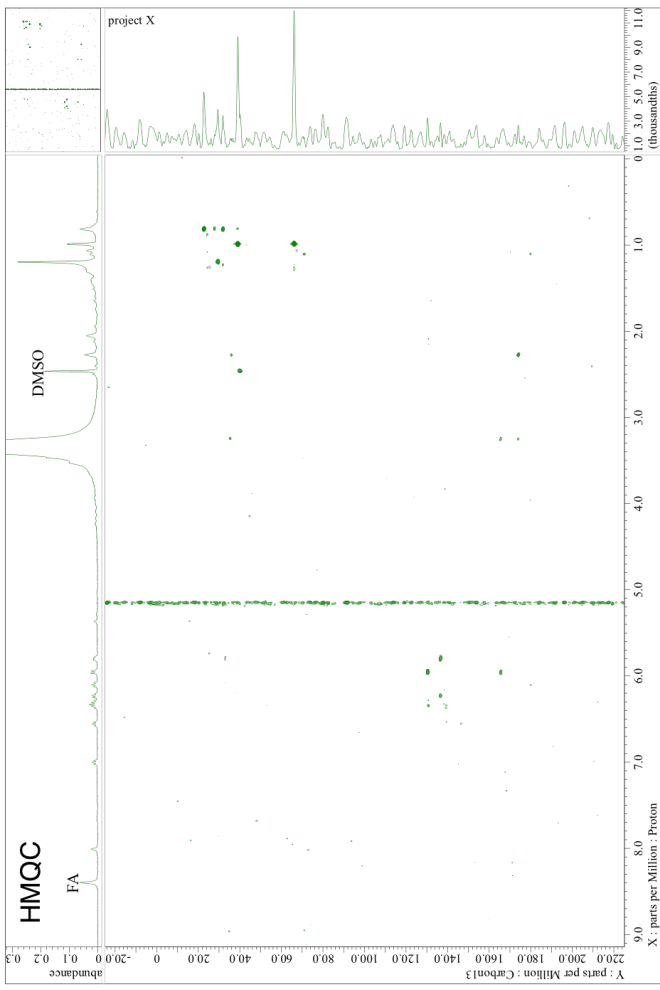
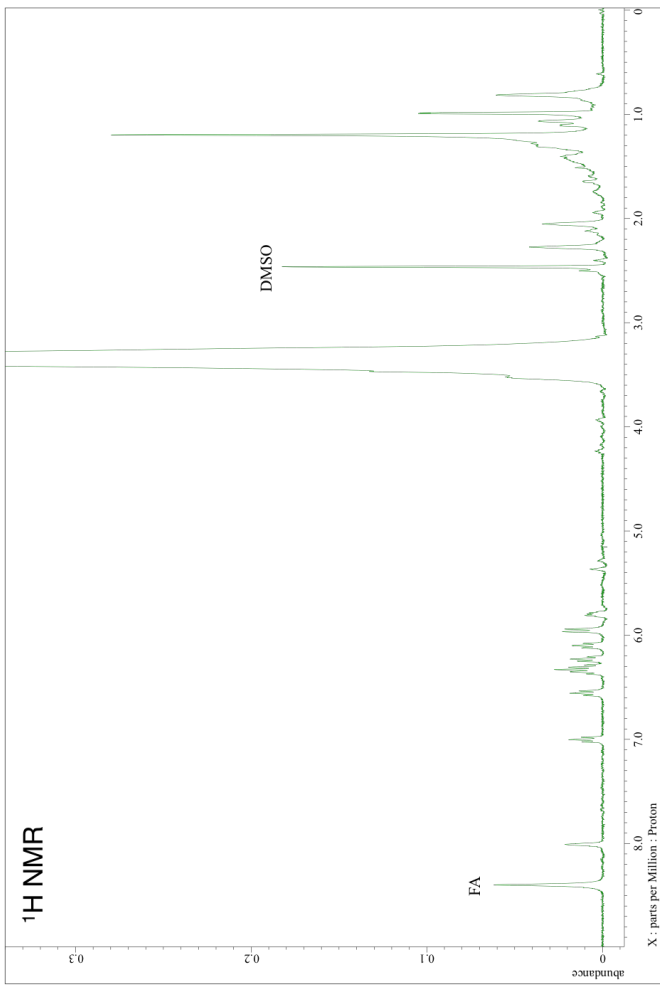
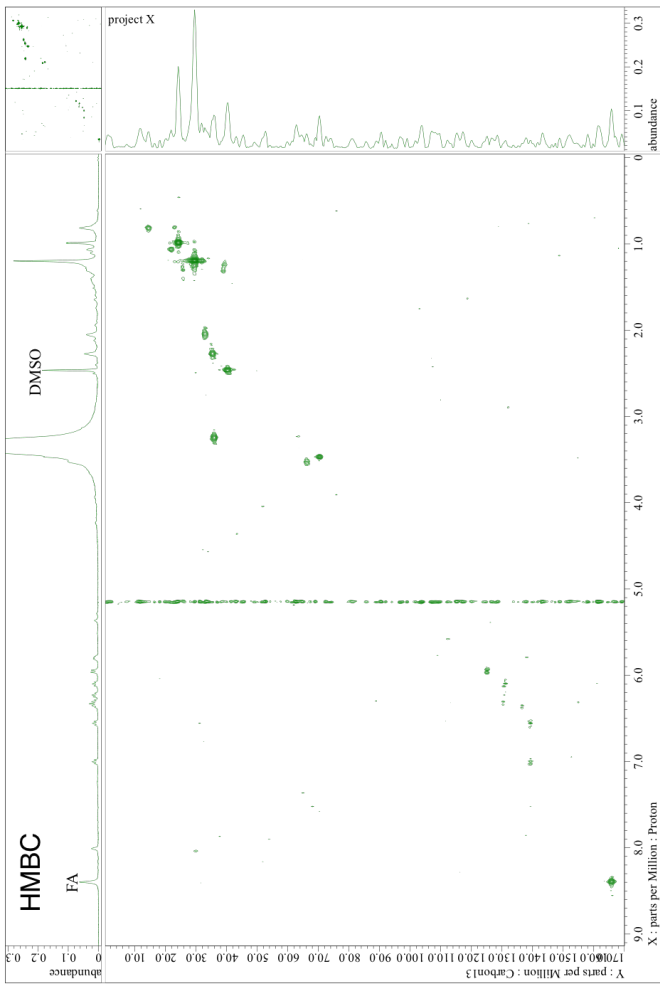
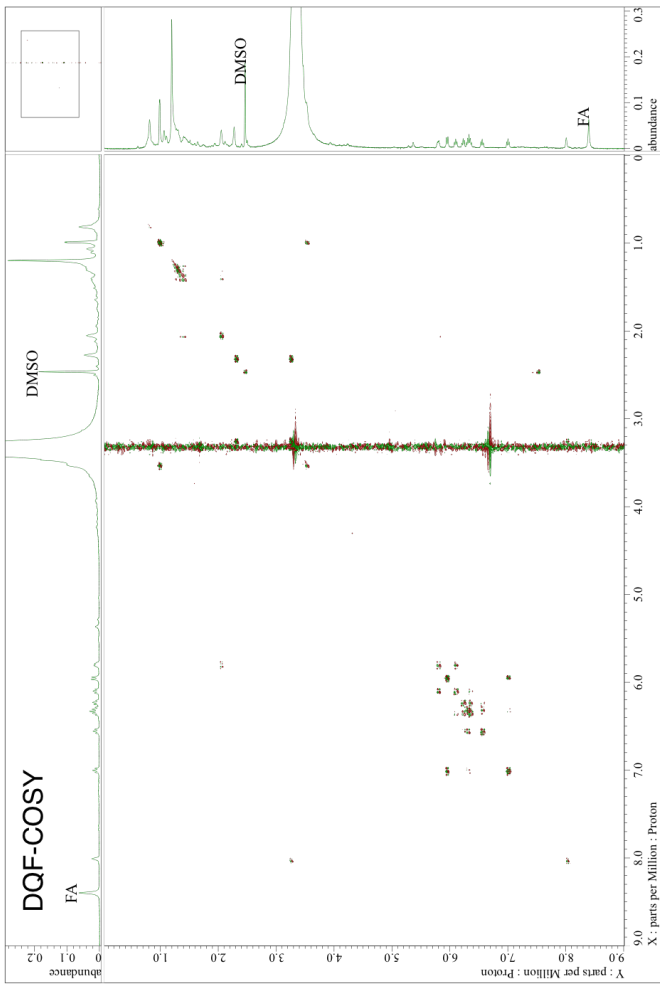


Figure 2-5. ishigamide の ^1H NMR、 $^1\text{DQF-COSY}$ 、HMQC、HMBC スペクトル。

Table 2-4. Ishigamide の NMR データ。Dimethyl sulfoxide (DMSO)- d_6 を溶媒とし、ishigamide の ^1H NMR、 ^{13}C NMR、DQF-COSY、HMQC、HMBC、NOESY スペクトルを JNM-A600 NMR System (JEOL, Tokyo, Japan) で測定した。溶媒のピークを内部標準 (δ_{C} 39.51, δ_{H} 2.49) として用いた。

position	^{13}C	^1H
1	169.4	-
2	124.9	5.97 (d, 1H, $J = 16$ Hz)
3	139.5	7.17 (dd, 1H, $J = 12, 15$ Hz)
4	130.4	6.33 (dd, 1H, $J = 11, 15$ Hz)
5	139.3	6.59 (dd, 1H, $J = 10, 16$ Hz)
6	131.3	6.24 (dd, 1H, $J = 12, 15$ Hz)
7	136.5	6.39 (dd, 1H, $J = 11, 15$ Hz)
8	131.5	6.15 (dd, 1H, $J = 11, 14$ Hz)
9	137.9	5.85 (m, 1H)
10	31.8	2.15 (m, 2H)
11	27.6	1.54 (m, 2H)
12	38.2	1.46 (m, 2H)
13	65.1	3.72 (m, 1H)
14	22.9	1.15 (d, 3H, $J = 6$ Hz)
15	34.9	3.49 (m, 2H)
16	34.2	2.49 (m, 2H)
17	178.2	-
NH	-	8.07 (t, 1H)

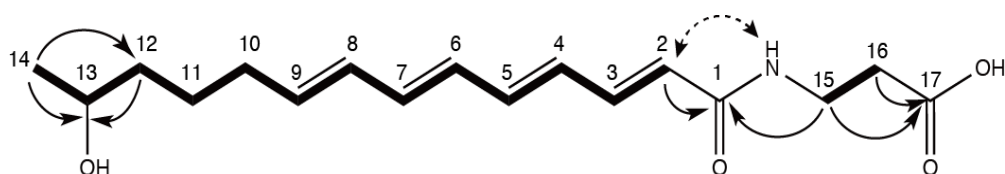


Figure 2-6. ishigamide の構造及び 2D-NMR により観測された相関。太線で DQF-COSY の相関、矢印で HMBC の相関、破線で NOESY の相関を示す。

DQF-COSY 解析により olefinic methine proton である H-2 ($\delta_{\text{H}} 5.97$) から 7 つの olefinic methine proton ($\delta_{\text{H}} 6.33, \delta_{\text{H}} 6.59, \delta_{\text{H}} 6.24, \delta_{\text{H}} 6.39, \delta_{\text{H}} 6.15, \delta_{\text{H}} 7.17, \delta_{\text{H}} 5.85$), 3 つの methylene proton ($\delta_{\text{H}} 2.15, \delta_{\text{H}} 1.54, \delta_{\text{H}} 1.46$) と一つの hydroxymethine proton H-13 ($\delta_{\text{H}} 3.72$) を介して、末端の methyl proton H₃-14 ($\delta_{\text{H}} 1.15$) に繋がる相関が観察された。¹H-¹H のカップリング定数を算出したところ、ポリエン部位の二重結合の立体配置が全て *E* 体であることが示唆された。また、DQF-COSY 解析から β -alanine に属する 2 つの methylene proton: H₂-15 ($\delta_{\text{H}} 3.49$) と H₂-16 ($\delta_{\text{H}} 2.49$) 間の相関も観察された。HMQC と HMBC の解析から、ポリエン構造を有する脂肪酸部位と β -alanine 部位はペプチド結合により繋がっていることが示された。Methine proton H-2 ($\delta_{\text{H}} 5.97$) と amine proton NH ($\delta_{\text{H}} 8.05$) の間で NOESY のシグナルが観察されたこともペプチド結合の存在を支持している。さらに、この化合物は $[\text{M} + \text{H}]^+$ を 308 *m/z* に示し、tandem mass monoisotopic ion ピークを 219 *m/z* に示している (Figure 2-7. A)。この MS/MS のフラグメントはペプチド結合が切れた時の *b* フラグメントに対応している。また、ishigamide は極大吸収波長を 330 nm に示す (Figure 2-7. B)。これはテトラエン骨格とペプチド結合より構成された共役系による吸収であると考えられる。以上のデータから、脂肪酸部位と β -alanine 部位の間にペプチド結合が存在することが強く支持され、ishigamide の構造が明らかとなった。

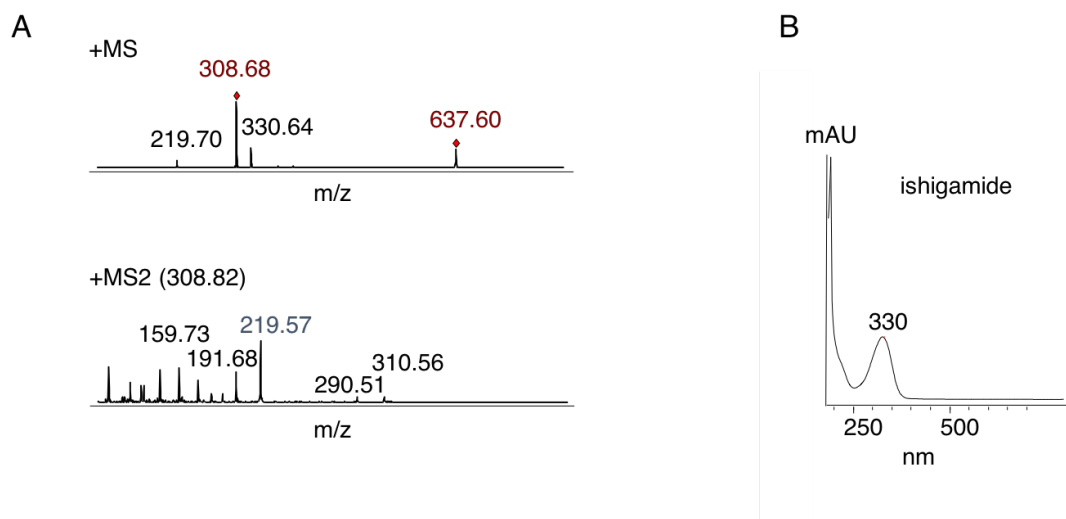


Figure 2-7. ishigamide の MS、MS/MS スペクトル (A) と UV スペクトル (B)。

2.3. 考察

本章では転写活性化因子の強制発現株の代謝解析を網羅的に行った。2つの発現ベクターを用いて JE08 株に存在する SARP ファミリー転写活性化因子の強制発現を行い、7つの転写活性化因子の強制発現株を構築し、それらをそれぞれ4種類の培地条件で培養した。その結果、研究対象である7つの転写活性化因子のうち、4つの転写活性化因子の強制発現により、放線菌 JE08 株の物質生産が促進され、計8つの未知化合物の生産が促進された (Table 2-3)。

強制発現により化合物生産の促進が見られた転写活性化因子のうち、small SARP に分類される SARP7 の強制発現により、一つの化合物 (ishigamide) の生産が促進された。後述の実験 (第三章) より、この化合物の生合成遺伝子クラスター (*iga cluster*) は強制発現した SARP 遺伝子の近くに存在しており、SARP7 は経路特異的転写活性化因子として働いていることが示唆された。Ishigamide は 3-((2E,4E,6E,8E)13-hydroxytetradena-2,4,6,8-tetraenamido) propanoic acid であり、これまでに報告のない新規化合物である。この結果は JE08 株が前述の streptazone E や okicinone 以外にも新規構造を有する化合物を生産する能力を有していることを示唆している。

一方で、SARP2、SARP8、SARP9 は large SARP に分類されており、それらの強制発現により、1つ以上の化合物の生産が促進された。このことから、これらの large SARP は JE08 株の二次代謝をグローバルに影響していると考えられる。今回、SARP1、3、10 の強制発現が JE08 株の代謝プロファイルに及ぼす影響を観察できなかった。その原因として幾つかの可能性が考えられる。まず、限定された抽出、分析条件により、検出できる化合物が限られており、代謝プロファイルの変化を観察できていない可能性がある。また、強制発現した転写活性化因子が制御している二次代謝産物生合成遺伝子クラスターは他の制御因子 (アクティベーターやレプレッサー) による制御も受けている可能性があり、それらの制御因子の強化や抑制をしなければクラスターの活性化が観察されないと予想される。さらに、培養条件および基質供給が適切でないこと、他の生合成経路との競合が原因で、二次代謝産物の生産が観察されない可能性も考えられる。その場合、さらなる培養条件の検討等が必要とされる。本章の冒頭で述べたように、休眠生合成遺伝子クラスターの活性化を目的とする方法が多く開発されている。それらの方法を本研究で用いた方法とさらに組み合わせることにより、JE08 株のさらなる物質生産能を明らかにできると期待される。

これまでに、転写活性化因子の強制発現はゲノムマイニングにおいて有用なツールとされてきたが、それはある特定の生合成遺伝子クラスターの活性化、または特定の二次代謝産物の生産量の向上に用いられることが多い^{17,18}。例えば、転写活性化因子 *apdR*

の強制発現により、真菌 PK-NRP ハイブリッド化合物の休眠生合成遺伝子が活性化され、新規化合物の同定に繋がった例が報告されている⁶³。また、fredericamycin 生合成クラスター中の転写活性化因子 SARP 型 FdmR1 の強制発現は fredericamycin の生産量を 5.6 倍増大させた⁶⁴。今回の研究では *Streptomyces* 属放線菌において、初めて特定のクラスターや二次代謝産物に着目せず、転写活性化因子の強制発現という手法を用いて、網羅的な放線菌の二次代謝生合成遺伝子クラスターの活性化を試みた⁶⁰。その結果、JE08 株が有する物質生産能が確認され、新規化合物である ishigamide の同定に繋がった。

本研究において、SARP の強制発現により休眠生合成遺伝子クラスターの活性化は特定の培養条件においてのみ観察される。このことから、2つの休眠生合成遺伝子クラスター活性化手法（遺伝子情報に依存する転写活性化因子の強制発現と遺伝子情報に依存しない古典的な OSMAC 手法）を組み合わせる有用性が示唆された。本研究で用いた方法そのもの、もしくはそれと他の手法のさらなる組み合わせは、特定の遺伝子クラスターの活性化をより効率化できるだけでなく、網羅的な休眠生合成遺伝子クラスターの活性化にも有効であると思われる。放線菌に留まらず、休眠生合成遺伝子クラスターは多くの細菌、カビに存在すると思われる。このような手法を他の菌に応用することにより、生成物未同定の生合成遺伝子の解析や新規化合物の単離同定が可能になると期待される。また、この手法を生理活性等によるスクリーニングとカップリングすれば、比較的簡便かつ網羅的に有用二次代謝産物の探索をすることができる。それにより、医薬品資源となる化合物の発見が期待される。

2.4. 実験項

2.4.1. 菌株と培地

2.4.1.1. 菌株

1) 放線菌

- JE08 株の野生株を SARP の強制発現に用いた。

2) 大腸菌

- *E. coli* JM109 を遺伝子操作に用いた。
- *E. coli* ET12567/pUZ8002 をシャトルベクター pTYM19ep の接合伝達に用いた。
- *E. coli* S17-1 をシャトルベクター pHKO3 の接合伝達に用いた。

2.4.1.2. 培地

- Difco™ Luria Broth 培地 (LB 培地) を大腸菌の培養に用いた。
 - Mannitol Soya flour アガー培地 (MS 培地): Agar (2 %), Mannitol (2 %), Soya flour (2 %) を脱イオン水に溶かし、pH を 7.2 に調整した後、オートクレイブ滅菌した。MS 培地を放線菌の固体培養に用いた。接合伝達の実験に用いる際は終濃度 5 mM MgCl₂ を添加する。
 - TSB 培地: トリプトソーヤブイヨン (3%) を脱イオン水に溶解し、オートクレイブ滅菌した。接合伝達の実験に用いた。
 - ISP2 培地: Bacto™ yeast extract (0.4 %), Bacto™ malt extract (1 %), glucose (0.4 %) を脱イオン水に溶かし、pH を 7.2 に調整した後、オートクレイブ滅菌した。
 - Bennett maltose 培地: Bacto™ Yeast extract (0.1 %), Bonito extract (0.07 %), Beef extract (0.04 %), NZ Amine Type A (0.2 %), Maltose (1 %) を脱イオン水に溶かし、pH を 7.3 に調整した後、オートクレイブ滅菌した。
 - Q 培地: glycerol (2 %), molasses (1 %), casein (0.5 %), polypeptide (0.1 %), CaCO₃ (0.1 %) を脱イオン水に溶かし、pH を 7.2 に調整した後、オートクレイブ滅菌した。
 - YMP 培地: Bacto™ yeast extract (0.2 %), Bacto™ Malt extract (0.2 %), Bacto™ peptone (0.4 %), NaCl (0.5 %), MgSO₄ (0.4 %), Glucose (1 %) を脱イオン水に溶かし、pH を 7.2 に調整した後、オートクレイブ滅菌した。
- ISP2、Bennett maltose、Q、YMP 培地を JE08 株の物質生産培地として用いた。

2.4.2. JE08 株のゲノム抽出

100 ml の ISP2 培地で JE08 株を 2 日培養し、得られた菌体を 50 mL の TE sucrose (50 mM Tris HCl, 10 mM EDTA, 25 % sucrose, pH 8.0) で 2 回洗浄した。菌体を 4 mL の TE sucrose に再懸濁し、lysozyme と RNase を適量加え、37°C で 30 min インキュベートした。その後、Proteinase K 溶液を加えさらに 37°C で 30 min インキュベートした。2.4 ml 10% SDS を加え穏やかに攪拌、60 °C で菌体が全て溶解するまで転倒攪拌した。その後、4 ml の 5 M NaCl と 2 ml の 5% CTAB を加え穏やかに攪拌し、さらに 10 ml chloroform/isoamyl alcohol =50/1 を加え、室温で一晩穏やかに攪拌した。その後、3,500 rpm で 15 min 遠心し、得られた上清を回収し、2 倍量の ethanol を加え、穏やかに転倒攪拌した。生じた白い紐状の DNA をパスツールに吸着し、70% エタノールをかけて洗浄した後 10 mL の TE に溶解した。得られた溶液を 4°C で緩やかに攪拌し、ゲノム DNA が完全に溶解したら分注して、4°C で保存した。

2.4.3. 転写活性化因子強制発現株の構築

転写活性化因子強制発現ベクターを接合伝達により JE08 株に導入し、各転写活性化因子遺伝子の強制発現株を構築した。

2.4.3.1. pTYM19ep-SARP ベクターの構築

各転写活性化因子の遺伝子を強制発現するために pTYM19ep⁶⁵ ベクターを用いた。JE08 株の染色体 DNA を鋳型とし、8 つの転写活性化因子遺伝子 (Table 2-1、アスタリスクで表示したもの) を PCR により増幅した。PCR に用いたプライマーは Table 2-5 に羅列した。増幅した断片を pTYM19ep の NdeI と HindIII 制限酵素サイトに挿入し、8 つの pTYM19ep-SARP 強制発現用ベクターを作製した。

2.4.3.2. pHKO3-SARP ベクターの構築

SARP8 と SARP9 については pHKO3⁶⁶ を用いた強制発現ベクターを更に構築した。PCR により増幅した SARP 遺伝子の断片を pHKO3 の NdeI と HindIII 制限酵素サイトに挿入し、pHKO3-SARP 強制発現用ベクターを作製した。PCR のプライマーは pTYM19ep にクローニングする時と同様のプライマーを用いた。

Table2-5. 第二章で用いたプライマー。プライマー1-16 を転写活性化因子のクローニングに用いた。各プライマー配列中の NdeI サイトを下線、HindIII サイトを二重の下線で示した。

No	Primer	Sequence (5'-3')	Purpose
1	S1F	<u>AACATATG</u> CTCGCCACGCTTGCG CTGGC	Amplification of the SARP1 encoding gene
2	S1R	AAA <u>AAGCTT</u> CTACCTGCTCACCGC CGCGG	Amplification of the SARP1 encoding gene
3	S2F	<u>AACATATG</u> GAAATTCGGGGTGCTG GGACCGC	Amplification of the SARP2 encoding gene
4	S2R	AAA <u>AAGCTT</u> TCACGAGGCTCCCTG TCCCGG	Amplification of the SARP2 encoding gene
5	S3F	<u>AACATATG</u> GCGGACGTGAGCCC GGCAGA	Amplification of the SARP3 encoding gene
6	S3R	AAA <u>AAGCTT</u> CTAGCCGGAACACA GCTCCA	Amplification of the SARP3 encoding gene
7	S5F	<u>AACATATG</u> TGGGATGGTGATCCG CCCACCG	Amplification of the SARP5 encoding gene
8	S5R	AAA <u>AAGCTT</u> TCATGGCGCCGGTCG CGATCCA	Amplification of the SARP5 encoding gene
9	S7F	<u>AACATATG</u> TACATCTCCATATTG GGCCCGCTGC	Amplification of the SARP7 encoding gene
10	S7R	AAA <u>AAGCTT</u> TCACAGGGACGGGTC CTGCATCA	Amplification of the SARP7 encoding gene
11	S8F	<u>AACATATG</u> GACGGGGTACCGCG AGTGCC	Amplification of the SARP8 encoding gene
12	S8R	AAA <u>AAGCTT</u> TCAGGTCGTGGCGGC GGGCCT	Amplification of the SARP8 encoding gene
13	S9F	<u>AACATATG</u> CGGTACAGAATCCTG GGCGTC	Amplification of the SARP9 encoding gene
14	S9R	AAA <u>AAGCTT</u> CTACGGCTTCCGCTC GGCGG	Amplification of the SARP9 encoding gene
15	S10F	<u>AACATATG</u> TCCGTGCCCTGTTTA CAGGCC	Amplification of the SARP10 encoding gene
16	S10R	AAA <u>AAGCTT</u> TCAGCGGATGGCAG GGATGACG	Amplification of the SARP10 encoding gene

2.4.3.3. 接合伝達を用いた SARP 過剰ベクターの放線菌への導入

pTYM19ep ベースの SARP 強制発現用ベクターを *E. coli* ET12567/pUZ8002、pHKO3 ベースの SARP 強制発現用ベクターを *E. coli* S17-1 へ形質転換し、大腸菌から JE08 株孢子への接合伝達により SARP 強制発現株の構築を行った。SARP 強制発現用ベクターを持つ大腸菌を LB 培地で一晚培養し、培養液を 5 mL の新鮮な LB 培地に 0.5 % 植菌した。37°C で OD₆₀₀ が 0.4 から 0.6 になるまで培養し、遠心により菌体を集め、新鮮な TSB 培地で 2 回洗浄し、500 μL の LB 培地に懸濁した。また、JE08 株孢子のグリセロールストックに 500 μl の TSB を加え、50°C のウォーターバスで 10 分間ヒートショックし、孢子を発芽させた。孢子を常温に戻し、大腸菌の希釈系列と混合し、MgCl₂ 入りの MS

寒天培地に植菌した。プレートで 30°C で 16 から 20 時間培養し、放線菌の菌糸の生育を確認した。その後、適当な抗生物質 (pTYM19ep の時はチオストレプトン、pHKO3 の時はカナマイシン) と nalidixic acid 水溶液をプレートに重層し、30°C で 7 日培養し、薬剤耐性で形質転換株を選別した。SARP 遺伝子の挿入をコロニー-PCR で確認した。

2.4.4. LC-ESIMS による代謝産物比較

JE08 株の転写活性化因子強制発現株を 50 ml の ISP2 培地に植菌し 30°C で 2 日培養した後、1 mL の培養液を 100 mL の新鮮な生産培地に植菌した。今回では 4 種の培地 ISP2、Bennett maltose、Q と YMP 培地を生産培地として用いた。培養液を 30 °C で振盪培養し、2 日、4 日、7 日目に 5 mL の培養液をサンプリングした。それぞれの培養液に 0.1 g の amberlite FPX66 レジン (ORGANO) を加え、2 時間攪拌した。遠心により菌体とレジンを回収し、脱イオン水で洗浄した後、MeOH を加え、ソニケーションした。得られたメタノール溶液をエバポレーターで濃縮し、残った固形物を 100 μ L の DMSO に溶かし、可溶性画分を LC-ESIMS に供した。LC-ESIMS では逆相 COSMOCORE 2.6 C₁₈ カラム (2.1D \times 150 mm; Nacalai tesque) を装着した Agilent 1100 series (Agilent Technologies) と high-capacity trap plus (HCT) システム (Bruker Daltonics) を用いた。ギ酸を 0.1%含む水とアセトニトリルを移動相に用いた、linear gradient で化合物を溶出した。

2.4.5. Ishigamide の単離と構造解析

Ishigamide を単離するため、30 °C で JE08S7 を 100 mL の ISP2 培地で 2 日培養し、その培養液中の 50 mL を 5 L の ISP2 培地に植菌し、30°C で 4 日培養した。培養液に 80 g の amberlite FPX66 レジンを加え、26°C で更に 2 時間攪拌した。ミラクロスを被せたブフナー漏斗でろ過し、レジンと菌体を回収した。回収した混合物をメタノールで抽出し、得られた溶液をエバポレーターで濃縮し、残留した水溶液を酢酸エチルと液液分配し、有機層を減圧濃縮した。得られた固形物をさらに ODS カラム (Purif-Pack ODS, SIZE100, Shoko Scientific) を用いた中圧液体クロマトグラフィー (MPLC) (Purif-Compact A, Shoko Scientific) で精製した。水とメタノールを移動相とし、10%-100%メタノールのグラジエントで化合物を溶出した。Ishigamide を含む画分を集め、さらにゲルろ過 LH20 (GE healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) に供して、メタノールで溶出した。Ishigamide を含む画分を濃縮し、HPLC でさらに精製した。精製する際は COSMOSIL C18-AR-II (10 \times 250 mm, Nacalai tesque) カラムと COSMOSIL π NAP (10 \times 250 mm, Nacalai tesque) カラムを用いた。HPLC においては、0.1%ギ酸を含む水とメタノールを移動相

とし、40%-100%メタノールのグラジエントで化合物を分取した。最終的には 0.8 mg の ishigamide を精製できた。

Ishigamide を JEOL HR-ESIMS に供して、分子式を決めた。また、化学構造を決めるために DMSO-*d*₆ を溶媒に用いて、ishigamide を NMR に供した。¹H NMR, ¹³C NMR, DQF-COSY、HMQC、HMBC と NOESY スペクトルを JNM-A600 NMR System (JEOL, Tokyo, Japan) で測定した。

第三章 ishigamide 生合成遺伝子クラスター (*iga cluster*) の同定

とその *in silico* 解析

3.1. 概要

第二章では休眠生合成遺伝子クラスターの活性化により、新規化合物 ishigamide が単離同定された。Ishigamide の生合成経路を調査するために、その推定生合成遺伝子クラスターを生産菌 JE08 株のゲノムから探索し、遺伝子破壊実験により ishigamide 生合成遺伝子クラスターを同定した。さらに *in silico* 解析を行った結果、このクラスターに含まれる II 型 PKS、IgaPKS がこれまでに解析されていないポリエン生合成を触媒する高還元型 II 型 PKS であることが示唆された。

3.2. 結果

3.2.1. 遺伝子破壊による ishigamide 生合成遺伝子クラスターの同定

CSR SARP の強制発現は経路特異的に二次代謝生合成遺伝子クラスターを活性化する可能性が高いが、グローバルに放線菌の二次代謝を活性化する可能性も考えられる。そのため、ishigamide 生合成遺伝子クラスターの候補を JE08 株のドラフトゲノム全体から探索することにした。Ishigamide は不飽和脂肪酸部分と β -alanine 部分によって構成されている。そのうち、不飽和脂肪酸中に存在するポリエン構造はポリケタイド合成酵素 (PKS) によって合成される可能性が高い。 β -alanine は coenzyme A 生合成経路における重要な中間体であり、CoA 生合成経路によって供給されると考えられる。2つの部位がそれぞれ合成された後、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)、peptide ligase または ATP grasp 酵素により不飽和脂肪酸と β -alanine 間のペプチド結合が形成すると考えられる。ポリエン合成を担える PKS 遺伝子を含む遺伝子クラスターを探索したところ、3つの ishigamide 生合成遺伝子クラスター候補が見出された (Figure 3-1)。候補 1 は強制発現した転写活性化因子から離れた位置に存在しており、クラスター内に ketosynthase (KS)、ketoreductase (KR)、dehydratase (DH) を含む I 型 PKS がコードされている。候補 2 と候補 3 はそれぞれ強制発現した転写活性化因子の下流と上流に位置している。候補 2 のクラスター中には II 型 PKS 様の KS、chain length factor (CLF) と NRPS 遺伝子が存在しており、候補 3 のクラスター中には III 型 PKS と ATP-grasp 酵素が存在していた。

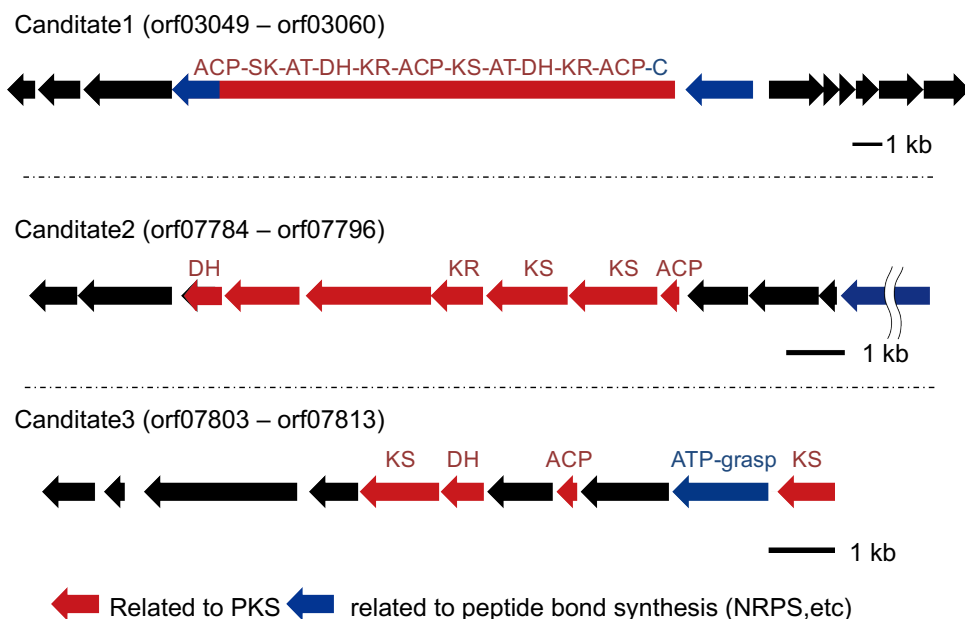


Figure 3-1. Ishigamide の推定生合成遺伝子クラスター

いずれの生合成遺伝子クラスターが実際に ishigamide の生合成を担っているかを調べるため、JE08S7において、それぞれのクラスター中に存在するKS（候補1の場合に1つのKSドメイン、候補2の場合KSとCLFの両方、候補3の場合に1つのKSドメイン）をアプラマイシン耐性遺伝子に置き換え、破壊を行った（Table 3-1）。PCRにより、破壊株の構築を確認した（Figure 3-2、Figure 3-3、Figure 3-4）。

Table 3-1. KS 遺伝子破壊株の構築。

Strain	Description
JE08S7D1	JE08S7 in which type I PKS from candidate cluster 1 was inactivated by substituting the core region of the KS gene with apramycin resistance gene
JE08S7D2	JE08S7 in which two KS subunits (<i>iga11</i> , <i>iga12</i>) from candidate cluster 2 were inactivated by substituting their core region with apramycin resistance gene
JE08S7D3	JE08S7 in which type III PKS encoding gene from candidate cluster 3 was inactivated by substituting the core region of the gene with apramycin resistance gene

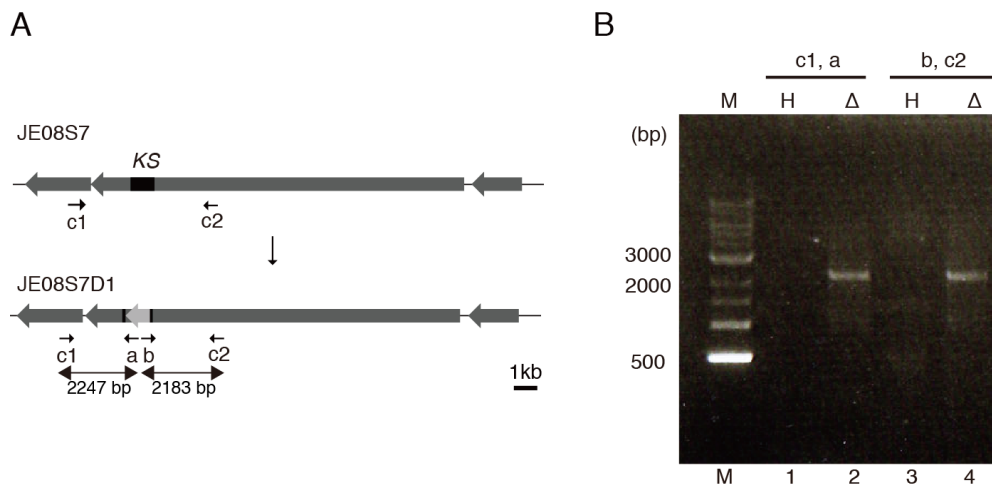


Figure 3-2. JE08S7D1 の構築とコロニーPCRによる確認。JE08S7 を遺伝子改変の宿主として用いた。A、Ishigamide 生合成遺伝子クラスターの候補 1 中の KS ドメインをアプラマイシン耐性遺伝子に置き換えることで破壊を行った。B、プライマー-c1、a と b、c2 (Table 3-4) を用いてアプラマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。耐性遺伝子が挿入されていれば、c1、a のプライマーで PCR を行った際、2247bp の DNA 断片が増幅される。b、c2 のプライマーで PCR を行った際、2183bp の DNA 断片が増幅される。Lane M、Wide-Range DNA Ladder (Takara)。Lane 1、JE08S7 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c1 と a を用いて PCR を行った。Lane 2、JE08S7D1 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c1 と a を用いて PCR を行った。Lane 3、JE08S7 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c2 と b を用いて PCR を行った。Lane 4、JE08S7D1 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c2 と b を用いて PCR を行った。観察された特異的な増幅が正しい組換え菌体 (JE08S7D1) の取得を表している。矢印で設計したプライマーの結合部位を表している。

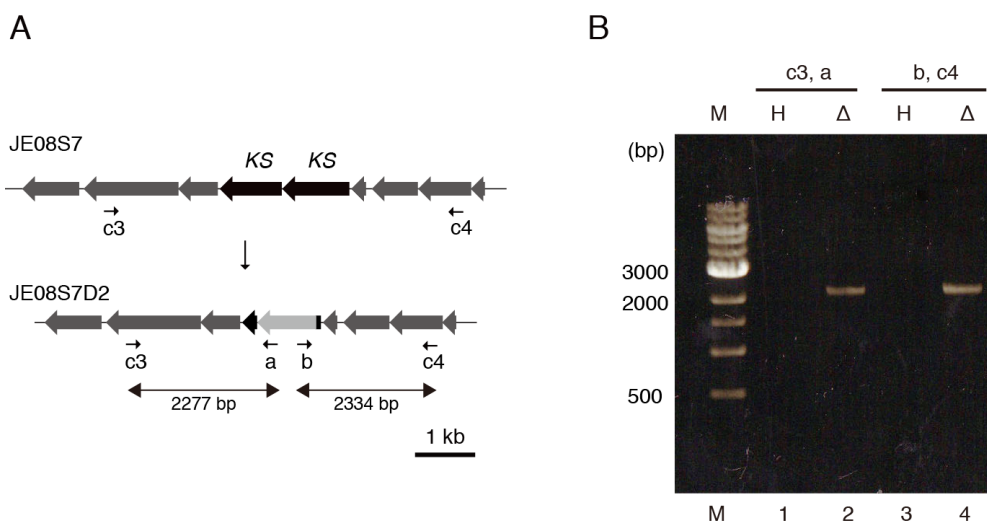


Figure 3-3. JE08S7D2 の構築とコロニーPCRによる確認。JE08S7 を遺伝子改変の宿主として用いた。A、Ishigamide 生合成遺伝子クラスターの候補 2 中の 2 つの KS 遺伝子をアプライン耐性遺伝子に置き換えることで破壊を行った。B、プライマー-c3、a と b、c4 (Table 3-4) を用いてアプライン耐性遺伝子の挿入を確認した。耐性遺伝子が挿入されていれば、c3、a のプライマーで PCR を行った際、2277bp の DNA 断片が増幅される。b、c4 のプライマーで PCR を行った際、2334bp の DNA 断片が増幅される。Lane M、Wide-Range DNA Ladder (Takara)。Lane 1、JE08S7 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c3 と a を用いて PCR を行った。Lane 2、JE08S7D2 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c3 と a を用いて PCR を行った。Lane 3、JE08S7 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c4 と b を用いて PCR を行った。Lane 4、JE08S7D2 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c4 と b を用いて PCR を行った。観察された特異的な増幅が正しい組換え菌体 (JE08S7D2) の取得を表している。矢印で設計したプライマーの結合部位を表している。

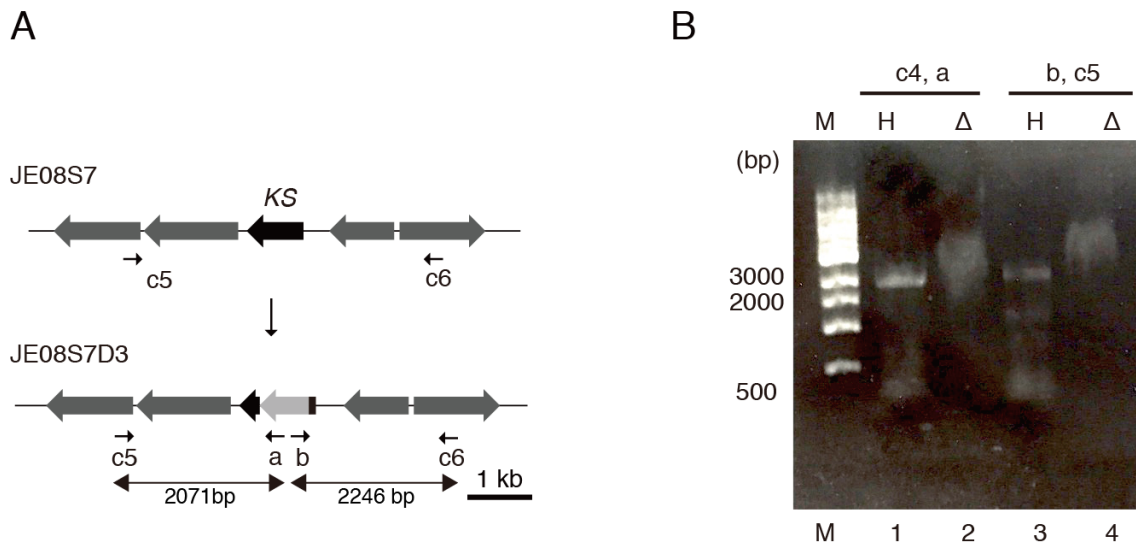


Figure 3-4. JE08S7D3 の構築とコロニーPCRによる確認。JE08S7 を遺伝子改変の宿主として用いた。A、Ishigamide 生合成遺伝子クラスターの候補 3 中の KS 遺伝子をアプラマイシン耐性遺伝子に置き換えることで破壊を行った。B、プライマー-c5、a と b、c6 (Table 3-4) を用いてアプラマイシン耐性遺伝子の挿入を確認した。耐性遺伝子が挿入されていれば、c5、a のプライマーで PCR を行った際、2071bp の DNA 断片が増幅される。b、c6 のプライマーで PCR を行った際、2246bp の DNA 断片が増幅される。Lane M、Wide-Range DNA Ladder (Takara)。Lane 1、JE08S7 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c5 と a を用いて PCR を行った。Lane 2、JE08S7D3 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c5 と a を用いて PCR を行った。Lane 3、JE08S7 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c6 と b を用いて PCR を行った。Lane 4、JE08S7D3 のゲノム DNA をテンプレートとして、プライマー-c6 と b を用いて PCR を行った。観察された特異的な増幅が正しい組換え菌体 (JE08S7D3) の取得を表している。矢印で設計したプライマーの結合部位を表している。

3つの破壊株と JE08S7 の代謝プロファイルを LC-ESIMS により比較した。その結果、ishigamide の生産は候補 2 に存在する KS と CLF 遺伝子を破壊した時のみに消失した (Figure 3-5)。候補 1 と 3 に存在する KS ドメインの破壊は JE08S7 の代謝プロファイルに影響を与えなかった。破壊実験より、候補 2 が ishigamide の生合成を担っていることが示唆された。以後候補 2 クラスタを *iga* クラスタと呼ぶ。

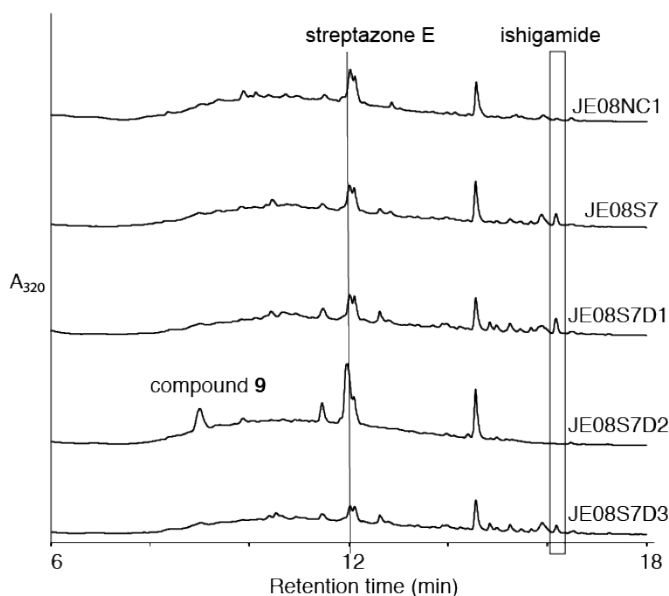


Figure 3-5. KS 破壊株と JE08S7 の代謝比較。LC-MS 解析を用いて ISP2 培地で 4 日培養した *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 組換え菌体の代謝プロファイルを調べた。*Streptomyces* sp. MSC090213JE08 は SARP7 を強制発現した時 (JE08S7) に ishigamide を生産する。第二章で示したように、空ベクターを有している *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 (JE08NC1) は ishigamide をほぼ生産しない。また、ishigamide 推定生合成遺伝子クラスターの候補 2 に含まれている KS と CLF を破壊した際 (JE08S7D2) に ishigamide の生産が見られなくなった。他の ishigamide 推定生合成遺伝子クラスター中の KS 遺伝子を破壊した時 (JE08S7D1、JE08S7D3)、ishigamide の生産量は影響されなかった。黒枠で ishigamide に相当するピークを示す。線で streptonone E を示す。Streptonone E と化合物 9 の生産は ishigamide 生合成遺伝子クラスターの破壊により促進される。

JE08S7D2 では、streptonzone E と 1 つの未知化合物 (化合物 9) の生産が促進されていた。化合物 9 は ishigamide と streptonone E と同様にポリケタイドであると考えられる。*iga* クラスタの破壊により、ポリケタイド合成に用いられる基質やエネルギー源の取り合いが緩和され、2 つの化合物の生産が促進されていると考えた。

3.2.3. ishigamide の予想生合成経路

Iga クラスターは II 型 PKS 遺伝子 (*iga10-iga13, iga16*)、NRPS 遺伝子 (*iga3, iga5-iga7*)、レギュレーター遺伝子 (*iga1, iga2, iga17, iga18*)、トランスポーター遺伝子 (*iga8, iga9*) から構成されている (Figure 3-10、Table 3-3)。クラスターの活性化において強制発現させた SARP7 は Iga2 に当たる。

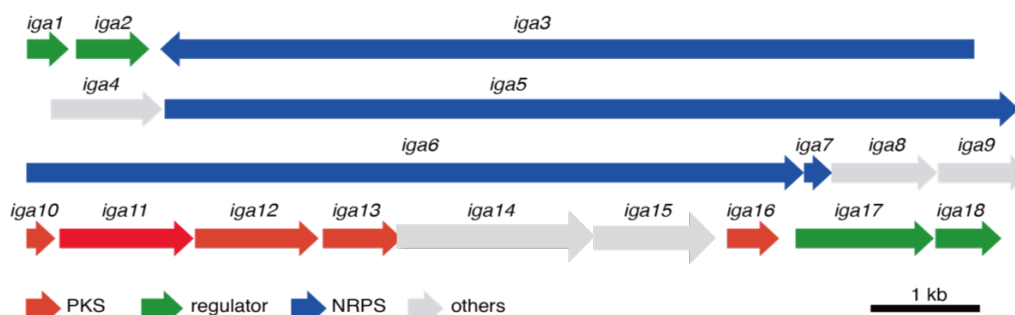


Figure 3-10. ishigamide 生合成遺伝子クラスター (*iga* クラスター) の構成。

Table 3-3. *iga* クラスターにおける各遺伝子がコードするタンパク質の推定機能とそのホモロゲ。

Protein	aa	Proposed function	Protein homolog	Identity
Iga1	98	LuxR family regulator	LuxR family transcriptional regulator, EXU62228.1 [<i>Streptomyces</i> sp. PRh5]	55/82 (67%)
Iga2	252	SARP family transcriptional regulator	SARP family transcriptional regulator, CCH30525.1 [<i>Saccharothrix espanaensis</i> DSM 44229]	136/250 (54%)
Iga3	2541	NRPS (C-A-T-C-A-T-TE)	Non-ribosomal peptide synthetase, AJE44530.1 [<i>Streptomyces nodosus</i>]	935/1984 (47%)
Iga4	345	Cysteine synthase	Putative cysteine synthase, EHM29007.1 [<i>Streptomyces</i> sp. W007]	200/324 (62%)
Iga5	2656	NRPS (C-A-T-E-C-A-T)	CDA peptide synthetase I, CCA59550.1 [<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712]	1174/2650 (44%)
Iga6	2447	NRPS (C-A-T-C-A-T-TE)	Non-ribosomal peptide synthetase, AGF65356.1 [<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. jinggangensis TL01]	1810/2503 (72%)
Iga7	80	MbtH-like protein	MbtH protein, CCO61892.1 [<i>Streptomyces iakyrus</i>]	48/68 (71%)
Iga8	321	ABC transporter	ABC transporter ATPase subunit, EFE66257.1 [<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672]	196/312 (63%)
Iga9	280	ABC transporter	ABC-2 type transporter, ADI09925.1 [<i>Streptomyces bingchengensis</i> BCW-1]	146/279 (52%)
Iga10	83	Acyl carrier protein	Putative acyl carrier protein, AEY91202.1 [<i>Streptomyces hygrosopicus</i> subsp. jinggangensis 5008]	56/62 (90%)
Iga11	409	β -Ketosynthase	Putative 3-oxoacyl-ACP synthase II, EHM29021.1 [<i>Streptomyces</i> sp. W007]	256/403 (64%)
Iga12	378	Chain length factor	Putative 3-oxoacyl-ACP synthase I, AEA30265 [<i>Streptomyces</i> sp. Acta 2897]	174/356 (49%)
Iga13	242	Ketoreductase	3-Oxoacyl-ACP reductase, AGP56995.1 [<i>Streptomyces rapamycinicus</i> NRRL 5491]	155/241 (64%)
Iga14	575	Flavin dependent oxidoreductase	Putative oxidoreductase, AEA30271 [<i>Streptomyces</i> sp. Acta 2897]	286/551 (52%)
Iga15	343	Alanine dehydrogenase	Ornithine cyclodeaminase, ADO85580.1 [<i>Streptomyces arenae</i>]	244/348 (70%)
Iga16	158	MaoC dehydratase	ZbpA protein, CQD08186.1 [<i>Mycobacterium europaeum</i>]	82/151 (54%)
Iga17	439	Histidine kinase	Sensor histidine kinase DesK, EPH40376.1 [<i>Streptomyces aurantiacus</i> JA 4570]	201/288 (70%)
Iga18	214	LuxR family regulator	LuxR family transcription regulator, AHH94201 [<i>Kutzneria albida</i> DSM 43870]	140/213 (66%)

Iga クラスタ中コードされている各タンパク質のアノテーションを元に、ishigamide の生合成経路を予測した (Figure 3-11)。Iga cluster において、II 型 PKS (IgaPKS) が ishigamide のポリエーテル構造を合成すると予想される。他の II 型 PKS と同様に、IgaPKS は minial PKS (minPKS) の構成サブユニットであるクライゼン縮合活性を有する KS (Iga11)、活性を失った KS ホモログ CLF (Iga12) と反応の足場となる ACP (Iga10) をそれぞれ単独のペプチド鎖としてコードしている。また、IgaPKS は修飾酵素として、還元と脱水をそれぞれ触媒する KR (Iga13)、DH (Iga16) を有しており、それらが minPKS と共に ishigamide 構造中のポリエーテル部位の形成を担うと考えられる。ケトン基の高い反応性を考慮すると、KS が連続的に縮合を触媒し、ポリケトン鎖を放出される場合、非酵素的な環化が起る可能性が高い。そのため、ishigamide 生合成の際に、KS が一回の縮合反応を触媒する度に還元と脱水が起こると考えた。

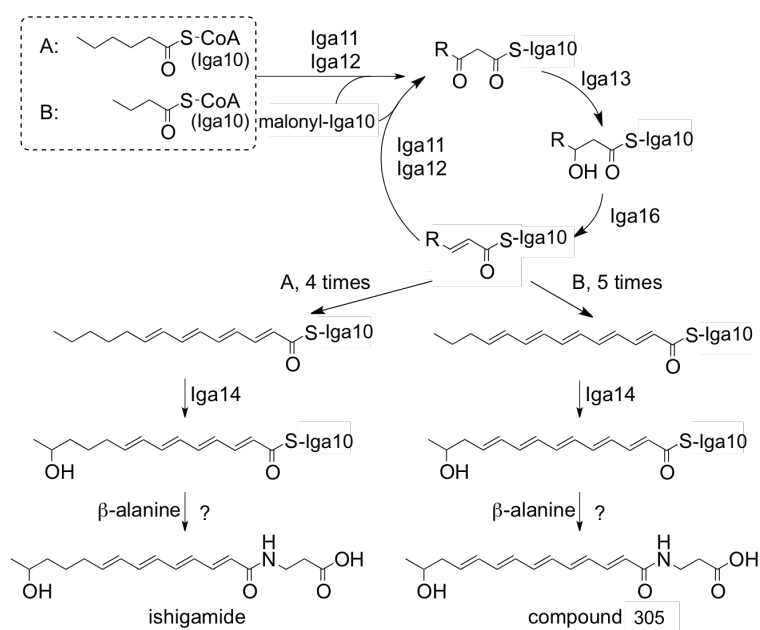


Figure 3-11. Ishigamide と compound 305 生合成経路の予測。IgaPKS は Claisen 縮合、還元、脱水の反応サイクルを返し触媒することによりポリエーテル構造を作り上げる。生成された不飽和脂肪酸は oxidoreductase (Iga14) の触媒により C13 位が水酸化される。最後に未知酵素の触媒により不飽和脂肪酸部位と β -alanine が縮合し、ishigamide もしくは compound 305 が生成する。

Ishigamide 予想生合成経路では、hexanoyl-CoA もしくは hexanoyl-Iga10 をスターター基質、malonyl-Iga10 を伸長基質に、Iga11-Iga12 がポリケタイド鎖の鎖伸長を触媒し、 β -ketoctanoyl-Iga10 を形成する。形成された β -ketoctanoyl-Iga10 は Iga13 による還元と Iga16 による脱水を受け、enoyl-Iga10 へ変換される。その後、生じた enoyl-Iga10 中間体がさらに同じ反応サイクルを3回 (計4回) 繰り返し、ポリエン骨格を有する pentaketide へ変換される。Compound 305 が生成される場合、hexanoyl-CoA / ACP の代わりに butyryl-CoA/ACP がスターター基質に用いられ、上記反応サイクルが5回繰り返される。生体内において、スターター基質がどの状態 (CoA 体 / ACP 体) で供給されるのかは議論の余地がある。脂肪酸の β -酸化により生じる acyl-CoA 中間体が IgaPKS に取り込まれる可能性が考えられる。また、脂肪酸生合成中間体である acyl-ACP 上のアシル基が Iga10、もしくは Iga11-Iga12 に転移し、IgaPKS に取り込まれる可能性が考えられる。

Iga14 は flavin-dependent oxidoreductase と相同性を有しており、ishigamide / compound 305 の C₁₃ 位に水酸基を導入すると考えられる。

Ishigamide 構造中のペプチド結合は β -alanine のアミノ基が polyketide-Iga10 に対して求核攻撃することにより形成されうる。この反応は NRPS によって触媒されうるが、*in silico* 解析より、iga クラスタ中中に存在する NRPS は β -alanine を基質として認識しないと推測された。NPRSpredictor²³⁷ を用いた A ドメイン基質特異性の解析では、Iga3 は glycine か leucine、Iga5 は serine、Iga6 は threonine か isoleucine を基質として認識すると予想された。そこで ishigamide 中の β -alanine とポリケタイド部位の縮合はクラスタ外に存在する酵素により触媒されると考えた。一方、iga クラスタ中の NRPS はおそらく他の PKS-NRPS hybrid の生合成を担っている。これらの化合物が 3.2.2 節で述べた *iga11-iga12* の破壊により生産が消失した化合物に含まれると考えられる。

3.2.4. IgaPKS の *in silico* 解析

一般的な II 型 PKS では、KS と CLF が連続的に縮合反応を触媒し、ポリケトメチレン鎖を合成する²。それがさらなる修飾を受け、環化し、比較的還元度の低い芳香族化合物となる。II 型 PKS である IgaPKS が高還元度のポリエンを合成するのであれば、それは興味深い研究対象と言える。

そこで、IgaPKS に関する詳細な *in silico* 解析を行うことにした。アミノ酸配列のアライメントから、Iga11 が FAS と PKS の KS で保存されている活性三残基 Cys-His-His⁶⁷ を有していることが分かる (Figure 3-12)。このことから、Iga11 が脱炭酸を伴う Claisen 縮合を触媒すると考えられる。一方、Iga12 では触媒三残基が保存されておらず、酵素活性が失われており、反応ポケットの形成のみに関与すると考えられる。芳香族化合物の生合成に関与する CLF において、Cys-His-His の代わりに Asn-Asp-Arg^{68,69} が保存されている。しかし、Iga12 の場合、この三残基はそれぞれ Arg、Cys と Asp に置き換わっていた (Figure 3-13)。類似したアミノ酸置換は他のポリエン骨格を合成すると予測される幾つかの II 型 PKS の CLF (skyllamycin⁷⁰ / WS9326⁷¹ 生合成経路における Sky22 / Cal30、simocyclinone 生合成経路⁷² における Sim-ORF2 / Smc-KSI、colabomycin⁷³ / asukamycin⁷⁴ 生合成における ColC14/AsuC14 など) にも見られる。さらに、系統解析から、Iga11、Iga12 を含む幾つかのポリエン骨格を合成すると予測される KS、CLF は典型的な II 型 PKS のものと進化的に異なったグループに属することが示唆された (Figure 3-14)。このサブグループに属する KS、CLF からなる II 型 PKS は高還元型 II 型 PKS として分類でき、それらは芳香族化合物の代わりに比較的還元度の高いポリエンの生合成を触媒すると考えられた。

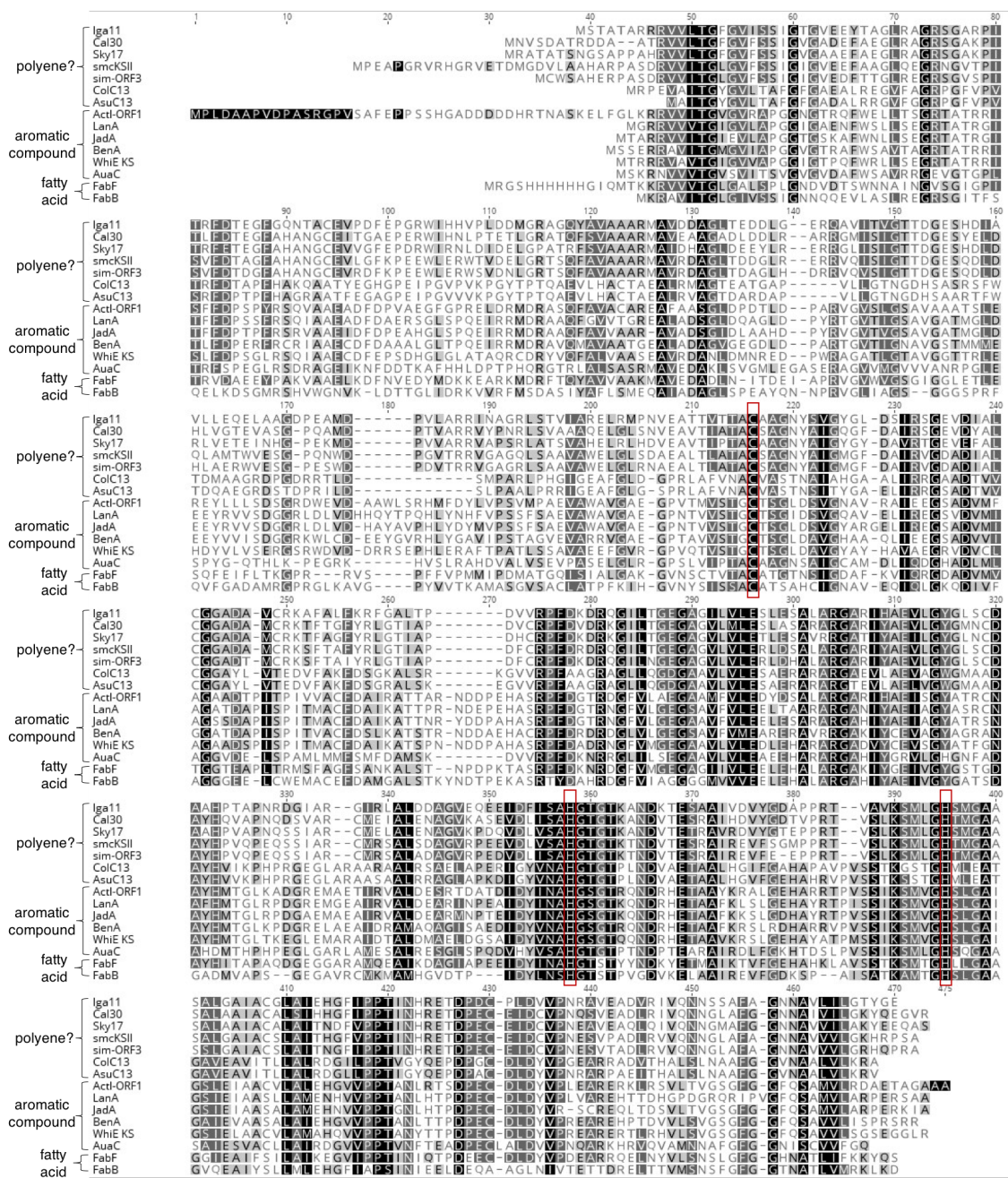


Figure 3-12. II型PKSとFASにおけるKSサブユニットのアミノ酸配列アライメント。赤枠でKSの活性三残基Cys-His-Hisを示している。用いたII型PKS由来のKSアミノ酸配列の情報はFigure 3-14の系統樹解析のレジェンドに示す。FabFは*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* str.168由来の4IS5_Aを、FabBは*Escherichia coli*由来の5KOF_Bを示す。

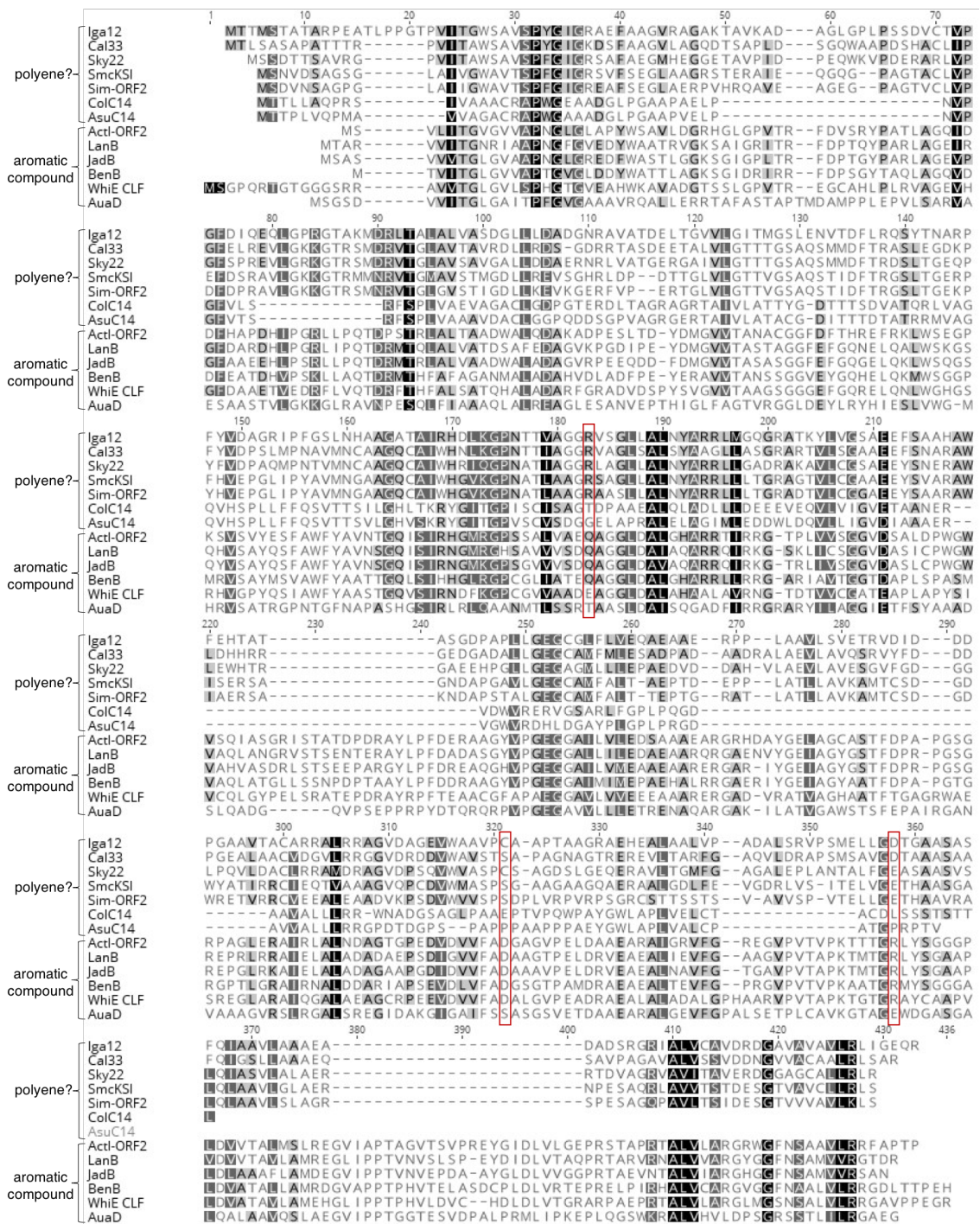


Figure 3-13. II型 PKSにおける CLF サブユニットのアミノ酸配列アライメント。赤枠で KS の活性三残基 Cys-His-His に対応するアミノ酸を示す。用いたアミノ酸配列の情報は Figure 3-14 の系統樹解析のレジェンドに示す。芳香族化合物の生合成に関与する CLF において保存されている Asn-Asp-Arg はポリエンを合成の生合成に関与すると思われるものでそれぞれ Arg、Cys / Ser、Asp / Glu に置き換わっている。

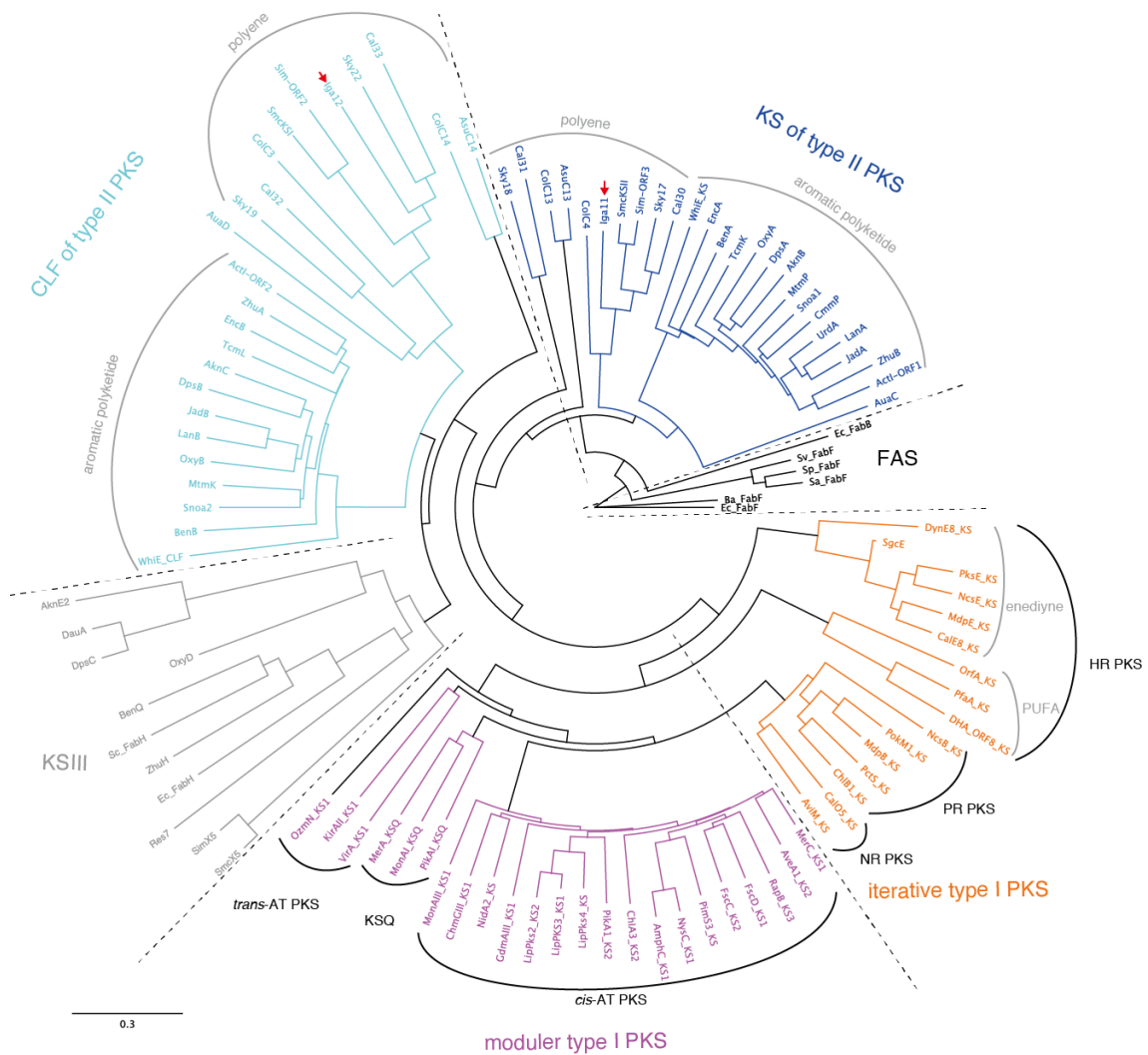


Figure 3-14. Iga11、Iga12 と他の KS、CLF により構築される系統樹。Iga11 と Iga12 はそれぞれ II 型 PKS の KS と CLF における新たなサブファミリーに属する。Iga11、Iga12 と同じサブファミリーに属する KS と CLF を有する PKS 遺伝子クラスターはポリエンの生合成を担うと予想される。系統樹は Geneious tree builder を用いて、neighbor-joining 法で構築した。FabF を outgroup として用いた。距離の計算は BLOSUM62 を用いて、global alignment から算出した。用いてアミノ酸配列を以下に示す。

ActI-ORF1, CAC44200, *Streptomyces coelicolor* A3(2); ActI-ORF2, CAC44201, *Streptomyces coelicolor* A3(2); AknB, AAF70106, *Streptomyces galilaeus*; AknC, AAF70107, *Streptomyces galilaeus*; AknE2, AAF70109, *Streptomyces galilaeus*; AmphC KS1, AJE44524, *Streptomyces nodosus*; AsuC13, ADI58650, *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*; AsuC14, ADI58649, *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*; AveA1 KS2, AGO88718, *Streptomyces avermitilis*; AvIM KS, AAK83194.1, *Streptomyces viridochromogenes* Tue57; BenA, CAM58798, *Streptomyces* sp. A2991200; BenB, CAM58799, *Streptomyces* sp. A2991200; BenQ, CAM58805, *Streptomyces* sp. A2991200; Cal30, ALG65306, *Streptomyces calvus*; Cal31, ALG65305, *Streptomyces calvus*; Cal32, ALG65304, *Streptomyces calvus*; Cal33, ALG65303, *Streptomyces calvus*; CalE8 KS, AAM94794, *Micromonospora echinospora*; CalO5 KS, AAM70355, *Micromonospora echinospora*; ChIA3 KS2, AAZ77696, *Streptomyces antibioticus*; ChIB1 KS, AAZ77673, *Streptomyces antibioticus*; ChmGIII KS1, AAS79460.1, *Streptomyces bikiniensis*; CmmP, Q70J88, *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*; ColC13, AIL50179, *Streptomyces aureus*; ColC14, AIL50180, *Streptomyces aureus*; DauA, Q55225, *Streptomyces* sp.; DHA ORF8 KS, BAA89382, *Moritella marina* ATCC 15381; DpgA, AAM80548,

Streptomyces toyocaensis; DpsA, AAA65206, *Streptomyces peucetius*; DpsB, AAA65207, *Streptomyces peucetius*; DpsC, AAA65208, *Streptomyces peucetius*; DynE8 KS, ACB47048, *Micromonospora chersina*; EncA, AIN46688, *Streptomyces qinglanensis*; EncB, AIN46689, *Streptomyces qinglanensis*; FabF, WP_006605824.1, *Streptomyces auratus* AGR0001; FabF 2, WP_015033414.1, *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712; FabF 3, *Streptomyces coelicolor* A3(2); FabH, CAB62720, *Streptomyces coelicolor* A3(2); FscC KS2, AAQ82564, *Streptomyces* sp. FR-008; FscD KS1, AAQ82568, *Streptomyces* sp. FR-008; GdmAIII KS1, AAO06918, *Streptomyces hygroscopicus*; Iga11, BAX64252, *Streptomyces* sp. MSC090213JE08; Iga12, BAX64253, *Streptomyces* sp. MSC090213JE08; JadA, AAB36562, *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712; JadB, AAB36563, *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712; KirAll KS1, CAN89632.1, *Streptomyces collinus* Tu 365; LanA, AAD13536, *Streptomyces cyanogenus*; LanB, AAD13537, *Streptomyces cyanogenus*; LipPks2 KS2, ABB05103, *Kitasatospora aureofaciens*; LipPKS3 KS1, ABB05104, *Kitasatospora aureofaciens*; LipPks4 KS, ABB05105, *Streptomyces aureofaciens*; MdpB KS, ABY66019, *Actinomadura madurae*; MdpE KS, AAQ17110, *Actinomadura madurae*; MerA KSQ, ABJ97437.1, *Streptomyces violaceusniger*; MerC KS1, ABJ97439, *Streptomyces violaceusniger*; MonAIII KS1, AAO65796, *Streptomyces cinnamomensis*; MonAI KSQ, AAO65796, *Streptomyces cinnamomensis*; MtmK, CAA61990, *Streptomyces argillaceus*; MtmP, CAA61989, *Streptomyces argillaceus*; NcsB KS, AAV51820, *Streptomyces carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus*; NcsE KS, Q83TF5, *Streptomyces carzinostaticus* subsp. *neocarzinostaticus*; NidA2 KS, AAC46025, *Streptomyces caelestis*; NysC KS1, AAF71776, *Streptomyces noursei* ATCC 11455; OrfA KS, AAK72879, *Schizochytrium* sp. ATCC 20888; OxyA, AAZ78325, *Streptomyces rimosus*; OxyB, AAZ78326, *Streptomyces rimosus*; OxyD, AAZ78328, *Streptomyces rimosus*; OzmN KS1, ABS90475, *Streptomyces albus*; PctS KS, BAF92601, *Streptomyces pactum*; PfaA KS, AAL01060, *Photobacterium profundum* SS9; PikA1 KS2, AAC69329, *Streptomyces venezuelae*; PikAI KSQ, AAC69329, *Streptomyces venezuelae*; PimS3 KS, CAC20920, *Streptomyces natalensis*; PksE KS, AAO25894.1, *Streptomyces macromomyceticus*; pokM1 KS, ACN64831, *Streptomyces diastatochromogenes*; RapB KS3, CAA60459, *Streptomyces rapamycinicus* NRRL 5491; Res7, BAU09323, *Streptomyces roseovercillatus*; SgcE, Q8GME1, *Streptomyces globisporus*; Sim-ORF2, AEU17884, *Streptomyces antibioticus*; Sim-ORF3, AEU17885, *Streptomyces antibioticus*; SimX5, AEU17889, *Streptomyces antibioticus*; Sky17, AEA30260, *Streptomyces* sp. Acta 2897; Sky18, AEA30261, *Streptomyces* sp. Acta 2897; Sky19, AEA30262, *Streptomyces* sp. Acta 2897; Sky22, AEA30265, *Streptomyces* sp. Acta 2897; SmcKSI, ALT05933.1, *Kitasatospora* sp. 152608; SmcKSII, ALT05934.1, *Kitasatospora* sp. 152608; SmcX5, ALT05939.1, *Kitasatospora* sp. 152608; Snoa1, Q54495, *Streptomyces nogalater*; Snoa2, Q54496, *Streptomyces nogalater*; SpsA, Q55223, *Streptomyces* sp.; TcmK, AAA67515, *Streptomyces glaucescens*; TcmL, AAA67516, *Streptomyces glaucescens*; UrdA, Q54173, *Streptomyces fradiae*; VirA KS1, BAF50727, *Streptomyces virginiae*; WhiE CLF, CAB45607, *Streptomyces coelicolor* A3(2); WhiE KS, CAB45606, *Streptomyces coelicolor* A3(2); ZhuA, AAG30188, *Streptomyces* sp. R1128; ZhuB, AAG30189, *Streptomyces* sp. R1128; ZhuH, AAG30195, *Streptomyces* sp. R1128.

系統解析において Iga11、Iga12 と同じサブファミリーに属する KS、CLF を含むクラスターの部分構成とその生成物の構造を示す (Figure 3-15)。これらクラスターの生成物はいずれも ishigamide と同様に、ポリエン骨格、もしくはポリエンが異性化、環化して生じた骨格を構造中に含む。生合成遺伝子クラスター中の II 型 PKS (IgaPKS と高い相対性を示す、IgaPKS ホモログ) がポリエン骨格の合成を担うと推測されているが、それを証明するための解析はなされていない。

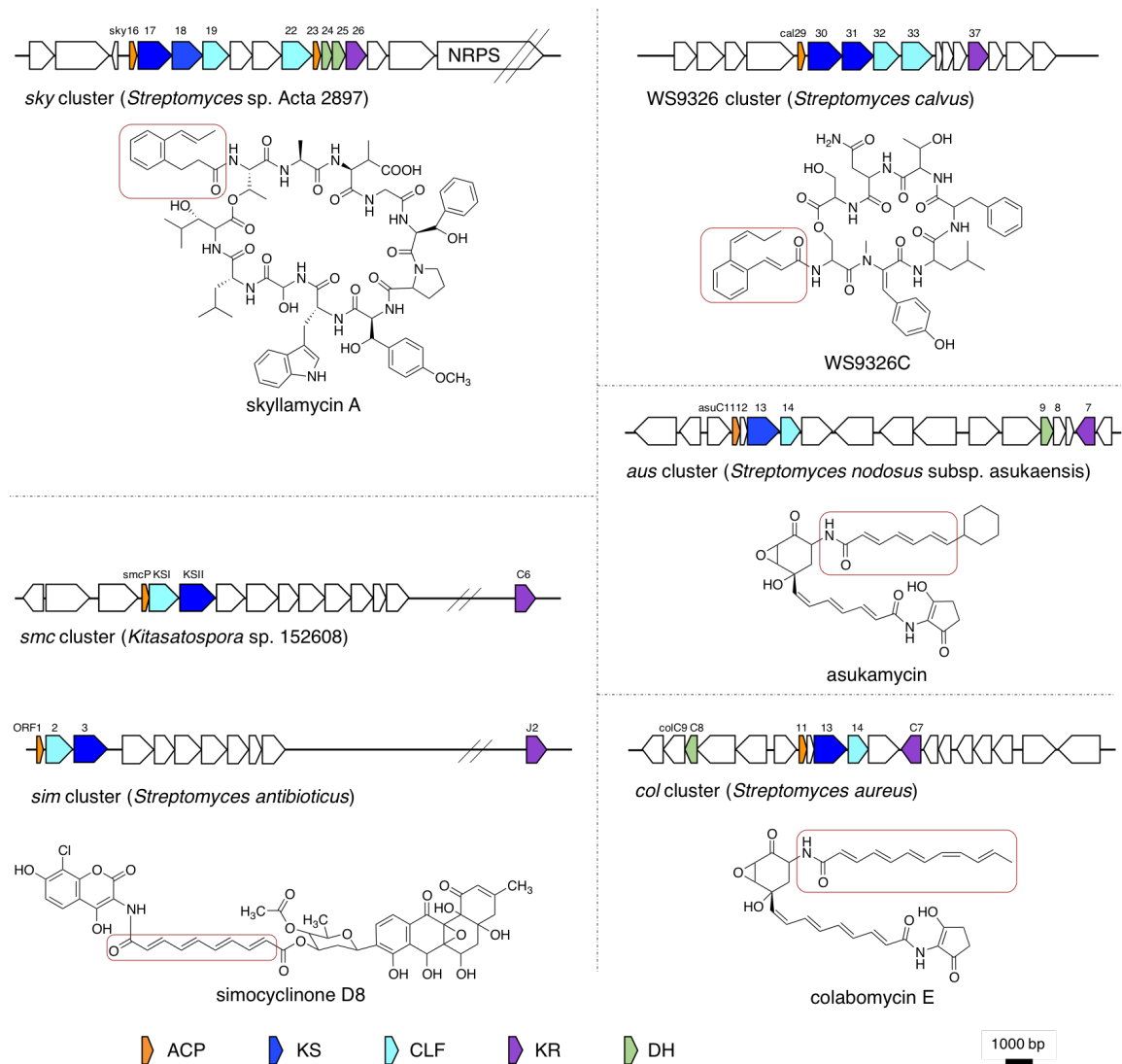


Figure 3-15. IgaPKS ホモログを有する生合成遺伝子クラスターの部分構成とその生成物。赤枠で IgaPKS ホモログより合成されると予想される構造を示す。図中の ACP は Iga10 の、KS は Iga11 の、CLF は Iga12 の、KR は Iga13 の、DH は Iga16 のホモログである。

ここで代表例に PK-NRP ハイブリッド化合物である skyllamycin の予想生合成経路⁷⁰を簡単に紹介する (Figure 3-16)。Sky クラスター中の PKS 酵素群 (KS-CLF、KR、DH) が触媒する鎖伸長、還元、脱水の反応サイクルを 5 回経て、enoyl-ACP (CoA) 中間体 **17** が形成される。Isomerase の触媒により、中間体構造中の二重結合が異性化し、(4*E*,6*Z*,8*E*)-configuration になる。生じた化合物 **18** が環化し、skyllamycin 中の 2-[1-(*Z*-propenyl)-cinnamoyl] 構造を有する化合物 **19** になる。化合物 **19** が NRPS にロードされ、ポリペプチド鎖の伸長、環化、修飾を経て skyllamycin となる。

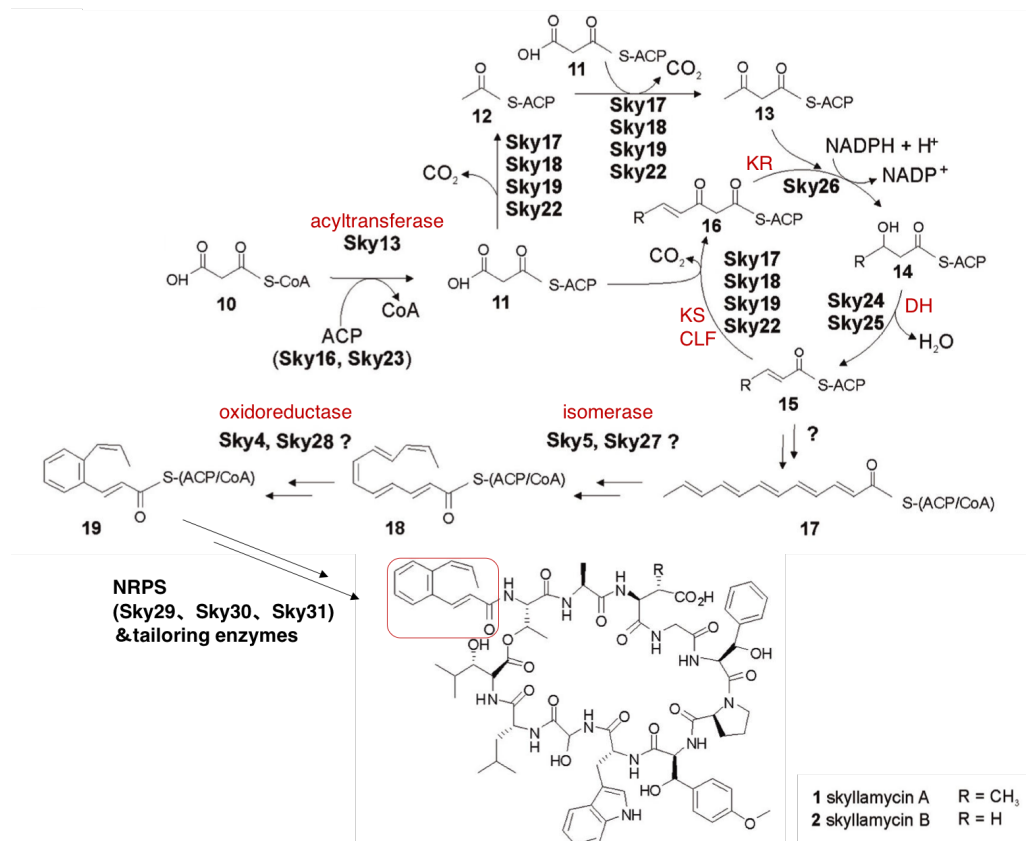


Figure 3-16. Skyllamycin の予想生合成経路。図中赤枠で示した構造は II 型 PKS が触媒する鎖伸長、還元、脱水のサイクルにより生じたポリエン骨格が異性化、環化することにより生じる。

Figure 3-15 に示した他の化合物に含まれるポリエン骨格も KS-CLF、KR、DH が触媒する鎖伸長、還元、脱水の反応サイクルにより合成されると考えられる。これら化合物の生合成クラスター中において、KR がある程度保存されて存在していたため、KR の系統解析を行うことにした。その結果、ポリエンの生合成に関与すると予想される KR は芳香族化合物の生合成に関与するものと独立したクレードを形成していた (Figure 3-17)。一方、これら生合成クラスターにおける DH の保存性は低く、II 型 FAS から DH を借用し、ポリエン合成を行っている可能性がある。

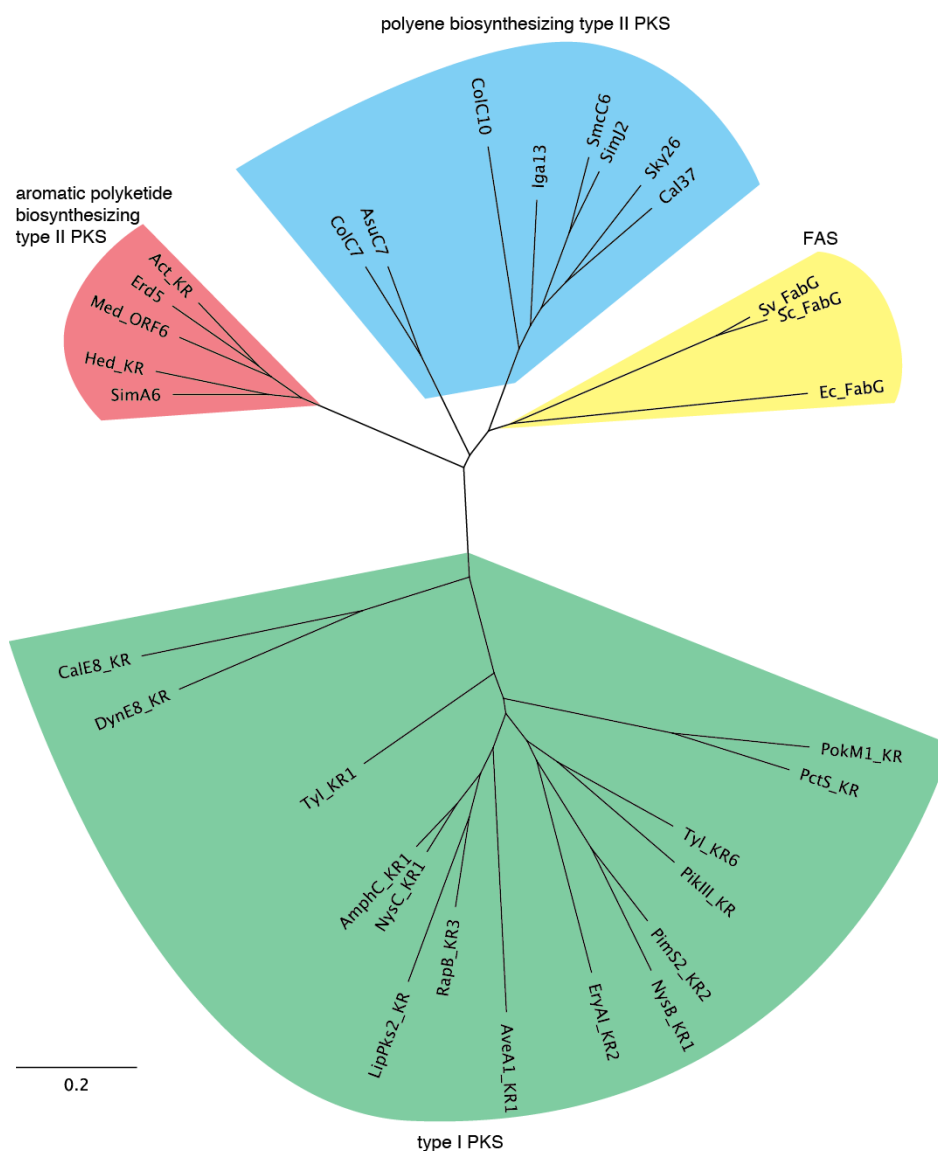


Figure 3-17. Iga13 と他の KR で構築される系統樹。Iga13 は系統的にポリエンの生合成を担う KR サブファミリーに属すると予想される。系統樹の作成は Figure 3-13 の KS の系統樹作成と同じ方法を用いた。用いたアミノ酸配列を以下に示す。Act KR, CAC44199, *Streptomyces coelicolor* A3(2); AmphC KR1, AJE44524, *Streptomyces nodosus*; AsuC7, ADI58639, *Streptomyces nodosus* subsp. *asukaensis*; AveA1 KR1, BAC68648, *Streptomyces avermitilis*; AveA3 KR2, BAC68652, *Streptomyces avermitilis*; Cal37, ALG65299, *Streptomyces calvus*; CalE8 KR, AAM94794, *Micromonospora echinospora*; ColC7, AIL50182, *Streptomyces aureus*; DynE8 KR, ACB47048, *Micromonospora chersina*; EryAI KR2, AAV51820, *Saccharopolyspora erythraea*; FabG, WP_004981596.1, *Streptomyces*; Hed KR, 3SJU_B, *Streptomyces griseoruber*; Iga13, BAX64254, *Streptomyces* sp. MSC090213JE08; LanV, 4OSO_B, *Streptomyces cyanogenus*; LipPks2 KR, ABB05103, *Streptomyces aureofaciens*; NysB KR1, AAF71775, *Streptomyces noursei* ATCC 11455; NysC KR1, AAF71776, *Streptomyces noursei* ATCC 11455; PctS KR, BAF92601, *Streptomyces pactum*; PikIII KR, WP_055641629.1, *Streptomyces venezuelae*; PimS2 KR2, CAC20921, *Streptomyces natalensis*; pokM1 KR, ACN64831, *Streptomyces diastatochromogenes*; RapB KR3, CAA60459, *Streptomyces rapamycinicus* NRRL 5491; SimJ2, AAL15605, *Streptomyces antibioticus*; Sky26, AEA30269, *Streptomyces* sp. Acta 2897; SmcC6, ALT05968, *Kitasatospora* sp. 152608; Tyl KR1, 2Z5L_A, *Streptomyces fradiae*; Tyl KR6, AAB66508, *Streptomyces fradiae*.

生合成産物は不明であるが、IgaPKS のホモログは他の放線菌にも保存されており (Figure 3-18)、IgaPKS タイプの II 型 PKS の存在の普遍性が示唆された。IgaPKS はポリエンの生合成に特化した高還元型 II 型 PKS の代表であり、Iga11、Iga12 は高還元型 II 型 PKS の KS、CLF を代表していると考え、今後研究を進め、その詳細な機能解析を行うことにした。

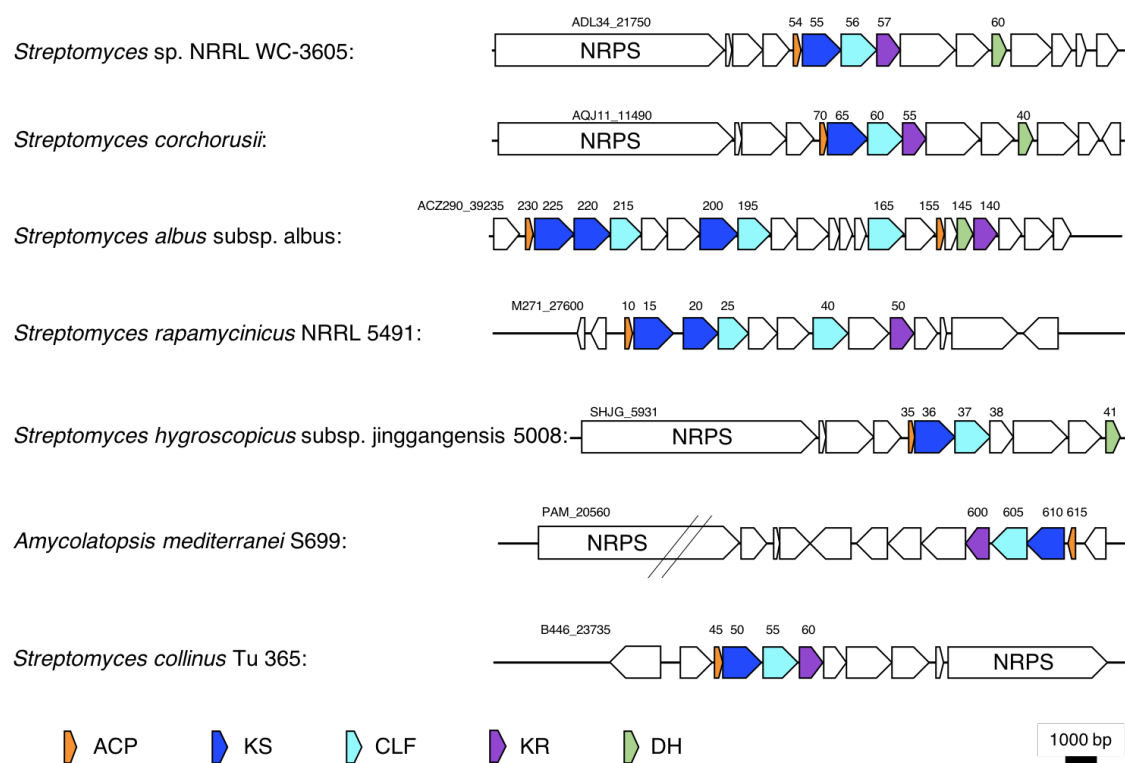


Figure 3-18. 生成物は同定されていないが、IgaPKS ホモログを有する生合成遺伝子クラスターの部分構造。図中の ACP は Iga10 の、KS は Iga11 の、CLF は Iga12 の、KR は Iga13 の、DH は Iga16 のホモログである。

3.3. 考察

本章ではまず3つの *ishigamide* 生合成遺伝子クラスター候補中の KS 遺伝子を破壊することにより *ishigamide* 生合成遺伝子クラスター (*iga cluster*) を決定した。また、*iga cluster* 中 KS、CLF の遺伝子破壊により生産が消失した *ishigamide* 類縁化合物 (compound 305) を1つ単離、同定した。*iga* クラスター中にコードされている各タンパク質の *in silico* 解析の結果を元に、*ishigamide* と compound 305 の生合成経路を予測した (Figure 3-8)。予想生合成経路において、II型 PKS である IgaPKS が触媒する鎖伸長、還元、脱水の反応サイクルにより、ポリエン骨格が合成される。このようなサイクルは FAS が触媒する脂肪酸合成サイクルと類似しているが、FAS では ER が触媒する二重結合の還元が反応サイクルに加わっており、サイクルごとにポリエンの代わりに飽和脂肪鎖が伸長する。また、FAS では KS がホモダイマーを形成し、両者のモノマーが触媒活性を有するのに対し、IgaPKS ではおそらく KS が触媒能を失った CLF がヘテロダイマーを形成し、鎖伸長を触媒する。

ポリエン構造を合成する PKS として、poly unsaturated fatty acid (PUFA) 合成を触媒する反復型 I 型 PKS が知られている。I 型 PKS は異なる機能ドメインが繋がった巨大ペプチド鎖であり、各触媒ドメインと基質がロードされている ACP は空間的に近い位置に存在する。それに対して、II 型 PKS の各サブユニットはそれぞれ単独なタンパク質としてコードされている。それらが効率的に出くわし、順序良く触媒機能を果たし、不安定なポリエン骨格を組み立てるために、巧みなシステムが構築されているだろう。

また、II 型 PKS の機能ドメインが反復的に機能する点は FAS や反復型 I 型 PKS と類似している。しかし、これらの酵素群は異なる生成物を作り上げる。FAS は多くの場合炭素鎖が完全に還元されている飽和脂肪酸を合成する。一方、反復型 I 型 PKS が合成するポリケタイドはその還元度合いによって highly-reduced (HR)、partially reduced (PR)、non-reduced (NR) に分類される。これまでに、II 型 PKS は芳香族化合物の生合成を担うと報告されており、つまり PR や HR のポリケタイドを合成するものとして認識されてきた。今回の系統解析から、II 型 PKS にも HR ポリケタイドを合成する高還元型のものが存在しており、II 型 PKS も反復型 I 型 PKS と同様に生産物の還元度合いによって分類できることが示唆された。

本章では、ポリエンの生合成に特化した高還元型 II 型 PKS の存在を提唱した。*ishigamide* 生合成遺伝子クラスター中に含まれる IgaPKS を高還元型 II 型 PKS の代表として、詳細な機能解析を行うことにした。IgaPKS を研究することは他の高還元型 II 型 PKS の機能解析に繋がると期待できる。

3.4. 実験項

3.4.1. KS 破壊株の作製

相同組換えを用いて、KS 遺伝子をアプラマイシン耐性遺伝子に置き換えることで KS 遺伝子の破壊を行った。pKGLP2 を遺伝子破壊用のベクターとして用いた。

3.4.1.1. 候補 1 中の KS 遺伝子破壊ベクターの作製

JE08 株の染色体 DNA を鋳型として、プライマー17 と 18 (Table 3-2) を用いて PCR により *ishigamide* 推定生合成遺伝子クラスター候補 1 中の KS 遺伝子の上流約 2000 bp の断片を増幅した。同様に、プライマー21 と 22 を用いて KS 遺伝子の下流約 2000 bp の断片も増幅した。また、プライマー19 と 20 を用いて pAT19 から *apramycin* 耐性遺伝子を増幅し、プライマー23 と 24 を用いて pKGLP2⁷⁵を増幅させた。各プライマーの末端に隣り合う DNA 断片との相同配列を導入した。pKGLP2 の場合、BamHI サイト付近にプライマーを設計した。得られた 4 つの相同配列を持つ断片を In-Fusion HD cloning kit (Takara) で繋げた。結果として、pKGLP2 の BamHI サイトに順番に KS 遺伝子の上流約 2000 bp、*apramycin* 耐性遺伝子と KS 遺伝子の下流約 2000 bp の断片が挿入された破壊用ベクターを構築した。

3.4.1.2. 候補 2 中の KS、CLF 遺伝子破壊ベクターの作製

JE08 株の染色体 DNA を鋳型として、プライマー25 と 26 を用いて PCR により候補クラスター2 中の KS と CLF 遺伝子 (後述の *iga11* と *iga12*) を含む領域の上流約 2000 bp の断片を増幅した。同様に、プライマー29 と 30 を用いて KS と CLF 遺伝子を含む領域の下流約 2000 bp の断片も増幅した。2 つの断片と *apramycin* 耐性遺伝子、pKGLP2 断片を In-Fusion で繋げ、KS、CLF の破壊用ベクターを構築した。

3.4.1.3. 候補 3 中の KS 遺伝子破壊ベクターの作製

JE08 株の染色体 DNA を鋳型として、プライマー33 と 34 を用いて PCR により候補クラスター2 中の KS 遺伝子を含む領域の上流約 2000 bp の断片を増幅した。同様に、プライマー37 と 38 を用いて KS 遺伝子の下流約 2000 bp の断片も増幅した。2 つの断片と *apramycin* 耐性遺伝子、pKGLP2 断片を In-Fusion で繋げ、KS 遺伝子の破壊用ベクターを構築した。

3.4.1.4. 形質転換による KS 破壊株の作製

構築した破壊用ベクターを *E. coli* ET12567/pUZ8002 に形質転換し、大腸菌から JE08 株孢子への接合伝達により KS 破壊株の構築を行った。2.4.3.3 節と同様な方法により接合伝達を行った。その後、1.5 mg/ml apramycin と 0.75 mg/ml nalidixic acid の水溶液をプレートに重層し、30°C で 7 日培養し、薬剤耐性で形質転換株を選別した。得られた一次組換え体を新鮮な MS アガー培地に 2 回植え継ぎ、シングルコロニーを選出し、コロニー-PCR により二次組換え体の取得を確認した。

Table 3-4. 第三章で用いたプライマー。プライマー17-40をKSドメイン破壊株の作製に用いた。末端に15bp程度の相同配列を持つ4つのDNA断片をPCRにより増幅し、In-fusionにより繋げることで一つの破壊用ベクターを構築した。In-fusionクローニングに用いられる相同配列を下線、ベクター由来のBamHIサイトを二重の下線で示した。プライマー41-48を破壊株の確認に用いた。

No	Primer	Sequence (5'-3')	Purpose
17	c1upF	<u>TGCCAAGCTTGGAC</u> GGCAGCGAGAGGC GG	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment upstream of the KS encoding region from candidate cluster 1 fused with nucleotides complementary to the end of the linearized pGLP2 vector
18	c1upR	<u>TTCCTATTCTCACG</u> GGACCCCGAGCGGG TA	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment upstream of the KS encoding region from candidate cluster 1 fused with nucleotides complementary to the end of the apramycin resistance gene
19	c1apraF	<u>GGGTCCCGTGAGAA</u> TAGGAACTTCGGAA TAGG	Amplification of the apramycin resistance gene fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment upstream of the KS encoding gene from candidate cluster 1
20	c1apraR	<u>GGACGCCGTCAGGG</u> GATGATAAGTTTAT CACC	Amplification of the apramycin resistance gene fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment downstream of the KS encoding gene from candidate cluster 1
21	c1downF	<u>TATCATCCCCTGAC</u> GGCGTCCTCGCCCG CGG	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment downstream of the KS encoding region from candidate cluster 1 fused with nucleotides complementary to the end of the apramycin resistance gene
22	c1downR	<u>CGCGGATCCTCTGC</u> CCGAGCTGGCCGAC AT	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment downstream of the KS encoding region from candidate cluster 1 fused with nucleotides complementary to the end of the linearized pGLP2 vector
23	c1pGLP2 F	<u>GCTGCCGTC</u> CAAGC TTGGCACTGGCCGT CGTT	Amplification of the pGLP2 vector fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment downstream of the KS encoding region from candidate cluster 1.
24	c1pGLP2 R	<u>GCTCGGGCAGAGGA</u> <u>TCCGCGCCGCGCG</u> CGATA	Amplification of the pGLP2 vector fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment upstream of the KS encoding region from candidate cluster 1.
25	c2upF	<u>TGCCAAGCTTCAGC</u> CCGTCATCAGCTGG AA	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment upstream of the two KS encoding genes from candidate cluster 2 fused with nucleotides complementary to the end of the linearized pGLP2 vector.
26	c2upR	<u>GTTCCCTATTCTCGTA</u> TCGCCCTGGTCTGC GC	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment upstream of the two KS encoding genes from candidate cluster 2 fused with nucleotides complementary to the end of the apramycin resistance gene.
27	c2apraF	<u>AGGGCGATACGAG</u> AATAGGAACCTCGG AATAG	Amplification of the apramycin resistance gene fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment upstream of the KS encoding genes from candidate cluster 2.
28	c2apraR	<u>GGGGTGATCTCAGG</u> GGATGATAAGTTTA TCACCACCG	Amplification of the apramycin resistance gene fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment downstream of the KS encoding genes from candidate cluster 2
29	c2downF	<u>TATCATCCCCTGAG</u> ATCACCCCGAAGCC GGT	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment downstream of the KS encoding genes from candidate cluster 2 fused with nucleotides complementary to the end of the apramycin resistance gene
30	c2downR	<u>CGCGGATCCTGACG</u> TCGTGCGCGACAGC GT	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment downstream of the KS encoding genes from candidate cluster 2 fused with nucleotides complementary to the end of the linearized pGLP2 vector
31	c2pGLP2 F	<u>ATGACGGGCTGAAG</u> CTTGGCACTGGCCG TC	Amplification of the pGLP2 vector fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment downstream of the KS encoding genes from candidate cluster 2.
32	c2pGLP2 R	<u>GCACGACGTCAGGA</u> <u>TCCGCGCCGCGCG</u> CGATAT	Amplification of the pGLP2 vector fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment upstream of the KS encoding genes from candidate cluster 2.
33	c3upF	<u>TGCCAAGCTTACGG</u> AGAAGGACGGGTTG ACGC	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment upstream of the KS encoding gene from candidate cluster 3 fused with nucleotides complementary to the end of linearized pGLP2 vector
34	c3upR	<u>TTCCTATTCTTACCT</u>	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment upstream of

		GATGACCAGCGTGG GGCT <u>TCATCAGGTAAGAA</u>	the KS encoding gene from candidate cluster 3 fused with nucleotides complementary to the end of the apramycin resistance gene
35	c3apraF	TAGGAACTTCGGAA TAGG <u>CGACGTGCAGAGGG</u>	Amplification of the apramycin resistance gene fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment upstream of the KS encoding gene from candidate cluster 3
36	c3apraR	GATGATAAGTTTAT CACC <u>TATCATCCCCTCTG</u>	Amplification of the apramycin resistance gene fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment downstream of the KS encoding gene from candidate cluster 3
37	c3downF	CACGTCGGTCAGCC CGA <u>GCCGCGGATCCTTG</u>	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment downstream of the KS encoding gene from candidate cluster 3 fused with nucleotides complementary to the end of the apramycin resistance gene
38	c3downR	AGCGCGGAGCCAGT CCCGCT <u>CCTTCTCCGTAAGC</u>	Amplification of an approximately 2 kb DNA fragment downstream of the KS encoding gene from candidate cluster 3 fused with nucleotides complementary to the end of the linearized pGLP2 vector
39	c3pGLP2 F	TTGGCACTGGCCGT CGTT <u>TCCGCGCTCAAGGA</u>	Amplification of the pGLP2 vector fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment downstream of the KS encoding gene from candidate cluster 3.
40	c3pGLP2 R	<u>TCCGCGGCCGCGCG</u> CGATAT	Amplification of the pGLP2 vector fused with nucleotides complementary to the end of a DNA fragment upstream of the KS encoding gene from candidate cluster 3.
41	a	ATGCGAAGAATGCG ATGCCG	Confirmation of the construction of JE08S7D1, JE08S7D2 and JE08S7D3
42	b	CGCCATTTCGTATTG CACGAC	Confirmation of the construction of JE08S7D1, JE08S7D2 and JE08S7D3
43	c1	TACGAAGGCCGTGA GGTCCGT	Confirmation of the construction of JE08S7D1
44	c2	ACGCCAAGGTGATC CTCGGC	Confirmation of the construction of JE08S7D1
45	c3	GATCGGGCCGAGGA CCTTCTC	Confirmation of the construction of JE08S7D2
46	c4	GAAAGACGTACCGG TCGCACA	Confirmation of the construction of JE08S7D2
47	c5	ATGCCGAACTGGCG GGGCTT	Confirmation of the construction of JE08S7D3
48	c6	ATGAAGTCGGCGAT CCACGC	Confirmation of the construction of the JE08S7D3

第四章 Ishigamide ポリエン骨格生合成の *in vitro* 再構成

4.1. 背景

二次代謝産物の生合成研究は学術的にも応用的にも大変有意義である。生合成研究を行うことにより、多様な化学構造を作り上げるために生合成酵素が触媒する様々な化学反応とその触媒機構を明らかにできる。そこから得られた知見はさらに、人工設計による新規化合物の創出のための手段を提供できる。

第一章で取り上げたように、PKS に関する研究は古くから世界中で精力的に行われてきた。PKS の起源とされている FAS は生物にとって必須な一次代謝産物である高還元度の飽和脂肪酸や一価不飽和脂肪酸の生合成を担う。一方、PKS が作り上げる二次代謝産物、ポリケタイドは多様な官能基を構造中に有しており、医薬品をはじめとする有用化合物の資源として重要である。PKS も FAS もその構造および反応様式により、I 型と II 型 (PKS の場合、さらに III 型が存在する) に分類できる。反復型 I 型 PKS は、その生産物の還元度合い (還元を触媒する修飾ドメインがモジュール中に存在するか否か) によりさらに高還元型、部分還元型、非還元型に分類される。このような分類に対応付けるなら、典型的な II 型 PKS は部分還元型、非還元型に相当する。なぜなら、典型的な II 型 PKS では、KS-CLF 複合体が連続的に触媒する縮合反応により、ポリケトメチレン鎖が合成される。ポリケトメチレン鎖は殆ど還元を受けず、多くのケト基が残された状態で修飾 (環化、芳香化、酸化、糖転移など) を受け、比較的還元度の低い芳香族化合物となる。一方、本研究の研究対象にあたる II 型 PKS である IgaPKS は ishigamide 構造中の比較的還元度の高いポリエン骨格を生合成する。他にもポリエン生合成を触媒すると予想される II 型 PKS が数例報告されているが、その触媒能を実験的に確かめた例はない。これらのポリエン生合成を担う II 型 PKS は、高還元型 II 型 PKS として分類できる。第四章ではこれまでに *in vitro* 解析されていない高還元型 II 型 PKS に関する知見を得ることを目指し、その代表となる IgaPKS が触媒する反応を試験管内で明らかにすることにした。*in vitro* 解析では、生体内の複雑な環境とは異なり、比較的単純な条件下で酵素反応を研究することができるため、酵素の補因子の同定やその機能解析、速度論解析などが信頼性良く行える。

4.2. 結果

4.2.1. 組換えタンパク質の調製

大腸菌を宿主に用いて、ishigamide ポリエン骨格の生合成に関与すると思われる IgaPKS 酵素群をそれぞれ組換えタンパク質として調製した。また、*S. coelicolor* 由来の malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase (MAT)⁵ も同様に組換えタンパク質として調製した。

pET システム、pCold システムのいずれかを利用して、Iga11 と Iga12 を単独で発現、精製することができなかつたため、Iga11 と Iga12 を複合体として精製することを試みた。*iga11* と *iga12* 遺伝子は天然でオペロンを形成しているため、2つの遺伝子を1つの発現ベクター (pColdI) にクローニングし、共発現させることにした。Iga11 に His-tag、Iga12 に strep-tag を付加し、二段階の affinity chromatography により Iga11-Iga12 複合体を精製した。いずれの affinity 精製段階においても、Iga11 と Iga12 は共精製され、Iga11 と Iga12 が複合体を形成していることが明らかになった (Figure 4-1)。

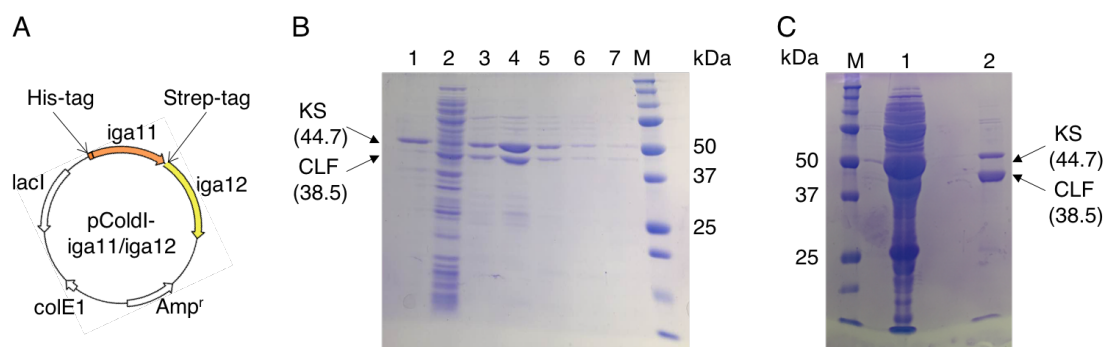


Figure 4-1. Iga11-Iga12 複合体の精製。Lane M、Precision Plus Protein™ Standards All Blue Marker (Bio Rad 社)。A、Iga11-Iga12 タンパク質発現用ベクター。B、His60 Ni²⁺-NTA Superflow 野生型^M Resin を用いた Iga11-Iga12 の His-tag 精製。不溶性画分 (Lane 1)、flo 野生型 hrough (Lane 2)、25 mM (Lane 3)、100 mM (Lane 4)、250 mM (Lane 5) と 500 mM (Lanes 6、7) イミダゾールを含む lysis buffer A (5 mL) で溶出した画分。C、Iga11-Iga12 の strep-tag 精製。Lane 1、野生型 flow through 画分を濃縮したもの。Lane 2、2.5 mM D-desthiobiotin を含む lysis buffer A で溶出した画分を濃縮したもの。

Iga13 と Iga16 は pET-16b ベクターを用いて発現させ、His-Tag を用いた金属精製を行った (Figure 4-2. A)。

Iga10 を *Bacillus subtilis* 由来の基質特異性の緩い PPTase、Sfp と共発現させ、4'-ホスホパンテテニル (Ppant) 化された holo-Iga10 を取得した。His-tag を用いた金属アフィニティー精製とゲルろ過の二段階精製により holo-Iga10 を精製した (Figure 4-2. B)。Iga10 がほぼすべて holo 化されていることを LC-ESIMS 解析より確認した (計算値: 11467、実測値 11464)。

Iga クラスター中に AT 遺伝子が存在しないため、Iga10 は自己アシル化能力を有する、もしくは FAS 由来の MAT を借用し、マロニル化されると考えられる。そこで pET-26b ベクターを用いて、*S. coelicolor* における actinorhodin 生合成に用いられている MAT 酵素を N 末 His-tag タンパク質として発現させ、金属 affinity chromatography により精製した (Figure 4-2. C)。

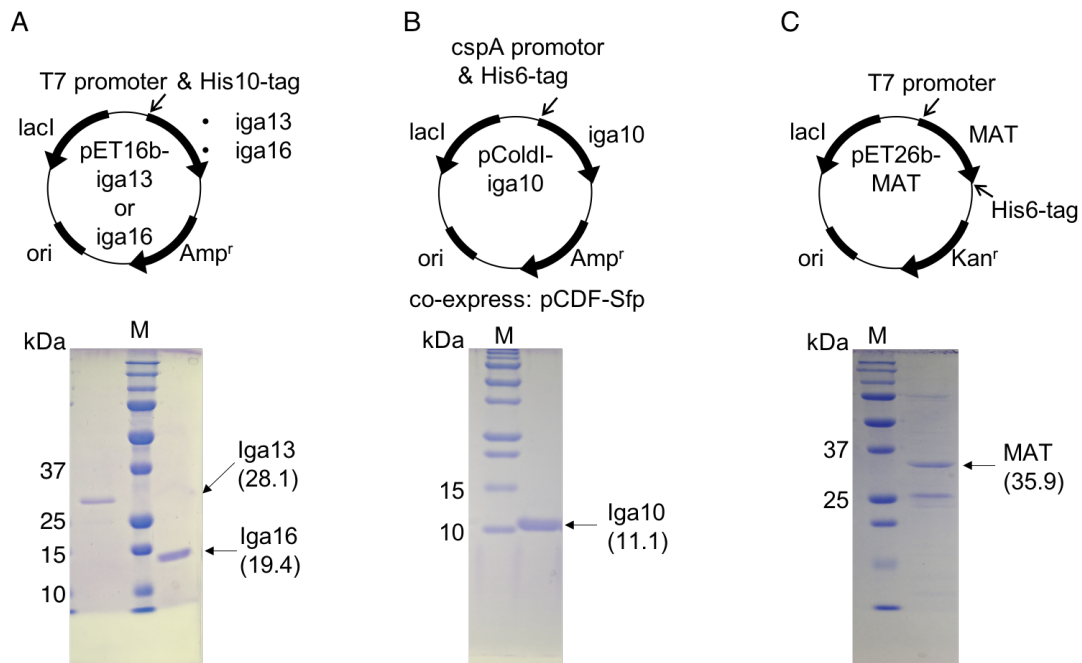


Figure 4-2. Iga10、Iga13、Iga16、MAT の精製。Lane M、Precision Plus Protein™ Standards All Blue Marker (Bio Rad 社)。組換えタンパク質分子量の計算値を括弧の中に示した。A、Iga13 と Iga16 の発現用ベクター及びそれらの精製タンパク質。B、Iga10 の発現用ベクター及びその精製タンパク質。金属アフィニティー精製の後にゲルろ過精製を行った。C、MAT の発現用ベクター及びその精製タンパク質。

4.2.2. Iga13 精製酵素の *in vitro* 解析

Iga13 は KR としてアノテーションされており、 β -ケト基の還元を触媒し、水酸基を生成すると予想される。

第三章の系統樹解析より、Iga13 を始めとするポリエンの生合成に関与すると予想される KR は芳香族化合物の生合成に関与する典型的な II 型 PKS 由来のものと独立したクレードを形成していることが明らかになった。実際、Iga13 のアミノ酸配列は他の典型的な II 型 PKS 由来の KR と 30%程度の identity (典型的な II 型 PKS 由来のもの同士では 60%程度の identity を有する)、I 型 PKS 由来の KR と 20%程度の identity を示す。相同性は比較的低いが、Iga13 と他の KR のアミノ酸配列のアライメント解析より、Iga13 が NAD(P)H 結合サイト (S/TGxxxGxG) と KR で保存されている触媒四残基 (Asn-Ser-Tyr-Lys)⁷⁶ を有していることが明らかになった (Figure 4-3)。従って、Iga13 は他の KR と同様な触媒機構で、NAD(P)H を cofactor に用い、ケト基の還元を触媒すると予想される。また、KR が生産する水酸基の立体は KR のアミノ酸配列から予測できると報告されている。II 型 PKS の KR の場合、PGG モチーフを有する ActKR は R 体の水酸基をメジャーに生産する一方、それが NGG に置き換わった HedKR は S 体の水酸基を生産する⁷⁸。この XGG モチーフは II 型 PKS の KR において普遍的に存在しており、酵素の立体特異性の制御に重要であると提唱されている。I 型 PKS の KR の場合、LDD モチーフを有するものは R 体の水酸基、有さないものは S 体の水酸基を生産すると報告されている⁷⁹。結晶構造解析から、これらのモチーフは cofactor、基質、活性残基の位置関係を制限し、立体選択的なヒドリド転位を起こすのに重要であると報告されている⁸⁰⁻⁸²。しかし、Iga13 はこれらのモチーフをいずれも有さず、代わりに TRD モチーフを有す。他のポリエン合成に関わる KR においてもこの (T/V)RD モチーフが保存されている。このことから、ポリエン合成に関与する KR は独特な機構により生成物の立体を制御していると考えられる。

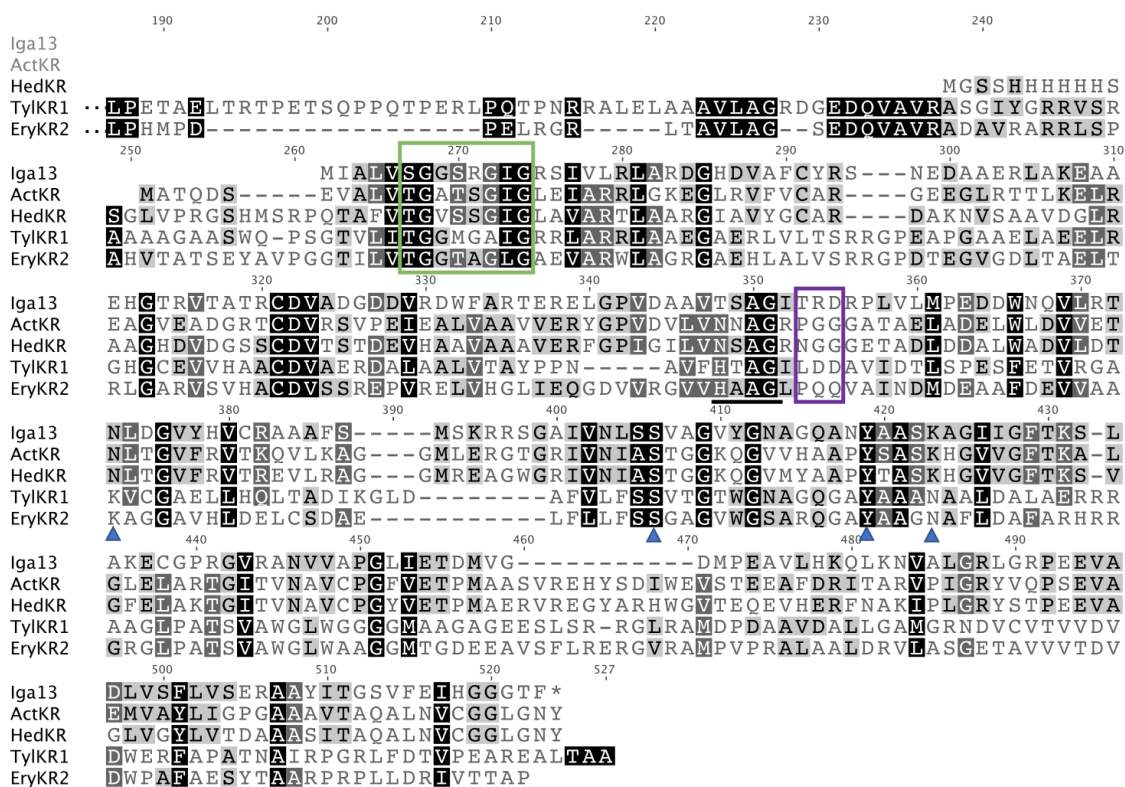


Figure 4-3. Iga13、ActKR、HedKR、TyIKR2 と EryKR2 のアミノ酸配列アライメント。ActKR (CAC44199) と HedKR (3SJU_B) は type II PKS の KR であり、TyIKR1 (2Z5L_A) と EryKR2 (AAV39550.1) は type I PKS 由来の KR である。青三角形で KR の触媒残基を、紫枠で KR の立体特異性に関与する“fingerprint residues”を、緑枠で cofactor 結合部位を示す。黒の下線で NNAG モチーフを示す。

IgaPKS が触媒する反応サイクルにおいて、伸長中のポリケタイド中間体は翻訳後修飾された holo-Iga10 の Ppant アームとチオエステル結合していると考えられる。そのため、Ppant アームを部分的に模倣する *N*-acetylcysteamine (NAC, Figure 1-14. B) 体を有機合成し、*in vitro* 反応に供することにした。Ishigamide 生合成におけるスターターユニット (hexanoyl ユニット) と malonyl 基が縮合して生じる 3-oxooctanoyl-Ppant-Iga10 を模倣する 3-oxooctanoyl-NAC (**1**)を Iga13、NADH / NADPH とインキュベートしたところ、(3*R*)-hydroxyoctanoyl-NAC (**2R**) の生成が確認された (Figure 4-4. A)。Iga13 が触媒する還元反応は NADH より NADPH を cofactor として好む。また、この反応は立体選択的に進行しており、(3*S*)-hydroxyoctanoyl-NAC (**2S**) の生成は全く観察されなかった。次に化合物 305 の生合成におけるスターターユニット (butyryl ユニット) が malonyl 基と縮合して生じる中間体を模倣する 3-oxohexanoyl-NAC (**3**) を基質に用いて同様な *in vitro* 解析を行った。その結果、(3*R*)-hydroxyhexanoyl-NAC (**4R**) が立体特異的に生成された (Figure 4-4. B)。

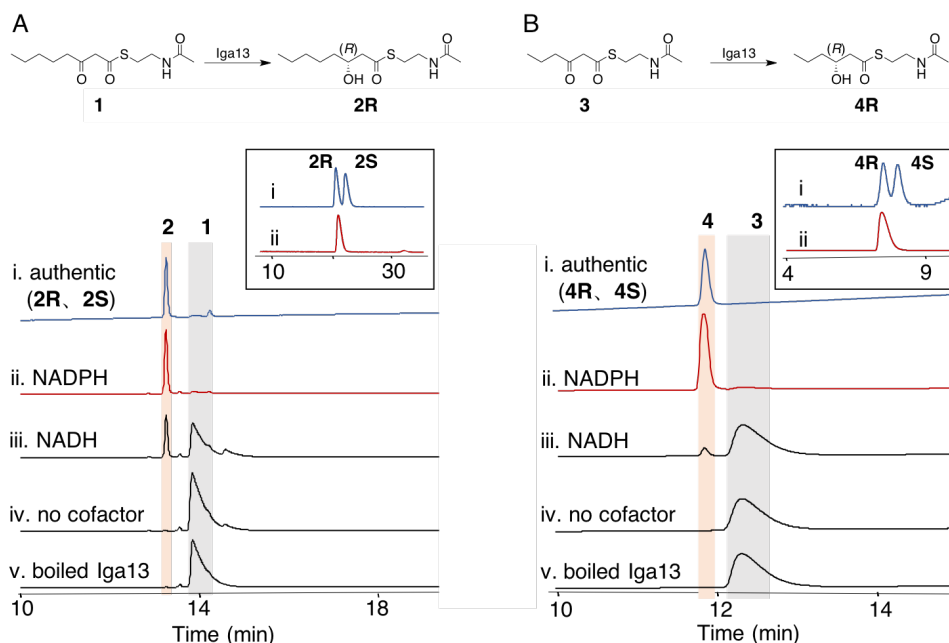


Figure 4-4. Iga13 の *in vitro* 解析。Iga13 は化合物 **1** (A) と化合物 **3** (B) に対し、立体特異的に還元反応を触媒する。UV 吸収により化合物の検出を行った (230 nm)。(i) 有機合成した **2R**、**2S** もしくは **4R**、**4S** を標品として用いた。(ii) 化合物 **1** / **3** を Iga13、NADPH とインキュベートした場合、**2R** / **4R** が生成する。(iii) 化合物 **1** / **3** を Iga13、NADH とインキュベートした場合、少量の **2R** / **4R** が生成する。(iv) 化合物 **1** / **3** を Iga13 のみとインキュベートした場合や、(v) 化合物 **1** / **3** を煮沸した Iga13、NADPH とインキュベートした場合、生成物は観察されない。黒枠の中にキラルカラム CHIRALCEL OD-3R を用いた時のクロマトグラムを示す。(vi) 有機合成した 標品の **2R**、**2S** もしくは **4R**、**4S**。(vii) ii と同じ反応条件により得た生成物。

次に Iga13 の速度論解析を行った。Iga13 は NADPH / NADH を cofactor として用いており、cofactor の消費量は生成物の生成量と比例する。化合物 **1** (800 μM) を基質に用いた際、NADH (210 μM) を cofactor に用いた時の反応速度は NADPH (210 μM) を用いた時の 2.3%であった。そのため、NADPH が示す 340 nm における吸光量の減少を指標に速度論解析を行った (Figure 4-5)。その結果、cofactor (NADPH) や基質 (**1** または **3**) の濃度と反応初速度のプロットは Michaelis-Menten の式に当てはまる双曲線を示した。Iga13 は化合物 **1** に対し、化合物 **3** を基質とする時の 9 倍程度の $k_{\text{cat}} / K_{\text{m}}$ を示した。このことから、Iga13 は化合物 **1** をより基質として好むことが考えられる。

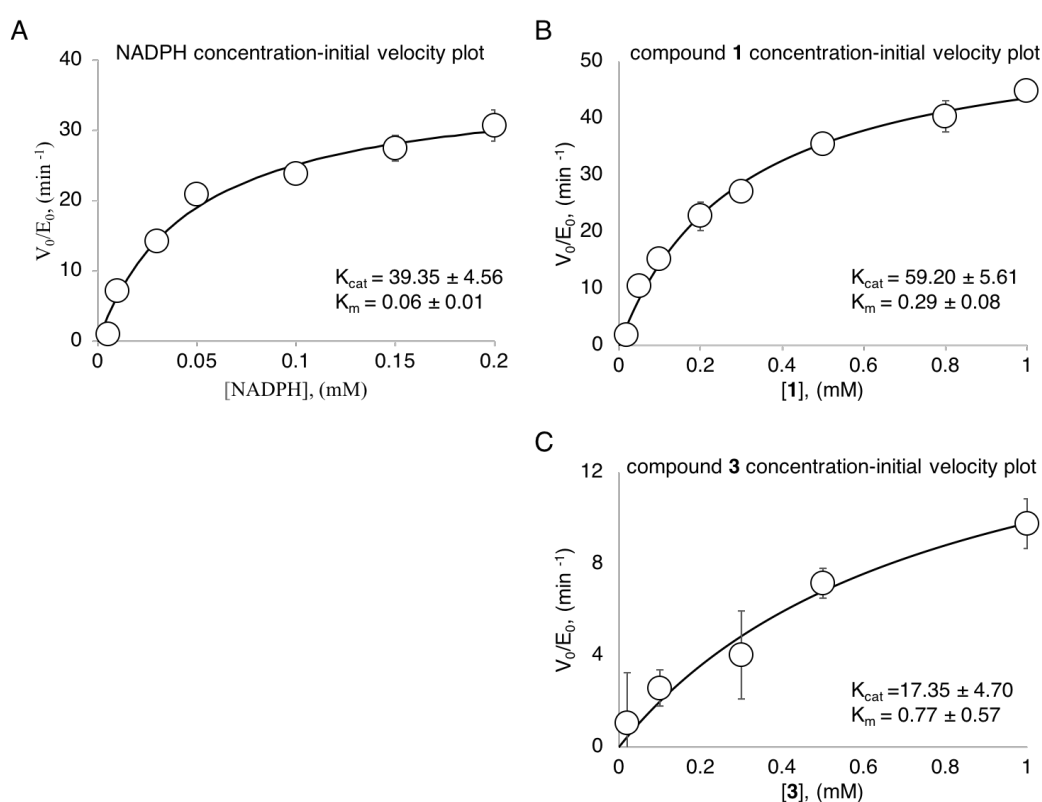


Figure 4-5. Iga13が触媒するケト還元反応の Michaelis-Menten 曲線。酵素反応を 30°C で行った。バーで標準誤差 (n=3) を示す。A、Iga13 (0.9 μM) が触媒するケト還元反応における NADPH 濃度と反応初速度のプロット。化合物 **1** の濃度を 800 μM に固定した。B、Iga13 (1 μM) が触媒するケト還元反応における化合物 **1** 濃度と反応初速度のプロット。NADPH の濃度を 210 μM に固定した。C、Iga13 (1 μM) が触媒するケト還元反応における化合物 **3** 濃度と反応初速度のプロット。NADPH の濃度を 210 μM に固定した。

また、Iga13 の速度論パラメーターは他の I 型や II 型 PKS が有する KR^{83,84,85} のものと同等である (Table 4-1)。GST-tag を付加した KR の k_{cat} / K_m は他と桁が違う (低い) が、それは大きいタグが付加されている影響だと考察されている。また、HedKR が触媒する反応が ActKR より遅い理由の一つとして、ActKR の NNAG モチーフ (Figure 4-3) が HedKR において NSAG に置き換わっていることが考察されている⁷⁷。NNAG モチーフは典型的な II 型 PKS の KR において普遍的に存在しており、central β -sheet の安定化に重要とされている。しかしこのモチーフは Iga13 において TSAG に変わっている。他のポリエン合成に関わる II 型 PKS の KR においても NNAG モチーフの 1、2 番目の残基にゆらぎが見られる。これは 2 つのクレードの KR の差異を示唆しているものであろう。

Table 4-1. Iga13 と他の KR が示す速度論パラメーター

Enz.	substrate	identity (%)	stereo-specificity	K_m (mM)	k_{cat} (min ⁻¹)	k_{cat} / K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹)
Iga13		-	R	0.29 ± 0.08	59.2 ± 5.61	192.7 ± 41.3
Iga13		-	R	0.77 ± 0.57	17.35 ± 4.70	22.4 ± 11.3
LovB		19.49	-	2	34.3	18.5
GST-eryKR1		26.2	R	35 ± 4	15.6 ± 0.6	0.042 ± 0.006
GST-tylKR1		20.69	R	13 ± 2	36.6 ± 0.24	0.28 ± 0.06
ActKR		32.03	S:R=3:1	0.76 ± 0.09	153 ± 7.2	193.8 ± 19.2
HedKR		33.81	S	0.59 ± 0.15	11.4 ± 0.45	11.0 ± 2.85

4.2.3. Iga16 精製酵素の *in vitro* 解析

Iga16 は他の PKS 由来の DH と 10% 程度の配列相同性しか示さない。しかし、BLAST 解析から Iga16 は hotdog fold を構造中に有しており、NodN⁸⁶ や MaoC⁸⁷ dehydratase と相同性を示すことが示唆された。また、Iga16 は DH において保存されている活性残基 (His、Asp) を有している。そのため、Iga16 は Iga13 が触媒する反応により生じる β -水酸基の脱水を触媒し、二重結合の生成を触媒すると予測される。

実際、Iga16 は *in vitro* で **2R** を *trans*-2-octenoyl-NAC (**5**) に立体特異的に変換する活性を示したが、**2S** を基質として受け入れなかった (Figure 4-6)。この時、酵素反応により得られた生成物 **5** の vinyl proton 間のカップリング定数 ($J = 15.5$ Hz) を NMR 解析により確認し、*trans* 体のみが生じていることを確認した。また、Iga16 は **5** を **2R** に変換させる活性も有している。反応が平衡に達した時、**2R** と **5** の比率はおおよそ 1 : 1.2 であった。*In vitro* において、Iga16 は **2R** を完全に **5** に変換していないが、ishigamide 生合成過程において、二重結合を有するポリケタイド中間体は次の伸長サイクルに供され、縮合反応の基質となる。その時、Iga16 が触媒する反応の平衡はより脱水の方向に偏ると考えられる。また、Iga16 は立体特異的に **4R** と *trans*-2-hexenoyl-NAC (**6**) の変換を触媒でき、反応が平衡に達した時、**4R** と **6** の比率はおおよそ 1 : 0.35 であった (Figure 4-7)。

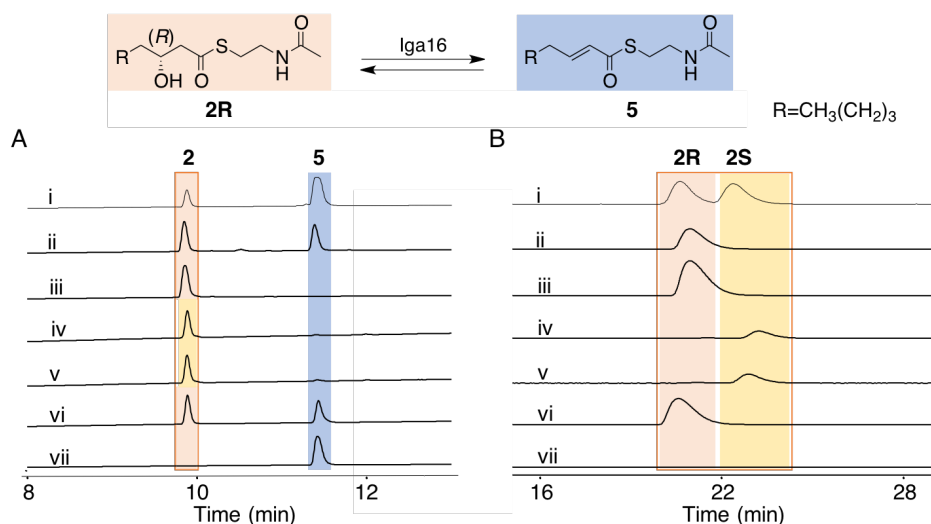


Figure 4-6. Iga16 が触媒する **2R** と **5** の変換反応を図の上部に示した。UV 吸収により化合物の検出を行った (230 nm)。A に COSMOCORE 2.6C18 カラム、B に CHIRALCEL OD-3R カラムを分析に用いた際に得たクロマトグラムを示す。(i) 有機合成した **2R**、**2S** と **5** を標品として用いた。(ii) 化合物 **2R** を Iga16 とインキュベートすることにより、**5** が生じた。(iii) **2R** を煮沸した Iga16 とインキュベートした場合、生成物は観察されない。(iv) 化合物 **2S** を Iga16 とインキュベートした場合、生成物は観察されない。(v) **2S** を煮沸した Iga16 とインキュベートした場合、生成物は観察されない。(vi) 化合物 **5** を Iga16 とインキュベートすることにより、**2R** が生じた。(vii) **5** を煮沸した Iga16 とインキュベートした場合、生成物は観察されない。

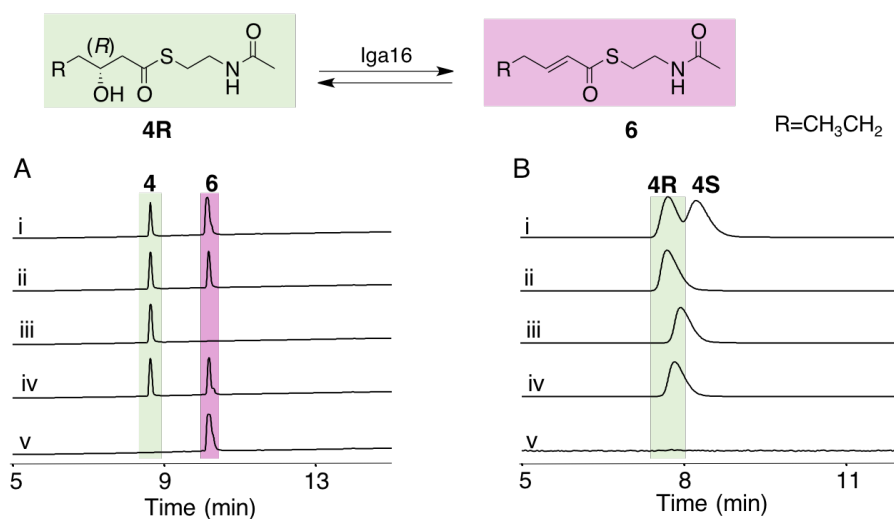


Figure 4-7. Iga16が触媒する**4R**と**6**の変換反応を図の上部に示した。UV吸収により化合物の検出を行った(230 nm)。AにCOSMOCORE 2.6C18カラム、BにCHIRALCEL OD-3Rカラムを分析に用いた際に得たクロマトグラムを示す。(i)有機合成した**4R**、**4S**と**6**。(ii)化合物**4R**をIga16とインキュベートすることにより、**6**が生じた。(iii)**4R**を煮沸したIga16とインキュベートした場合、生成物は観察されない。(iv)化合物**6**をIga16とインキュベートすることにより、**4R**が生じた。(v)**6**を煮沸したIga16とインキュベートした場合、生成物は観察されない。

次に化合物**5**を基質にIga16の速度論解析を行った。化合物**5**は263 nmに極大吸収波長を示す。酵素反応の進行に連れて観察される化合物**5**由来の吸光の減少速度よりIga16が触媒する水付加反応の速度論パラメーターを算出した(Figure 4-8. A)。化合物**5**濃度と反応初速度のプロットはMichaelis-Mentenの式に当てまる双曲線を示した。Iga16と他のDHの速度論パラメーター⁸⁸⁻⁹⁰はばらつきが大きい(Figure 4-8. B)、Iga16の**5**に対する k_{cat}/K_m はIga13が**1**に対する k_{cat}/K_m の約1/5である。

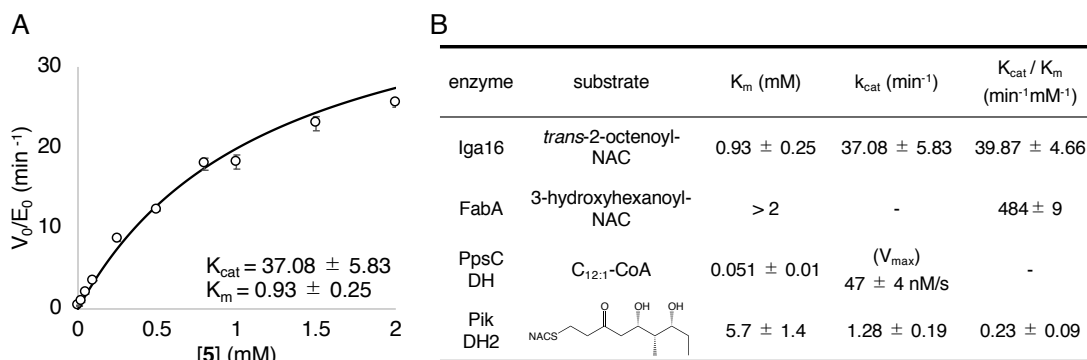


Figure 4-8. Iga16の速度論パラメーター。A、Iga16が触媒する水酸化反応のMichaelis-Menten曲線。酵素反応を30°Cで行った。バーで標準誤差(n=3)を示す。Iga16(2.5 μM)が触媒する水酸化反応における基質**5**の濃度と反応初速度のプロット。B、Iga16と他のDHの速度論パラメーターの比較。

以上の結果から、Iga13 と Iga16 は連続して立体特異的な反応を触媒し、 β -ケト基を *R* 体の水酸基、*E* 体の二重結合へと変換することが明らかになった。この結果は、ishigamide と compound 305 構造中の二重結合がすべて *E* 体であることと矛盾しない。I 型 PKS において、KR と DH は生成物の幾何異性制御に重要な役割を担っており、*R* 体の水酸基は *syn* dehydration により、*E* 体の二重結合に変換させると報告されている^{79,32}。IgaPKS の場合でも、この法則は応用できる。

4.2.4. Iga10 精製酵素を用いた *in vitro* 反応

I 型、II 型 PKS において、ポリケタイドの合成は ACP を足場に行われる。II 型 PKS は通常、伸長ユニットである malonyl 基を holo-ACP の Ppant アームにチオエステル結合させる専用の AT を持たない。そのため、伸長ユニットの ACP へのロードには、FAS の MAT を借用する²¹か、ACP が自己アシル化能を示す²²。そこで、Iga10 の自己アシル化能力を調べた。Sfp と共発現させることにより取得した Iga10 はほぼすべて holo 化されており、Ppant アームが付加されていた。Holo-Iga10 を 1 mM の malonyl-CoA とインキュベートしたところ、malonyl-Iga10 と MS が一致する化合物ピークが LC-MS 解析において観察された (Figure 4-9)。この結果から、Iga10 が自己マロニル化能を有していることが明らかになった。Iga10 のマロニル化効率を改善するため、反応系に *S. coelicolor* 由来の MAT の追加を試みたが、それによる改善は見られなかった。

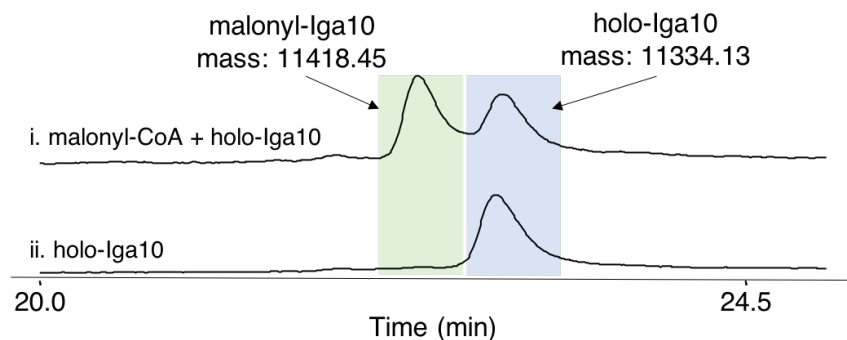


Figure 4-9. UV 吸収 (280 nm) によりタンパク質の検出を行った。(i) holo-Iga10 を malonyl-CoA とインキュベートした場合、malonyl-Iga10 が検出される。(ii) holo-Iga10 の精製タンパク質。MS データのデコンボリューションにより算出された malonyl-Iga10 と holo-Iga10 の分子量はそれぞれ 11418.45 Da と 11334.13 Da である。大腸菌を宿主として組み換えタンパク質を調製する場合、タンパク質の開始メチオニンが大腸菌の内在性酵素により切断される場合がある。今回の検出された分子量は開始メチオニンが切断された His タグ付加 malonyl-Iga10 と holo-Iga10 の分子量の理論値 (11418 Da、11334 Da) と一致する。これと別に、タンパク質の開始メチオニンが切断されていないものに相当する MS ピークも観察されていたが、図中では MS スペクトルにおいて強度の強い、開始メチオニンが切断されたものの分子量を記述する。

4.2.5. Iga11-Iga12 精製酵素を用いた *in vitro* 反応

本節では実験によっては4.2.1節と異なる発現ベクターにより調製した Iga11-Iga12 複合体を用いた。4.2.1節では Iga11 の N 末端に His6 タグを付加したものを調製しているが、それと別に Iga11 と Iga12 の N 末端にそれぞれ His8 と His6 タグを付加したものも使用している (発現ベクター設計に関する詳細な説明は第五章で記述するが、ベクターの構築、タンパク質の発現精製法は本章の「4.4. 節 実験項」に記述する)。便宜上、本節の実験において前者を使用した際は 1His-Iga11-Iga12、後者を使用した際は 2His-Iga11-Iga12 と記述する。

最後に、Iga11-Iga12 のクライゼン縮合活性を調べた。そのため、1His-Iga11-Iga12、Iga10 を hexanoyl-CoA、malonyl-CoA とインキュベートした。反応液のアルカリ加水分解により、Iga10 から切り離されたポリケタイド中間体の単離を試みたが、生成物を LC-MS により検出することができなかった。代わりに、反応液を加水分解せずに polyketide intermediate-Iga10 の LC-MS 解析を試みた。その結果、少量の 3-oxooctanoyl-Iga10 の生成が検出された (Figure 4-13)。この結果から、Iga11-Iga12 は malonyl-Iga10 の脱炭酸を触媒し、生じる acetyl ユニットを自身に結合した hexanoyl ユニットと縮合させる活性を有していることが示された。この反応系において、他の polyketide intermediate-Iga10 は検出されていない。つまり、Iga11-Iga12 は引き続き 3-oxooctanoyl ユニットと malonyl ユニットの縮合を触媒できないと考察できる。Iga11-Iga12 は β -keto 基を有するポリケタイド中間体を基質として認識せず、 β -keto 基が Iga13、Iga16 の触媒により二重結合に変換されたものを再度基質として受け入れると考えた。

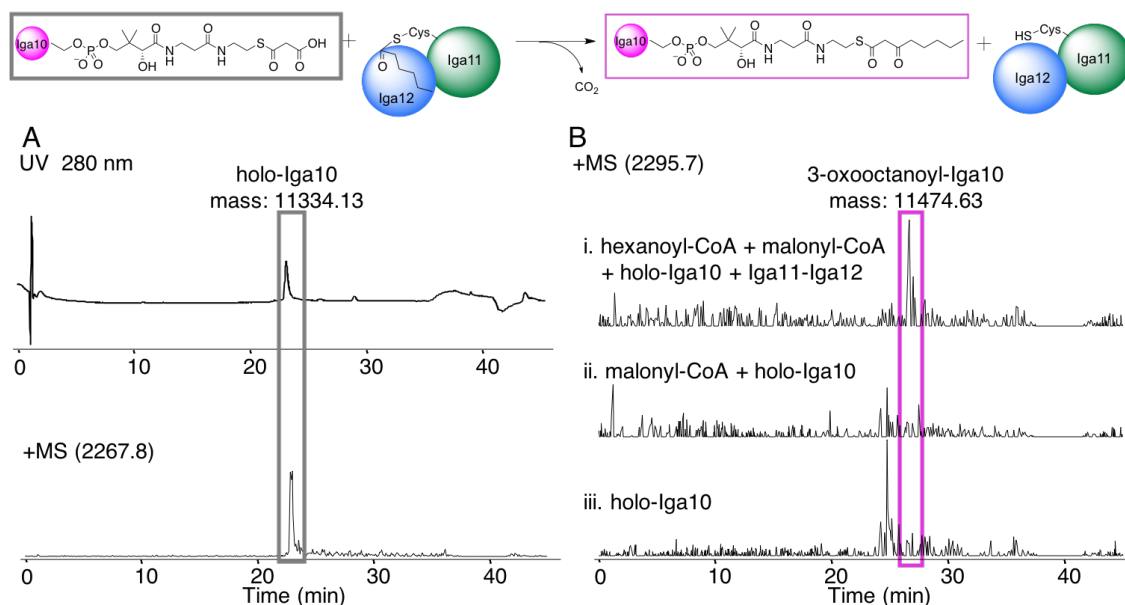


Figure 4-13. Iga11-Iga12 の触媒により生じる polyketide-Iga10 中間体の LC-MS 解析。Iga11-Iga12が触媒する hexanoyl ユニットと malonyl ユニットの縮合反応を図の上段に示した。開始メチオンが切断された His-tag 付加 holo-Iga10 と 3-oxooctanoyl-Iga10 の分子量の理論値はそれぞれ 11334 Da、11474 Da である。A、反応に用いた holo-Iga10 の LC-MS 解析。UV 吸収 (280 nm) と extracted ion chromatogram (positive ion mode、 m/z 2267.8) より検出を行った。この m/z は holo-Iga10 の五価イオン ($[M+5H]^{5+}$) に相当する。B、3-oxooctanoyl-Iga10 の検出。extracted ion chromatogram (positive ion mode、 m/z 2295.7) より検出を行った。この m/z は 3-oxooctanoyl-Iga10 の五価イオン ($[M+5H]^{5+}$) に相当する。(i) holo-Iga10 を malonyl-CoA、hexanoyl-CoA、Iga11-Iga12 とインキュベートしたところ、3-oxooctanoyl-Iga10 が生じた。(ii) holo-Iga10 を malonyl-CoA のみとインキュベートした。(iii) holo-Iga10 の精製タンパク質。

4.2.6. IgaPKS を用いた *in vitro* ポリエン合成経路の再構築

IgaPKS のポリエン合成活性を調べるため、上記の組換えタンパク質 (ここでは 1His-Iga11-Iga12 を使用) すべてを用いて *in vitro* アッセイを行った。基質には malonyl-CoA と hexanoyl-CoA を用い、cofactor には NADPH を用いた。反応後、TCA 沈殿によりタンパク質を回収し、アルカリ加水分解により Iga10 に結合しているポリケタイド鎖を切り離した。酸性酢酸エチルを用いて生成物を抽出し、LC-MS 分析に供した。その結果、すべての組換えタンパク質と CoA エステルを含む反応系においてのみ、4 つの化合物の生成が観察された (Figure 4-14)。

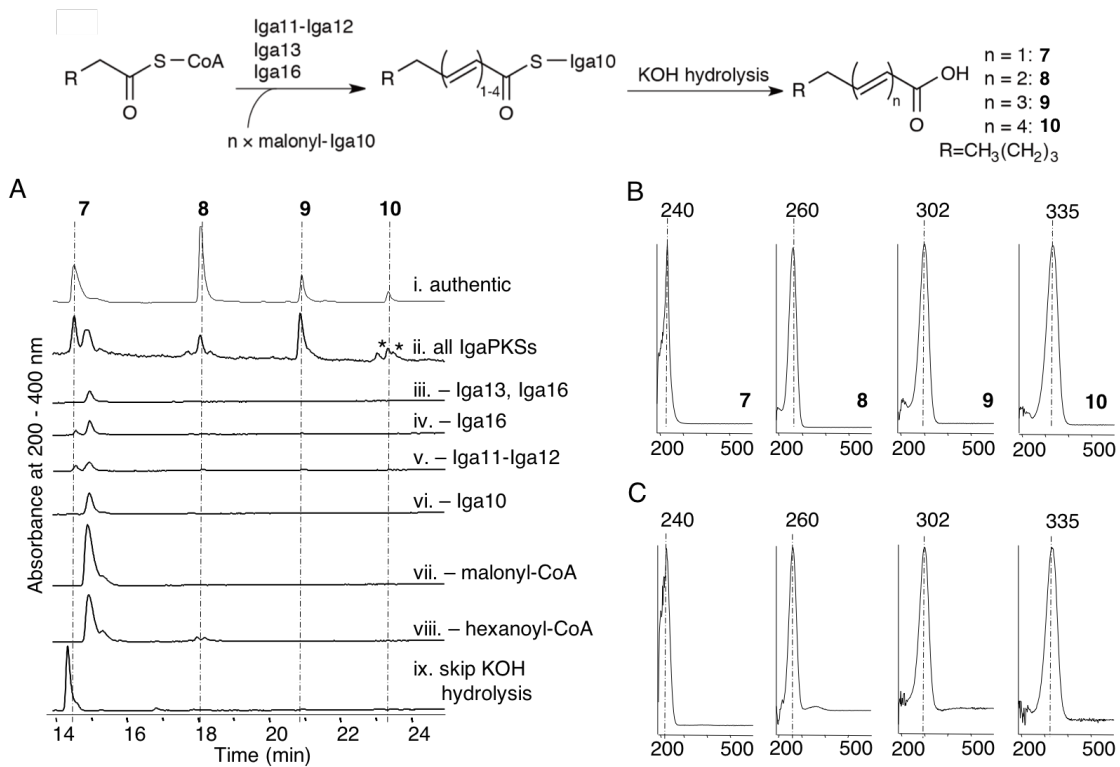


Figure 4-14. IgaPKS が触媒するポリエン合成の LC-MS 解析。図の上段に IgaPKS が触媒する反応により生じるポリエン骨格を含む polyketide-Iga10 中間体、およびそれらのアルカリに加水分解により生じる不飽和カルボン酸を示す。A、反応生成物の LC クロマトグラム。すべてのタンパク質と CoA エステルを含む系において、4 つの不飽和脂肪酸が検出された。UV 吸収スペクトルから、アスタリスクで示した化合物は 10 の異性体 (酸塩基処理、加熱や光照射による二重結合の *cis-trans* 異性体) であると予測する。B、有機合成した化合物 7、8、9、10 の UV 吸収スペクトル。C、酵素反応により生じた 7、8、9、10 の UV 吸収スペクトル。

有機合成した標品と比較したところ、これらの化合物は異なる伸長回数を経て生じた polyketide intermediate-ACP 中間体から切り離された不飽和脂肪酸: (2*E*)-octenoic acid (7)、(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienoic acid (8)、(2*E*,4*E*,6*E*)-dodeca-2,4,6-trienoic acid (9) と (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-tetradeca-2,4,6,8-tetraenoic acid (10) であることが明らかになった。同時に、10 の二重結合が異性化して生じると思われる化合物が検出された。これはおそらく非中性 pH、高温、光照射に対するポリエンの不安定性によるものと考えられる。反応系から修飾酵素を除くと、生成物は一切検出されなくなる。以上の結果から、IgaPKS は縮合、還元、脱水の反応サイクルを繰り返すことにより、ポリエン骨格を合成することが示された。

この反応系において、ケト基や水酸基を有するカルボン酸の生成は観察されなかった。そのため、ポリエン合成の過程において、Iga11-Iga12 が触媒する縮合反応が律速段階であると考えられる。

さらに、この反応系において、炭素数が 14 を超えたカルボン酸は検出されていない。これは ishigamide や compound 305 構造中ポリケタイド部位の炭素鎖長が C₁₄ であることと一致する。典型的な II 型 PKS において、KS-CLF の相互作用面において反応ポケットが形成される。CLF はその奥行きを制限し、ポリケタイドの鎖長をコントロールすると報告されている²³。Iga11-Iga12 でも同様な制御機構が存在し、それを利用して IgaPKS は自身の生成物の炭素鎖長を厳密に制御していると考えられる。一方、典型的な KS-CLF は構造上可動性の高いポリケトンを受容し、それが完全長まで伸長した後に放出する。Iga11-Iga12 はよりリジッドなポリエン骨格をポケットに収容する。また、一伸長サイクルごとにβ-ケト基を有するポリケタイド中間体がポケットから放出され、β-ケト基が修飾酵素により二重結合に変換されたものが再び Iga11-Iga12 の基質として受け入れられる。この点において、Iga11-Iga12 は典型的な KS-CLF と異なる機構を有していると考えられる。Iga11-Iga12 の反応ポケットは他と比べて細く、かつポリケタイドの出入りに適していると推測する。

最後に、加水分解処理を省略すると、不飽和脂肪酸は検出されなくなる。つまり、IgaPKS は伸長したポリケタイド鎖を Iga10 から遊離させる thioesterase 活性を有さない。Ishigamide や compound 305 の生合成において、生産菌が有する未知酵素が触媒するβ-alanine の求核攻撃によりポリケタイド鎖が Iga10 から遊離すると考えられる。

4.3. 考察

第四章では ishigamide や compound 305 構造中ポリエー骨格の生合成に関する研究を行った。本章では、IgaPKS 各構成タンパク質を組み換えタンパク質として調製し、それらの活性をそれぞれ *in vitro* で確認し、速度論解析を行った。本章で行った *in vitro* 解析の結果をまとめる (Figure 4-19)。

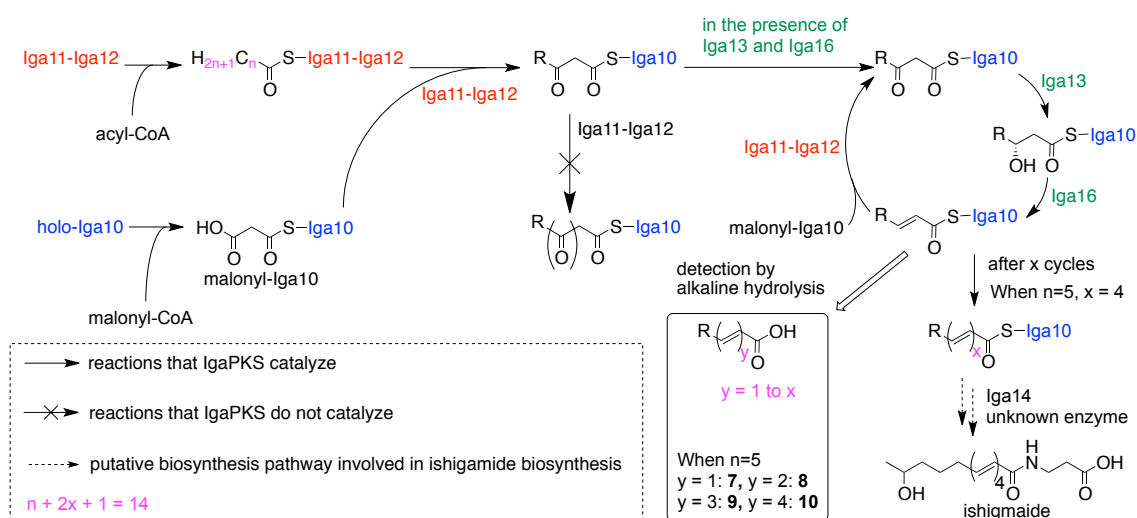


Figure 4-19. *in vitro* 反応による IgaPKS 活性の検証。実線で IgaPKS が触媒できる反応、点線で予想生合成経路を示す。異なる長さの acyl-CoA を開始基質として取り込む場合、その鎖長に応じて IgaPKS が触媒する伸長サイクル数が異なる。Hexanoyl-CoA を開始基質に用いた場合、ishigamide 構造中のポリエー骨格が生合成される。*In vitro* 解析において、アルカリ加水分解より、Figure 4-16 で示す 4 つの不飽和脂肪酸が検出される。

Sfp の触媒により、apo-Iga10 は holo 型に変換される。Holo-Iga10 は自己アシル化能を有しており、malonyl-CoA とインキュベートすることにより、malonyl-Iga10 に変換される。同時に、Iga11-Iga12 は Iga11 の活性 Cys170 にスターター基質となる acyl ユニットのロードできる。さらに Iga11-Iga12 は acyl ユニットと malonyl 伸長ユニットの脱炭酸を伴うクライゼン縮合を触媒する。縮合反応は Iga10 を足場として進行する。その後、修飾酵素が存在しない場合、Iga11-Iga12 は Iga10 上のβ-ケト基を有するポリケタイド中間体と malonyl ユニットの縮合を触媒できず、反応が停止する。一方、修飾酵素が存在する場合、Iga11-Iga12、Iga13、Iga16 がそれぞれ触媒する縮合、還元、脱水の反応サイクルによりポリエー骨格が伸長する。この結果から、Iga11-Iga12 はポリケタイド中間体のβ位に対して厳しい選択性を示し、アシル基やエノール基を有するものを基質として認識する一方、ケト基や水酸基を有するものを縮合反応の基質として受け入れないことが強く示唆された。また、反応サイクルにおいて、Iga13 と Iga16 は厳密な幾何異性

制御を担い、ポリケタイド中間体の β -ケト基を *R* 体水酸基に還元した後、*E* 体の二重結合へ変換する。さらに、IgaPKS は異なる鎖長の acyl-CoA (C₂~C₁₂) をスターター基質として取り込める。この時、伸長サイクル数は acyl-CoA の長さに応じて増減し、最終的に鎖長が C₁₄ のポリケタイドを生成する (MS では C₁₆ のものも検出可能だが、マイナーな副産物であると考えられる)。

本研究により、IgaPKS は Iga10 を足場に、縮合、還元、脱水の反応サイクルを繰り返し触媒し、ポリエン骨格の生合成を担うことが証明された。それより、IgaPKS がポリエン骨格の生合成を担う新規な II 型 PKS であることが示された⁹⁹。本章の背景で述べたように、I 型 PKS は異なる還元度合い (高還元型、部分還元型、低還元型) のポリケタイドを合成できるのに対し、II 型 PKS は部分還元型や低還元型ポリケタイドの合成に特化していると認識されていた¹⁰⁰。本研究により、II 型 PKS も高還元型ポリケタイド (ポリエン) 合成能を有することが証明された。この結果は「II 型 PKS は還元度の低い芳香族化合物のみを生合成する」という従来の定説を覆すものであり、II 型 PKS に関する知見を広げた。そこで、IgaPKS を新規な高還元型 II 型 PKS サブファミリーの代表であると提唱した。第三章の *in silico* 解析の結果を考慮に入れると、KS-CLF、ACP と他の修飾酵素の共進化により、高還元型 II 型 PKS が形成したと考察する。後続の第五章では、IgaPKS の構造解析等を通じて、高還元型 II 型 PKS が有するユニークな触媒メカニズムの解明を目指し、研究を進める。

Iga11-Iga12、Iga13 と Iga16 が触媒する縮合、還元、脱水の反応サイクルは反復型 I 型 PKS¹⁰¹ や I 型、II 型 FAS の反応サイクルと類似している。I 型 PKS / FAS システムにおいて、複数の触媒ドメインがポリペプチド鎖上に繋がっており、それらが高次構造を形成する。ポリケタイド中間体はおそらくこれらメガシンターゼが形成する疎水性チャンバーに格納される (Figure 1-3 と Figure 1-8 参照)¹⁰²。それに対して、IgaPKS システムでは、伸長中のポリケタイド中間体は独立したタンパク質として存在する複数の触媒ドメインに効率良く運搬されなければいけない。その過程において、Iga10 は重要な役割を担うと考えられる。典型的 II 型 PKS / FAS の ACP^{103,104} と同様に、Iga10 は不安定なポリケタイド中間体を自身の疎水性チャンバーに収納し、保護すると考えられる。また、反応サイクルにおいて一つの反応がスキップされることや重複して行われることはない。そのため、ポリケタイド中間体-Iga10 と各触媒ドメイン間において、厳密な認識機構があり、ポリケタイド中間体-Iga10 の“行方”が制御されていると考えられる。この制御に Iga10 と触媒ドメイン間のタンパク質間相互作用が関与している可能性が高い。第六章では IgaPKS 間の相互作用に着目し、研究を進める。

4.4. 実験項

4.4.1. 菌株と培地

• *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 野生株のゲノム DNA を遺伝子クローニングのテンプレートとして用いた。*E. coli* JM109 を遺伝子操作に用い、*E. coli* BL21(DE3)をタンパク質の発現に用いた。

• Difco™ Luria Broth 培地 (LB 培地) を大腸菌の培養に用いた。

• TB 培地: Bacto™ tryptone (1.2%)、Bacto™ yeast extract (2.4%)、glycerol (0.8%)、K₂HPO₄ (0.94%)、KH₂PO₄ (0.22%) を脱イオン水に溶かし、pH を 7.2 に調整した後、オートクレーブ滅菌した。TB 培地を組換えタンパク質調製時の大腸菌の培養に用いた。

4.4.2. PKS 組換え酵素の大腸菌発現用ベクターの構築

Iga11 (KS)、Iga12 (CLF) をコードする遺伝子 *iga11*、*iga12* がオペロンを形成している。プライマー49 と 50 を用い、*iga11*、*iga12* 遺伝子を JE08 株のゲノム DNA から PCR により増幅した。得られた DNA 断片を pColdI の NdeI、XhoI サイトに導入し、pColdI-*iga11/iga12*-P を構築した。次に、プライマー51 と 52 を用いて、inverse PCR により *iga11* の終止コドンと *iga12* の開始コドンの間に strep-tag をコードする配列を導入し、pColdI-*iga11/iga12* を構築した。

pColdI-*iga11/iga12* を鋳型とし、プライマー53 と 57 を用いて pColdI ベクターが有するコールドショックプロモーター領域を増幅した。また、プライマー65-68 を用いて pColdI-*iga11/iga12* のバックボーンと *iga11* 領域をそれぞれ増幅した。得られた 3 つの DNA 断片を In-Fusion により繋ぎ、*iga11* 配列の上流に 8 つの His コドン融合させ、*iga12* 配列の上流に新たなコールドショックプロモーターと His6-tag を導入した pColdI-*iga11/iga12*-2pro を構築した。

pColdI-*iga11/iga12*-2pro をテンプレートに用い、PCR により pColdI-*iga11* (C170A)/*iga12*-2pro の構築を行った。プライマー58 と 59 を用い、*iga11* の Cys170 をコードするコドンを Ala のコドンに置換し、site directed mutagenesis を行った。

また、プライマー60 と 61 を用い、Iga10 (ACP) をコードする *iga10* 遺伝子を PCR により E08 株のゲノム DNA から増幅し、pColdI の NdeI、XhoI サイトに導入し、pColdI-*iga10* を構築した。

JE08 株のゲノム DNA を鋳型とし、Iga13 (KR)、Iga16 (DH)、をコードする *iga13*、*iga16* 遺伝子をそれぞれ PCR により増幅した。用いたプライマーを Table 4-4 にまとめた。Iga13 遺伝子を pET16b の NdeI、BamHI サイトに導入し、pET16b-*iga13* を構築した。Iga16 の遺伝子を pET16b の NdeI、XhoI サイトに導入し、pET16b-*iga16* を構築した。

プライマー66 と 67 を用い、*S. coelicolor* A3(2) のゲノム DNA を鋳型として、*S. coelicolor* MAT⁵ (SCO2387) 遺伝子をPCRにより増幅した。増幅したDNA断片をpET26bのNdeI、XhoIサイトに導入することで、pET26b-MATを構築した。

pCDF-Sfpベクターは当研究室の淡川博士が構築したものを用いた (淡川孝義、2008、博士論文)。

Table 4-4. 第四章で用いたプライマー。In-Fusionに用いた相同配列を下線、導入した制限酵素サイトを二重の下線で示した。Strep-tagをコードする配列を波線で示した。

No	Primer	Sequence (5'-3')	Purpose
49	KSCLF F	<u>AACATATG</u> TCCACCGCAACCGCACG	cloning of Iga11 and Iga12
50	KSCLF R	A <u>ACTCGAG</u> TTCATCGCTGCTCCCCGA	cloning of Iga11 and Iga12
51	Strep F	TCACTCCCCGTACGTGCCGAGTATCAGGA	introducing Strep-tag to Iga12
52	strep R	CGGCACGTACGGGGAGTGATGA <u>AATGGCTAGCTGG</u> <u>AGCCACCCGCAGTTCGAAAAAGTGACGACCATGA</u> GCAC	introducing Strep-tag to Iga12
53	2pro 1F	<u>GGAGTGATGACCGATTAATCATAAAATATGA</u>	construction of pColdI-iga11/iga12-2pro
54	2pro 1R	<u>GCTCATGGTCGTCACATGCCTACCTTCGATA</u>	construction of pColdI-iga11/iga12-2pro
55	2pro 2F	<u>GGCATGTGACGACCATGAGC</u>	construction of pColdI-iga11/iga12-2pro
56	2pro 2R	<u>GATGATGATGCACITTTGTGATTCATGGTGT</u>	construction of pColdI-iga11/iga12-2pro
57	2pro 3F	<u>CAAAGTGCATCATCATCATCATCATCATAT</u>	construction of pColdI-iga11/iga12-2pro
58	C170A F	ACCGTCACCACGGCCGCGGGCCGGCAACTAC	mutagenesis
59	C170A R	GGCCGTGGTGACGGTGG	mutagenesis
60	ACP F	<u>AACATATG</u> ACCACGGTCGCGCCCGAG	cloning of Iga10
61	ACP R	A <u>ACTCGAG</u> TACCAACCGGCGCCGCGG	cloning of Iga10
62	KR R	A <u>AGGATCC</u> TCAGAAGGTGCCGCCCGCGT	cloning of Iga13
63	KR F	<u>AACATATG</u> ATCGCGCTGGTCAGCGG	cloning of Iga13
64	DH F	<u>AACATATG</u> AGATCTTTTCGCCAACCT	cloning of Iga16
65	DH R	A <u>ACTCGAG</u> CTACCCGCCCGCGGTTGCGG	cloning of Iga16
66	ScMAT F	<u>AGAAGGAGATATACATATGGT</u> IGCTCGTACTCGTCG	cloning of MAT
67	ScMAT R	<u>TGGTGGTGGTGGTGC</u> T <u>CGAG</u> GGCCTGGGTGTGCTC	cloning of MAT

4.4.3. 組換えタンパク質の取得

4.4.3.1. Iga11-Iga12 複合体の取得

Iga11 と Iga12 を共発現することによりそれらの複合体を調製した。pColdI-Iga11/Iga12 を *E. coli* BL21 (DE3) へ形質転換し、LB 培地に植菌し、37°Cで終夜培養した。得られた前培養液を TB 培地に 0.1 %植菌し、本培養を行った。37°Cで OD₆₀₀ が 0.6-0.8 になるまで培養した後、培養液を 4°Cに冷却した。その後、0.05 mM の IPTG を添加し、16°Cで 24 時間培養した。菌体を遠心集菌し、脱イオン水で洗浄した後、1 g/10 mL (湿菌体量) の菌体密度になるよう lysis buffer A (20 mM Tris-HCl [pH 8.0]、200 mM NaCl、10% glycerol) に懸濁した。リゾチームと DNase I を適量加え、氷上で 30 分静置した後、超音波破碎を行った。遠心分離から得た上清を 0.45 µm フィルターで濾過し、可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を His60 Ni²⁺ Superflo 野生型^M Resin (Clonotech, Shiga, Japan) と 4°C で 1 h インキュベートし、混合物をオープンカラムにロードし、50 mL の lysis buffer A でレジンを洗浄した。その後異なる濃度 (25, 100, 250, 500 mM) の imidazole を含む lysis buffer A でタンパク質の溶出を行った。Iga11-Iga12 を含むフラクションを集め、mass cutoff が 30 K の Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore, Billerica, America) により脱塩、濃縮を行い、さらに Strep-Tactin® Super flow resin (IBA) による精製を行い、同様に脱塩と濃縮を行った。最終的に lysis buffer A を Iga11-Iga12 の保存 buffer とし、タンパク質を液体窒素で凍結させた後、-80°C で保存した。

pColdI- *iga11/iga12-2pro* ベクターを用いた場合、*E. coli* BL21 (DE3)に導入し、LB 培地を用い、37°Cで終夜前培養を行った。得られた前培養液を TB 培地に 0.5 %植菌し、37°Cで大腸菌の本培養を行った。培養液の OD₆₀₀ が 0.8 に達した時に、培養液を 4°Cに冷却し、組換えタンパク質の発現をコールドショックと 0.5 mM IPTG の添加により誘導した。15°Cでさらに 18 h 培養を行った後、菌体を遠心集菌し、脱イオン水で洗浄した後、lysis buffer C (HEPES [pH 7.6]、250 mM NaCl、20% glycerol、1 mM DTT) に懸濁した。リゾチーム処理と超音波破碎により菌体破碎を行い、得られた可溶性画分を Co²⁺レジジン (TALON® Metal Affinity Resin, Takara Bio USA, Inc, CA, USA) で精製した。Iga11-Iga12 複合体を含む画分を濃縮し、HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 prep grad (pg) (GE Healthcare Life Sciences, Pennsylvania, America) カラムを装着した ÄKTAprime plus chromatography system (GE Healthcare Life Sciences) によるゲルろ過精製を行った。ゲルろ過の移動層には lysis buffer C を用いた。Iga11-Iga12 複合体を含む画分を濃縮し、液体窒素で凍結し、-80°C で保存した。同様な方法により Iga11 (C170A)-Iga12 を発現、精製、保存した。

4.4.3.2. Holo-ACP (Iga10) の取得

大腸菌内で Iga10 を *B. subtilis* 由来の PPTase である Sfp と共発現することにより holo-Iga10 を取得した。pCold-Iga10 と pCDF-Sfp を共に *E. coli* BL21 (DE3) へ形質転換し、LB 培地に植菌し、37°C で終夜培養した。得られた前培養液を TB 培地に 0.1% 植菌し、本培養を行った。37°C で OD₆₀₀ が 0.6-0.8 になるまで培養した後、培養液を 4°C に冷却した。その後、0.1 mM の IPTG を添加し、16°C で 24 時間培養した。4.4.3.1 節「Iga11-Iga12 複製の取得」で述べたように His60 Ni²⁺ Superflo 野生型^M Resin による His-tag 精製を行った。その後、mass cutoff が 3 K の Amicon Ultra centrifugal filter により Iga10 を濃縮し、lysis buffer A を移動相に、HiLoad™ 16/600 Superdex™ 75 prep grad (pg) (GE Healthcare Life Sciences, Pennsylvania, America) カラムを装着した ÄKTAprime システムによるゲルろ過精製を行った。最終的に lysis buffer A を保存 buffer とし、タンパク質を液体窒素で凍結させた後、-80°C で保存した。

4.4.3.3. Iga13、Iga16 の取得

pET16b-Iga13 もしくは pET16b-Iga16 を *E. coli* BL21 (DE3) へ形質転換し、LB 培地に植菌し、37°C で終夜培養した。得られた前培養液を TB 培地に 0.1% 植菌し、本培養を行った。37°C で OD₆₀₀ が 0.6 になるまで培養した後、培養液を 4°C に冷却した。その後、0.05 mM の IPTG を添加し、18°C で 24 時間培養し、タンパク質の発現を行った。4.4.3.1 章と同様に His-tag 精製を行った。10 K の Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore, Billerica, America) により脱塩、濃縮を行い、最終的に lysis buffer A を保存 buffer とし、タンパク質を液体窒素で凍結させた後、-80°C で保存した。

4.4.3.4. MAT の取得

pET26b-MAT を *E. coli* BL21 (DE3) へ形質転換し、LB 培地に植菌し、37°C で終夜培養した。得られた前培養液を TB 培地に 0.1% 植菌し、本培養を行った。37°C で OD₆₀₀ が 0.5 になるまで培養した後、培養液を 4°C に冷却した。その後、0.5 mM の IPTG を添加し、26°C で 16 時間培養した。菌体を遠心集菌し、脱イオン水で洗浄した後、1 g/10 mL (湿菌体量) の濃度で lysis buffer B (50 mM potassium phosphate buffer [pH 7.5]、150 mM NaCl、3 mM 2-mercaptoethanol、10% glycerol) に懸濁した。リゾチームを適量加え、氷上で 30 分静置した後、超音波破碎を行った。遠心分離から得た上清を 0.2 μm フィルターで濾過し、可溶性画分を得た。得られた可溶性画分を Ni-NTA レジンで精製した。4.4.3.1 章と同様に His-tag 精製を行った。10 K の Amicon Ultra centrifugal filter (Millipore)

により脱塩、濃縮を行い、最終的に lysis buffer B を保存 buffer とし、タンパク質を液体窒素で凍結させた後、-80°C で保存した。

4.4.4. Iga10 の LC-MS 解析

Iga10 の分子量を LC-ESIMS で確認した。その際に Protein-R カラム (オクタデシル基, 2.0×150 nm, nacalai Tesque) を装着した Agilent 1100 シリーズ (Agilent) とカップリングした high-capacity trap plus system (Bruker Daltonic, Billerica, Massachusetts) を用いた。タンパク質の溶出には 0.05% trifluoroacetic acid (TFA) を含む 40%-100% acetonitrile 水溶液の linear gradient を用いた。

4.4.5. Iga13 の *in vitro* 解析

5 μ M Iga13、1 mM 3-oxooctanoyl-NAC (**1**)、2 mM NADPH、1 mM DTT、250 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)、10% glycerol を含む 100 μ L の反応液を 30°C で 2 h インキュベートし、EtOAc を用いて生成物を抽出した。有機溶媒をエバポレーターにより除き、得られた固形物を 20 μ L の MeOH に溶解し、LC-ESIMS 解析に供した。その際、COSMOCORE 2.6 C₁₈ カラム (2.1×150 mm, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を装着した Agilent 1100 シリーズ (Agilent) とカップリングした high-capacity trap plus system (Bruker Daltonic, Billerica, Massachusetts) を用いた。0.1% formic acid (FA) を含む 5%-100% acetonitrile 水溶液の linear gradient (30 min) を用いて化合物の溶出を行った。CHIRALCEL OD-3R カラム (2.1×150 mm; DAICEL, Tokyo, Japan) を用いて、生成物水酸基の立体を調べた。その際、0.1% FA を含む 15% acetonitrile を移動相に用いた。同様な方法により、3-oxohexanoyl-NAC (**3**) を基質とした時に Iga13 が触媒する反応を調べた。

速度論解析では、Iga13、化合物 **1**、NADPH、250 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) と 10% glycerol を含む 100 μ L の反応系を用いた。NADPH 濃度と反応初速度の関係性を調べるため、0.9 μ M Iga13、800 μ M の化合物 **1** と異なる濃度の NADPH (1-200 μ M) を用いた。化合物 **1** 濃度と反応初速度の関係性を調べるため、1 μ M Iga13、210 μ M NADPH と異なる濃度の化合物 **1** (10-1000 μ M) を用いた。化合物 **1** を含まない反応液を 30°C で 2 min 程度インキュベートし、その自己分解をモニターした。その後、化合物 **1** の添加により反応を開始した。反応液を 30°C でインキュベートし、340 nm における吸光の減少により NADPH の消費量をモニターした。島津製作所の UV-可視光吸光度計 UV-1860 を用いて測定を行った。基質の減少速度が一定である時間帯のデータポイントを用いて、反応初速度を計算した。速度論パラメーターの算出に Michaelis-Menten の式、

$v = V_{\max}*[S]/(K_m+[S])$ を用い、測定したデータを双曲線にフィッティングした。同様に化合物 **3** 濃度と Iga13 がそれに対する反応初速度の関係性を調べた。

4.4.6. Iga16 の *in vitro* 解析

5 μ M Iga16、1 mM 基質 [3-hydroxyoctanoyl-NAC (**2R** か **2S**) もしくは *trans*-2-octenoyl-NAC (**5**)], 1 mM DTT、250 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) と 10% glycerol を含む反応液を 30°C で 2 h インキュベートした。この時反応は平衡状態に達している。EtOAc により生成物を抽出し、MeOH に溶解し、LC-ESIMS 解析に供した。Iga13 の解析と同様に解析を行ったが、化合物の溶出に 5%-100% 0.1% FA を含む acetonitrile 水溶液の linear gradient を用いた (20 min)。同様な方法により、3-hydroxyhexanoyl-NAC (**4R** か **4S**) もしくは *trans*-2-hexenoyl-NAC (**6**) を基質とした時に Iga13 が触媒する反応を調べた。

異なる濃度の化合物 **5** が示す 263 nm (λ_{\max}) における吸光強度をもとに、化合物 **3** 濃度と A_{263} 間の標準曲線を作成した。測定には、島津製作所の UV-可視光吸光光度計 UV-1860 を用いた。速度論解析では、2.5 μ M Iga16、化合物 **5** (0.01-2 mM)、250 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) と 20% glycerol を含む 100 μ L の反応系を用いた。化合物 **5** をふくまない反応液を 30°C で 2 min 程度インキュベートし、温度が安定した後の化合物 **5** の添加により反応を開始した。263 nm における吸光の減少により化合物 **2R** の生成量をモニターした。基質の減少速度が一定である時間帯のデータポイントを用いて、反応初速度を計算した。速度論パラメーターの算出に Michaelis-Menten の式、 $v = V_{\max}*[S]/(K_m+[S])$ を用い、測定したデータを双曲線にフィッティングした。

4.4.7. Iga10 の自己アシル化

50 μ M Iga10 を 1 mM malonyl-CoA、1 mM DTT、20 mM Tris (pH 8.0)、200 mM NaCl、10% glycerol と混合し、調製した 20 μ L 反応液を 30°C で 6 h インキュベートした。反応液を 3 K の Amicon Ultra centrifugal filter により脱塩し、LC-ESIMS に供した。「4.4.4 Iga10 の LC-MS 解析」で用いた分析法を用いて解析を行った。

4.4.9. Iga11-Iga12 の *in vitro* 解析

100 μ M holo-Iga10、10 μ M Iga11-Iga12、1 mM malonyl-CoA、1 mM hexanoyl-CoA、1 mM DTT、250 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2) と 10% glycerol を含む 100 μ L の反応液を調製した。反応液を 30°C で 6 h 反応させた後、終濃度 350 mM の KOH を系に加

え、60°C で 30 min 加水分解を行い、伸長したポリケタイド鎖を ACP から解離させた。その後、反応液を室温に戻し、HCl の添加により反応液を酸性に調節した後、EtOAc により抽出を行った。抽出物を 20 μ L の MeOH に溶解し、LC-ESIMS に供した。分析法は 4.4.5 節「Iga13 の *in vitro* 解析」時と同様である。

3-oxooctanoyl-Iga10 の検出は以下の方法で行った。100 μ L の反応液を 10 K の Amicon Ultra centrifugal filter により脱塩し、得られた水溶液を等量の 0.1% TFA を含む MeOH と混合した。遠心により不溶物を除去し、上清を LC-ESIMS 解析に供した。4.4.4 節「Iga10 の LC-MS 解析」と同様の分析法を用いて解析を行った。

4.4.10. IgaPKS を用いた polyene 合成

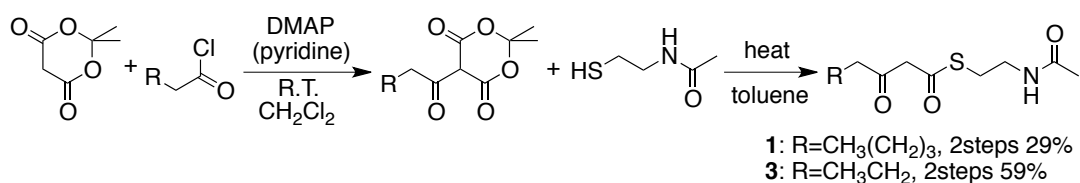
200 μ M holo-Iga10、10 μ M Iga11-Iga12、5 μ M Iga13、5 μ M Iga16、1 mM malonyl-CoA、1 mM hexanoyl-CoA、1 mM DTT、2 mM NADPH、250 mM potassium phosphate buffer (pH 7.2)、10% glycerol を含む 200 μ L の反応液を 30°C で 6 h インキュベートした。その後 200 μ L の氷冷した 20% TCA を反応系に加え、4°C で 30 min 10,000 g で遠心することにより、タンパク質を沈殿させた。沈殿したタンパク質を 200 μ L の 350 mM の KOH で再溶解した。60°C で 30 min 処理し、伸長したポリケタイド鎖を ACP から解離させた。その後、反応液を室温に戻し、6 N HCl を 20 μ L 添加しすることにより溶液を酸性にし、等量 (220 μ L) の EtOAc により化合物の抽出を 2 回行った。得られた抽出物をまとめて濃縮し、20 μ L の MeOH に再溶解して、全量 LC-ESIMS 解析に供した。分析法は 4.4.5 節とほぼ同様だが、化合物の溶出に 0.1% FA を含む 20%-100% の acetonitrile 水溶液 linear gradient (40 min) を用いた。同様に、Iga11 (C170A)-Iga11 を Iga11-Iga12 の代わりに用いて、*in vitro* 反応と LC-MS 解析を行った。

また、hexanoyl-CoA の代わりに異なる鎖長の acyl-CoA (C2-C12) をスターター基質に用いて、同様の反応系により IgaPKS による polyene 合成の *in vitro* 再構築を行った。その際、COSMOCORE 2.6 C18 カラム (2.1 \times 150 mm, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を装着した LC-2040C 3D Plus (SIMAZU, Kyoto, Japan) と DUIS-8030 SET (SIMAZU) がカップリングした機械を用いた。0.1% formic acid (FA) を含む 35%-100% acetonitrile 水溶液の linear gradient (9 min) を用いて化合物の溶出を行った。また、微生物潜在酵素寄付講座にある Agilent technologies の iFunnel Q-TOF LC/MS を用いた反応産物の分析も行った。

4.4.11. 有機合成

NAC エステル^{84,105,106} と不飽和脂肪酸¹⁰⁷ を既存の方法で有機合成した。MS と NMR 解析により合成品の構造を確認した。NMR 解析では JNM-A500 または JNM-A600 NMR system (JEOL, Tokyo, Japan) を用いた。

3-oxooctanoyl-NAC (1) と 3-oxohexanoyl-NAC (3) の合成 (Scheme 4-1)



Scheme 4-1. 3-oxooctanoyl-NAC (1) と 3-oxohexanoyl-NAC (3) の合成。

(1) 3-oxooctanoyl-NAC (1) の合成: Meldrum's acid (20 mM, 1 eq.) と DMAP (2 eq.) を窒素環境下で超脱水 CH₂Cl₂ (10 mL) に溶解し、室温で 10 min 攪拌した。その後、反応液を 0°C に冷却し、攪拌しながら hexanoyl chloride (1 eq.) を滴下した。反応液を室温に戻し、さらに一晩攪拌した。1 M HCl を用いて反応をクエンチし、CH₂Cl₂ により化合物を抽出し、有機層をさらに飽和食塩水で洗浄した。無水 Na₂SO₄ 処理により水を除去し、ろ過で不溶物を除去した後に有機溶媒をロータリーエバポレーターで除去した。得られた黄色オイルを直接次の反応に供した。この合成中間体 (20 mM) と *N*-acetylcysteamine (NACSH, 1 eq.) を toluene (10 mL) に溶解し、100°C で一晩リフラックスした。その後反応液を室温に戻し、有機溶媒をロータリーエバポレーターにより除去し、HPLC (SHIMADZU, kyoto, Japan) を用いて化合物を精製した。COSMOSIL C18-AR-II カラム (10 × 250 mm, Nacalai Tesque) を用い、0.1% FA を含む 40%-90% acetonitrile 水溶液のグラジエントより化合物 1 を溶出した。(29% yield, 75:25 keto:enol)

3-Oxooctanoyl-NAC (1). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 5.85 (br, 0.1H), 3.66 (s, 1.4H), 3.44 (m, 2H), 3.06 (m, 2H), 2.49 (t, 1.5H, *J* = 7.2 Hz), 2.14 (t, 0.4H, *J* = 7.1 Hz), 1.94 (s, 3H), 1.52 (m, 2H), 1.28 (m, 4H), 0.86 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz). Low resolution MS (LRMS) (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₂H₂₂NO₃S 260, found 260.

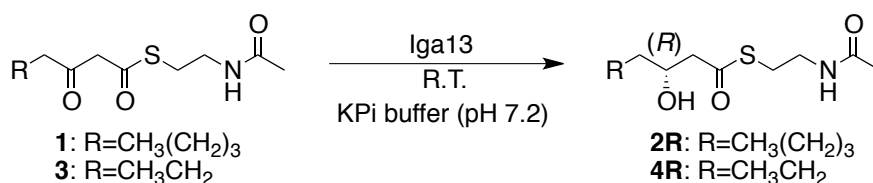
(2) 3-oxohexanoyl-NAC (3) の合成: Meldrum's acid (200 mM, 1 eq.) と DMAP (2 eq.) を窒素環境下で超脱水 CH₂Cl₂ (10 mL) に溶解し、さらに pyridine (X mM, 2 eq.) を反応液に加え、室温で 10 min 攪拌した。その後、反応液を 0°C に冷却し、butyryl chloride (1 eq.)

を滴下した。反応液を室温に戻し、一晚攪拌した。1 M HCl を用いて反応をクエンチし、CH₂Cl₂ により化合物を抽出し、有機層をさらに飽和食塩水で洗浄した。無水 Na₂SO₄ 処理により水を除去し、ろ過で不溶物を除去した後有機溶媒をロータリーエバポレーターで除いた。得られたオレンジ色オイルを直接次の反応に供した。この合成中間体 (200 mM) と *N*-acetylcysteamine (NACSH, 1.1 eq.) を toluene (10 mL) に溶解し、80°C で 12 h リフラックスした。その後反応液を室温に戻し、有機溶媒をロータリーエバポレーターにより除去し、HPLC (SHIMADZU) を用いて化合物を精製した。COSMOSIL C18-AR-II カラム (10 × 250 mm) を用い、0.1% FA を含む acetonitrile 水溶液のグラジエント (10% - 60%) で化合物 **3** を溶出した (59% yield, 85:15 keto:enol)。

3-Oxoheptanoyl-NAC (**3**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 5.86 (br, 0.6H), 3.67 (s, 1.7H), 3.44 (m, 2H), 3.07 (m, 2H), 2.49 (t, *J* = 7.2 Hz, 1.7H), 2.13 (t, 0.3H, *J* = 7.3 Hz), 1.95 (s, 3H), 1.60 (m, 2H), 0.93 (m, 3H); Low resolution (LR) MS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₀H₁₈NO₃S 232, found 232.

(3*R*)-hydroxyoctanoyl-NAC (**2R**) と (3*R*)-hydroxyhexanoyl-NAC (**4R**) の合成

(Scheme 4-2)



Scheme 4-2. 酵素を用いた (3*R*)-hydroxyoctanoyl-NAC (**2R**) と (3*R*)-hydroxyhexanoyl-NAC (**4R**) の合成。

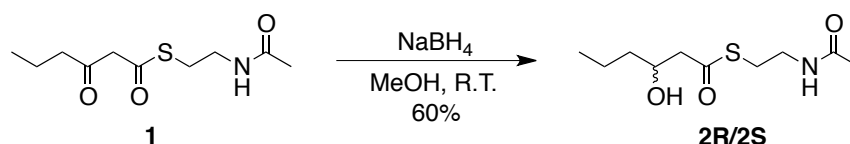
化合物 **1** (1 mM) を 1% DMSO を含む 250 mM phosphate buffer (pH 7.2, 50 mL) に溶解した。NADPH (終濃度 1 mM) と Iga13 (終濃度 5 μM) を添加し、反応液を室温で 16 h 攪拌した。EtOAc との液液分配により化合物を抽出し、有機層を無水 Na₂SO₄ で脱水した。ろ過により不溶物を除去した後、溶媒をロータリーエバポレーターで除いた。HPLC (SHIMADZU) を用いて化合物を精製した。COSMOSIL C18-AR-II カラム (10 × 250 mm) を用い、0.1% FA を含む 10%-50% acetonitrile 水溶液のグラジエントで化合物 **2R** を溶出した (approximately 60% yield)。

(3*R*)-Hydroxyoctanoyl-NAC (**2R**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 4.04 (m, 1H), 3.45 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.62-2.75 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.27-1.45 (m, 8H), 0.87 (t, 3H, *J* = 6.5 Hz). LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₂H₂₄NO₃S 262, found 262. α₅₈₉²³ = -14.62 ± 1.32 (c = 0.20, CHCl₃).

同様に化合物 **3** を基質に用い、化合物 **4R** を酵素反応により調製した。

3-Hydroxyhexanoyl-NAC (**4R**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 4.06 (m, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.03 (m, 2H), 2.71 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.30-1.55 (m, 4H), 0.93 (m, 3H); LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₀H₂₀NO₃S 234, found 234. α₅₈₉¹⁷ = -22.82 ± 0.51 (c = 0.21, CHCl₃).

(±)-3-hydroxyoctanoyl-NAC (**2R**, **2S**) の合成 (Scheme 4-3)

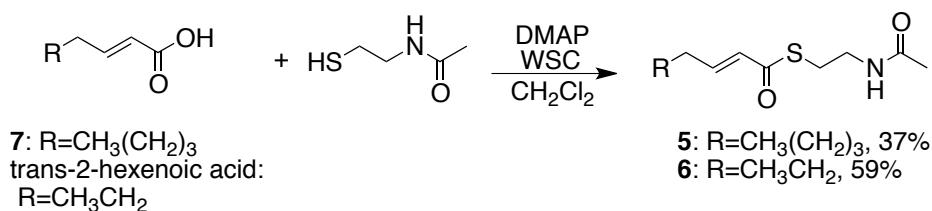


Scheme 4-3. (±)-3-hydroxyoctanoyl-NAC (**2R**, **2S**) の合成。

化合物 **1** (0.5 mM, 1 eq.) を methanol (50 mL) に溶解し、NaBH₄ (2 eq.) を添加した。反応液を室温で 16 h 攪拌した。反応を 50 mL 1 M HCl の添加によりクエンチし、化合物を EtOAc で抽出した。溶媒をロータリーエバポレーターで除いた後、HPLC (SHIMADZU) を用いて精製を行った。COSMOSIL C18-AR-II カラム (10 × 250 mm) を用い、0.1% FA を含む 10%–50% acetonitrile 水溶液のグラジエントで化合物 **2R** と **2S** を溶出した (60% yield)。化合物 **2S** をさらに CHIRALCEL OD-3R キラルカラム (2.1 × 150 mm; DAICEL, Tokyo, Japan) により分離した。移動相に 0.1% FA を含む 20% acetonitrile 水溶液を用い、アイソクラティック溶出した。

(±)-3-Hydroxyoctanoyl-NAC (**2R** and **2S**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 4.04 (m, 1H), 3.44 (m, 2H), 3.02 (m, 2H), 2.59-2.76 (m, 2H), 1.95 (s, 3H), 1.27-1.52 (m, 8H), 0.87 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz). LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₂H₂₄NO₃S 262, found 262.

trans-2-octenoyl-NAC (**5**) と *trans*-2-hexenoyl-NAC (**6**) の合成 (Scheme 4-4)

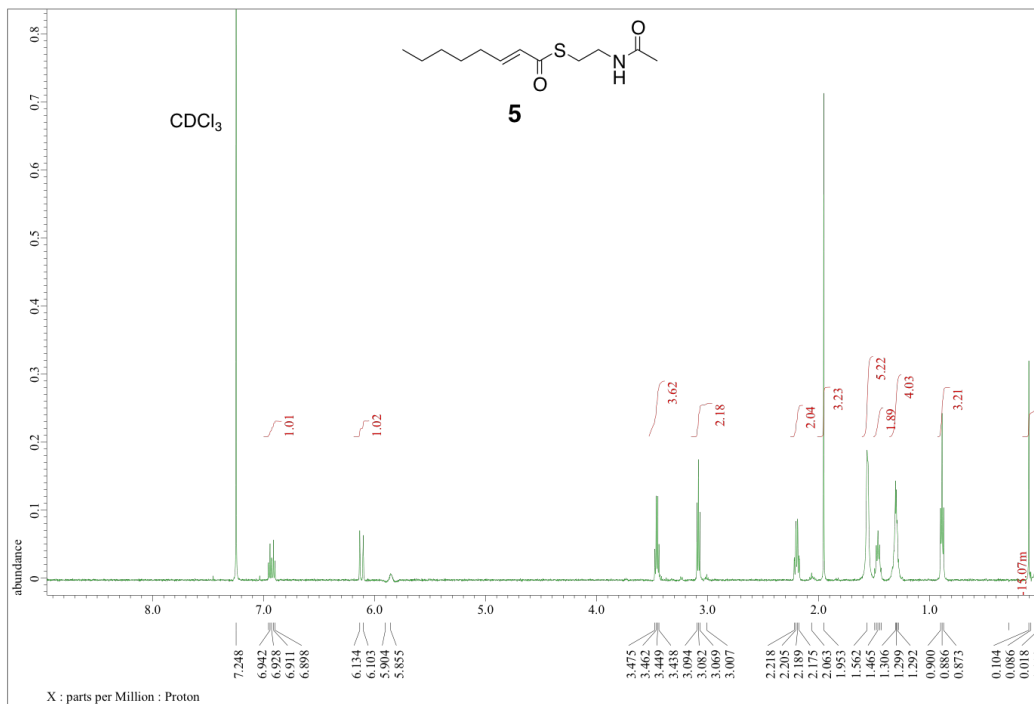


Scheme 4-4. *trans*-2-octenoyl-NAC (**5**) と *trans*-2-hexenoyl-NAC (**6**) の合成。

trans-2-Octenoic acid (**7**, 10 mM, 1 eq.) を DMAP (0.25 eq.)、WSC (2 eq.) と共に窒素環境下で超脱水 CH₂Cl₂ (10 mL) に溶解し、0°C に冷却して 20 min 攪拌した。そこに NACSH (1.2 eq.) を添加した。反応液を室温に戻し、一晩反応させた。水の添加により反応をクエンチし、有機層を飽和食塩水で洗浄した後、無水 Na₂SO₄ で有機層を脱水させた。ろ過により不溶物を除去した後、溶媒をロータリーエバポレーターで除いた。HPLC を用いて化合物を精製した。COSMOSIL C18-AR-II カラム (10 × 250 mm) を用い、0.1% FA を含む 50%-100% acetonitrile 水溶液のグラジエントより化合物 **5** を溶出した (37% yield)。

trans-2-Octenoyl-NAC (**5**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 6.92 (m, 1H), 6.10 (d, 1H, *J* = 15.5 Hz), 3.45 (m, 2H), 3.09 (m, 2H), 2.19 (dd, 2H, *J* = 6.5, 15.5 Hz), 1.96 (t, 3H), 1.44 (m, 2H), 1.30 (m, 4H), 0.89 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz). LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₂H₂₂NO₂S 244, found 244.

A. Chemical synthesis



B. Enzymatic synthesis

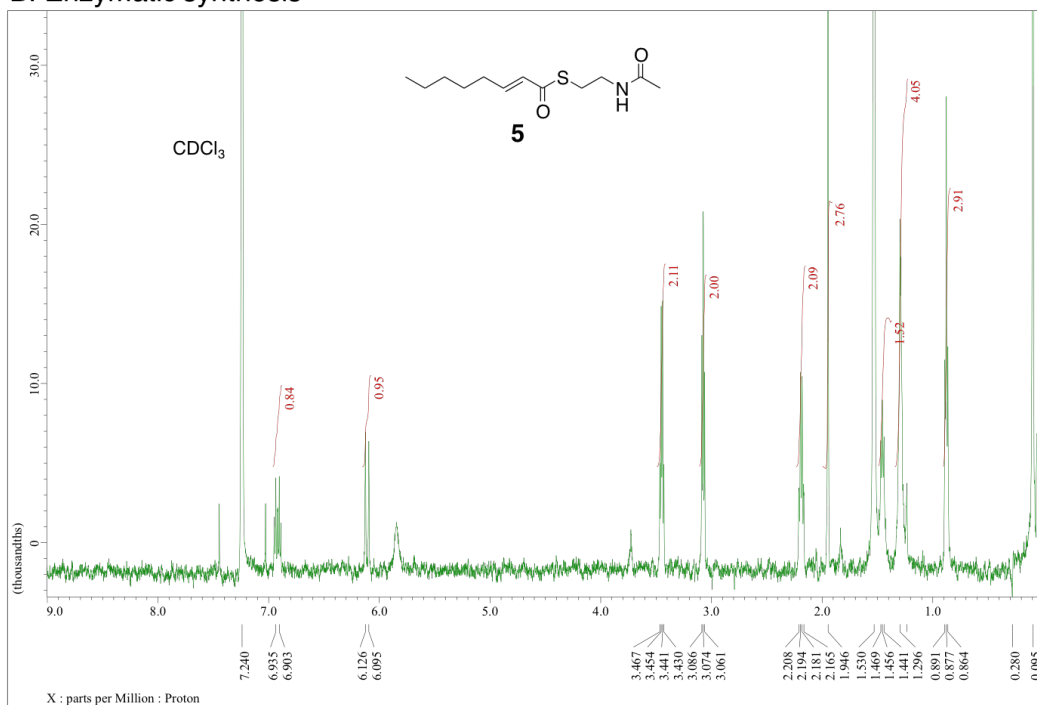
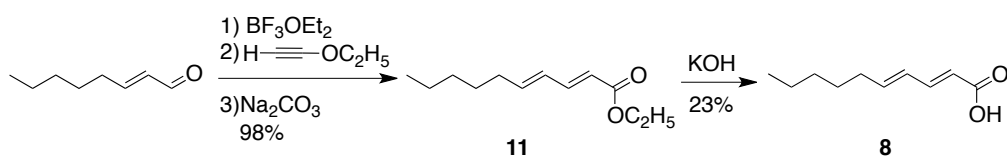


Figure 4-S1. 有機合成 (A)、もしくは Iga16 が触媒する酵素反応 (B) により生じた *trans*-2-octenyl-NAC (**5**) の ¹H NMR。CDCl₃ を溶媒とし、JNM-A500 NMR system で測定を行った。

同様な方法により *trans*-2-hexenoic acid を基質に *trans*-2-hexenoyl-NAC (**6**) を合成した (59% yield)。

trans-2-Hexenoyl-NAC (**6**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 6.90 (m, 1H), 6.10 (d, 1H, *J* = 15.5), 3.43 (dd, 2H, *J* = 6.5, 13 Hz), 3.06 (t, 2H, *J* = 6.5 Hz), 2.17 (dd, 2H, *J* = 6.5, 15.5 Hz), 1.93 (s, 3H), 1.48 (m, 2H), 0.92 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz); LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₀H₁₈NO₂S 216, found 216.

(2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienoic acid (**8**) の合成 (Scheme 4-5)



Scheme 4-5. (2*E*,4*E*)-Deca-2,4-dienoic acid (**8**) の合成。

(1) (2*E*,4*E*)-ethyl deca-2,4-dienoate (**11**) の合成。(E)-Oct-2-enal (1 mmol, 1 eq.) を窒素環境下で diethyl ether (20 mL) に溶かし、溶液を -30°C に冷却した。攪拌しながら、-30°C に冷却した boron trifluoride diethyl etherate の ether 溶液 (1.5 eq., 10 mL) を添加した。得られた反応液を -30°C でさらに 30 min 攪拌した。続いて反応液に -30°C に冷却した ethoxyacetylene (40% solution in hexane, 1.5 eq., 10 mL) をゆっくり滴下し、-30°C で 1.5 h 攪拌した。飽和炭酸ナトリウムの添加により反応をクエンチし、CHCl₃ で化合物を抽出した。Na₂SO₄ を用いて有機層を脱水させ、ろ過により不溶物を除去した後、溶媒をロータリーエバポレーターで除いた。得られた化合物 **11** (98% yield) を直接次の合成反応に用いた。

(2*E*,4*E*)-Ethyl deca-2,4-dienoate (**11**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.14 (dd, 1H, *J* = 9.0, 15.0 Hz), 6.02 (dd, 1H, *J* = 9.5, 15.0 Hz), 5.67 (d, 1H, *J* = 15.0 Hz), 4.07 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz), 2.04 (m, 2H), 1.29 (m, 2H), 1.10-1.25 (m, 9H), 0.77 (t, 3H, *J* = 6.5 Hz). LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₂H₂₁O₂ 197, found 197.

(2) (2*E*,4*E*)-deca-2,4-dienoic acid (**8**) の合成。化合物 **11** (30 mg) を acetone (5 mL) に溶解した。得られた溶液に KOH 溶液 (350 mM, 2 mL) を加え、反応液を室温で 2 h 攪拌した。その後、酸性 EtOAc を用いて化合物を抽出し、有機溶媒をロータリーエバポレーターで除いた。SI カラム (Purif-Pack SI, SIZE15, Shoko Scientific, Yokohama, Japan) を

装着した MPLC システムを用いて精製を行った。化合物の溶出に 0%-100% の EtOAc (in hexane) を用いた (23% yield)。

(2*E*,4*E*)-Deca-2,4-dienoic acid (**8**). ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.32 (m, 1H), 6.17 (m, 2H), 5.77 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz), 2.15 (m, 1H), 1.41 (m, 2H), 1.29 (m, 4H), 0.87 (t, 3H, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 172.1, 146.3, 128.2, 33.0, 31.4, 28.3, 22.5, 14.0. HRMS (Q-TOF) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_2$ 169.1228, found 169.1220.

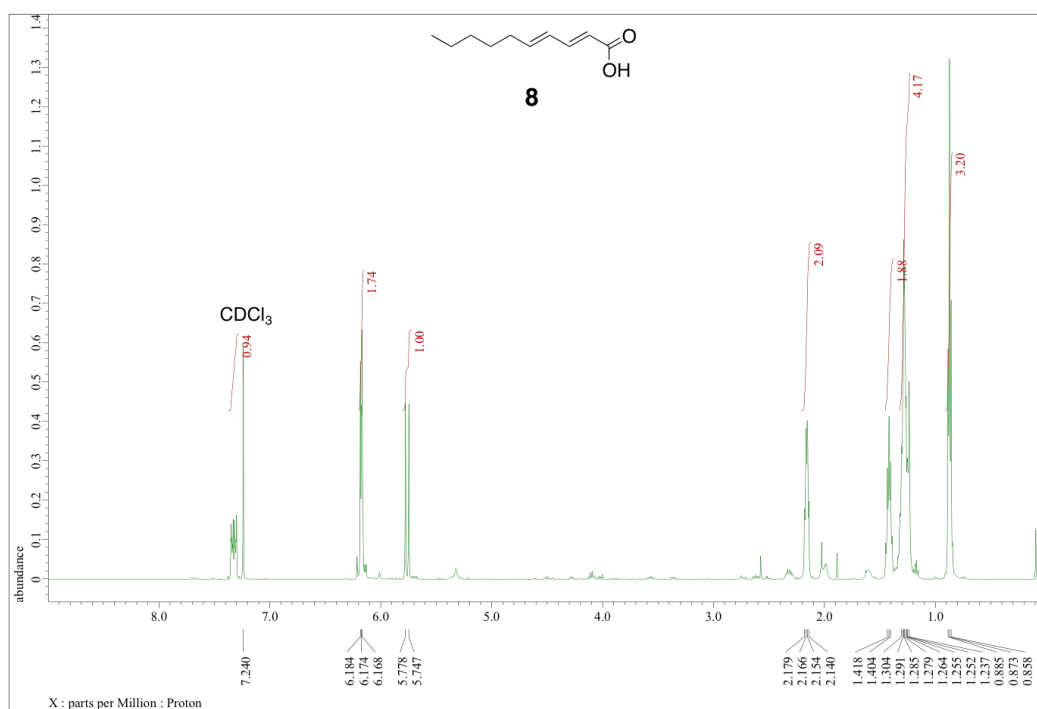


Figure 4-S2. (2*E*,4*E*)-Deca-2,4-dienoic acid (**8**) の ^1H NMR。 CDCl_3 を溶媒とし、JNM-A500 NMR system で測定を行った。

(2*E*,4*E*,6*E*)-dodeca-2,4,6-trienoic acid (**9**) の合成

化合物 **8** の合成法を用いて化合物 **9** を合成した。(2*E*,4*E*)-Deca-2,4-dienal を基質に、化合物 **10** のエチルエステルである (2*E*,4*E*,6*E*)-ethyl dodeca-2,4,6-trienoate (**12**) を合成し、それを加水分解することにより化合物 **9** を得た (2 steps, 43% yield)。

(2*E*,4*E*,6*E*)-Ethyl dodeca-2,4,6-trienoate (**12**). ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.17 (dd, 1H, $J = 11.5, 15.5$ Hz), 6.40 (dd, 1H, $J = 10.5, 15.0$ Hz), 6.11 (dd, 1H, $J = 11.5, 14.5$ Hz), 6.01 (dd, 1H, $J = 10.5, 15$ Hz), 5.83 (m, 1H), 5.72 (d, 1H, $J = 15.5$ Hz), 4.08 (q, 2H, $J = 7.5$ Hz), 2.02 (q, 2H, $J = 7.0$ Hz), 1.37 (m, 2H), 1.19-1.35 (m, 9H), 0.77 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz). LRMS (ESI) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{O}_2$ 223, found 223.

(2*E*,4*E*,6*E*)-Dodeca-2,4,6-trienoic acid (**9**). ^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ 7.36 (dd, 1H, $J = 11.5, 15.5$ Hz), 6.53 (dd, 1H, $J = 11.0, 15.0$ Hz), 6.22 (dd, 1H, $J = 11.5, 14.5$ Hz), 6.13 (dd, 1H, $J = 11.0, 15.0$ Hz), 5.96 (m, 1H), 5.81 (d, 1H, $J = 15.0$ Hz), 2.14 (m, 2H), 1.39 (m, 2H), 1.14-1.38 (m, 4H), 0.87 (t, 3H, $J = 6.5$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 171.9, 147.4, 142.6, 141.2, 129.8, 127.5, 118.8, 33.1, 31.5, 28.7, 22.6, 14.0. HRMS (Q-TOF) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_2$ 195.1385, found 195.1379.

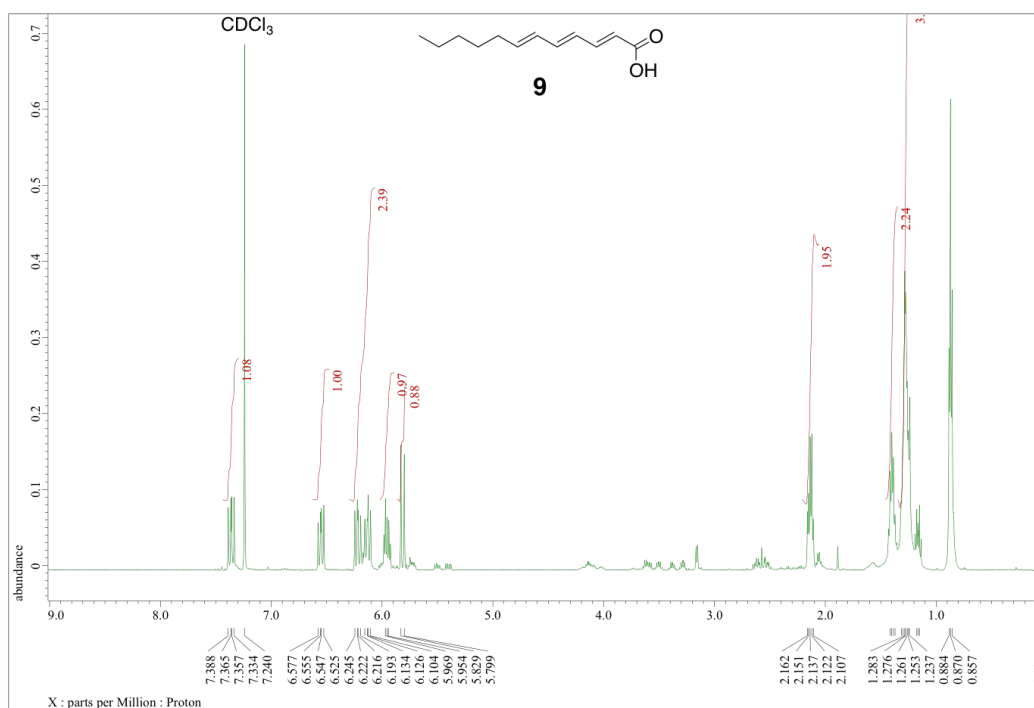
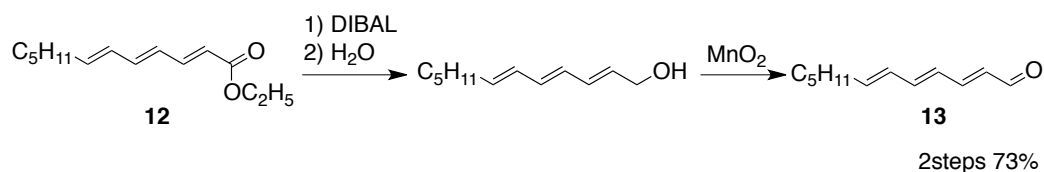


Figure 4-S3. (2*E*,4*E*,6*E*)-Dodeca-2,4,6-trienoic acid (**9**) の ^1H NMR。 CDCl_3 を溶媒とし、JNM-A500 NMR system で測定を行った。

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-tetradeca-2,4,6,8-tetraenoic acid (**10**) の合成

化合物 **8** の合成法を用いて化合物 **10** を合成した。(2*E*,4*E*,6*E*)-Dodeca-2,4,6-trienal (**13**) を基質に、化合物 **10** のエチルエステルである (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-ethyl tetradeca-2,4,6,8-tetraenoate を合成し、それを加水分解することにより化合物 **10** を得た。化合物 **10** の合成に必要なアルデヒド **13** は市販されていないため、それをまず有機合成した (Scheme 4-6)。



Scheme 4-6. (2*E*,4*E*,6*E*)-dodeca-2,4,6-trienal (**13**) の合成。

(1) (2*E*,4*E*,6*E*)-dodeca-2,4,6-trienal (**13**). 化合物 **9** を合成する際の間体に当たる化合物 **12** (0.6 mmol, 1 eq.) を窒素環境下で 20 mL の CH₂Cl₂ に溶解し、溶液を -78°C に冷却した。そこに DIBAL (1 M in toluene, 2 eq.) をゆっくり滴下し、反応液を -78°C でさらに 2.5 h 攪拌した。反応液を室温に戻し、5 mL 水の添加により反応をクエンチさせ、CHCl₃ を用いて化合物を抽出した。無水 Na₂SO₄ を用いて有機層を脱水させ、ろ過により不溶物を除去した後、溶媒をロータリーエバポレーターで除いた。得られた化合物を CH₂Cl₂ (20 mL) に溶解し、MnO₂ (0.6 g) を添加した。得られた反応液を室温で 3 日攪拌した。その後、セライトろ過により固形物を除去し、ロータリーエバポレーターを用いて溶媒を除いた。得られ物質を SI カラムを装着した MPLC システムに供し、精製を行った。化合物の溶出に 0% - 40% の EtOAc (in hexane) を用いた (2 steps, 73% yield)。

(2*E*,4*E*,6*E*)-Dodeca-2,4,6-trienal (**13**). ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 9.51 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.08 (dd, 1H, *J* = 11.5, 15.5 Hz), 6.61 (dd, 1H, *J* = 10.5, 14.5 Hz), 6.30 (dd, 1H, *J* = 11.5, 15.0 Hz), 6.06-6.17 (m, 2H), 6.01 (m, 1H), 2.13 (q, 2H, *J* = 7 Hz), 1.22-1.50 (m, 6H), 0.86 (t, 3H, *J* = 6.5 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 173.6, 152.5, 143.3, 142.7, 130.5, 129.7, 127.7, 33.0, 31.3, 29.6, 28.5, 28.2, 22.4, 13.9. LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₂H₁₉O 179, found 179.

(2) (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-tetradeca-2,4,6,8-tetraenoic acid (**10**) の合成。化合物 **8** の合成と同様の方法を用い、化合物 **13** を基質に化合物 **10** を合成した (2 steps, approximately 10% yield)。

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-Ethyl tetradeca-2,4,6,8-tetraenoate. ¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz): δ 7.31 (m, 1H), 6.52-6.67 (m, 2H), 6.26-6.38 (m, 2H), 6.09-6.22 (m, 2H), 5.90 (m, 1H), 5.82 (m, 1H), 4.20 (q, 2H, *J* = 7.5 Hz), 2.14 (m, 2H), 1.18-1.50 (m, 6H), 0.90 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz); ¹³C NMR (CDCl₃, 125 MHz): δ 167.2, 144.6, 138.8, 137.6, 130.2, 129.5, 129.0, 128.3, 120.0, 60.2, 33.0, 31.4, 28.8, 22.5, 14.4, 14.0. LRMS (ESI) *m/z* [M + H]⁺ calcd. for C₁₆H₂₅O₂ 249, found 249.

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-Tetradeca-2,4,6,8-tetraenoic acid (**10**). ¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz): δ 7.37 (dd, 1H, *J* = 11.4, 15.0 Hz), 6.61 (dd, 1H, *J* = 10.2, 14.4 Hz), 6.40 (dd, 1H, *J* = 10.8, 15.0 Hz),

6.30 (dd, 1H, $J = 10.8, 14.4$ Hz), 6.20 (dd, 1H, $J = 11.4, 15.0$ Hz), 6.12 (dd, 1H, $J = 10.8, 15.6$ Hz), 5.87 (m, 1H), 5.84 (d, 1H, $J = 15.6$ Hz), 2.11 (m, 2H), 1.19-1.36 (m, 6H), 0.88 (t, 3H, $J = 8.4$ Hz); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz): δ 171.0, 147.2, 142.1, 139.8, 138.3, 130.5, 129.5, 128.8, 34.5, 32.1, 29.5, 24.2, 14.4. HRMS (Q-TOF) m/z $[\text{M} + \text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{O}_2$ 221.1541, found 221.1536.

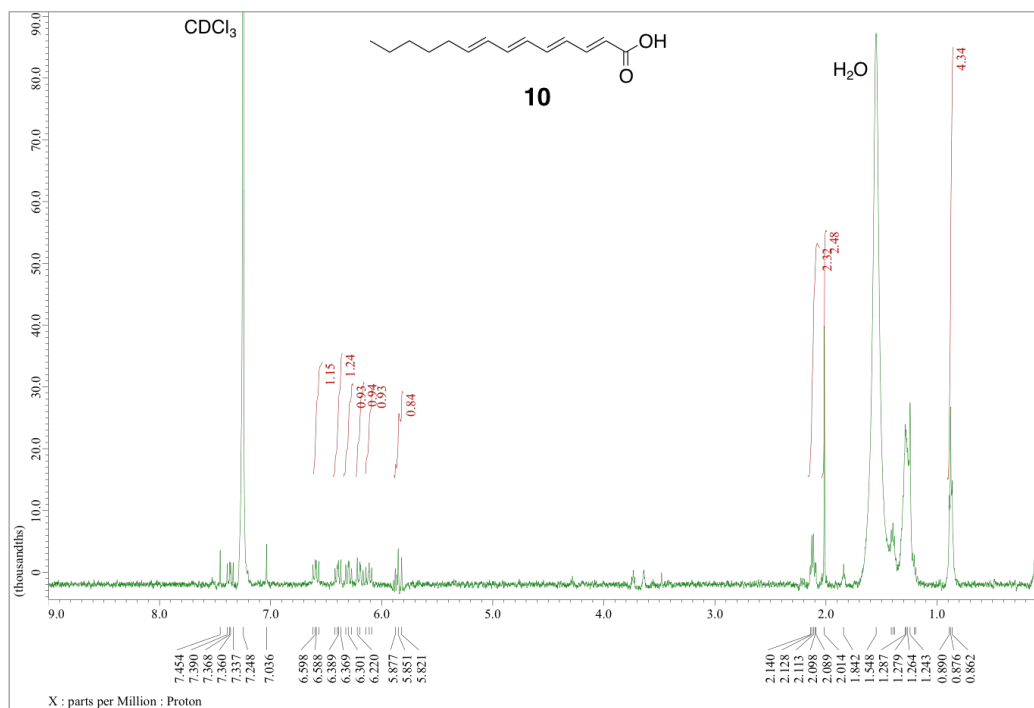


Figure 4-S4. (2E,4E,6E,8E)-Tetradeca-2,4,6,8-tetraenoic acid (10) の ^1H NMR。 CDCl_3 を溶媒とし、JNM-A500 NMR system で測定を行った。

子クラスターがコードされていると考えられている。この手法は他の放線菌の休眠遺伝子クラスターの探索や新規化合物の発見にも応用できると考えられ、さらなる有用な化合物が単離されると期待される。

SARP7 の過剰発現により生産が誘導された化合物が NMR と HR-ESIMS の解析により、3-((2*E*,4*E*,6*E*,8*E*) 13-hydroxytetradenca-2,4,6,8-tetraenamido) propanoic acid であることが明らかになった。この新規化合物を *ishigamide* と命名した。他に見出された構造未知の 8 つの化合物も新規な構造を有している可能性が期待されるため、単離精製と構造決定をする価値があると考えられる。

第三章では、遺伝子破壊実験により、休眠遺伝子クラスターの活性化により見出された新規化合物 *ishigamide* の生合成遺伝子クラスターを同定した。*Ishigamide* 構造中のポリペプチド骨格は PKS により生合成されると考えられ、それを指標に生産菌のドラフトゲノムを探索した。見出された 3 つの生合成遺伝子クラスター候補中に存在する KS 遺伝子を破壊し、II 型 PKS (IgaPKS) 遺伝子を含む *ishigamide* 生合成遺伝子クラスター (*iga* クラスター) を同定した。II 型 PKS は還元度の低い芳香族ポリケタイドの合成に特化したものと長年考えられていたため、IgaPKS が還元度の高いポリエン骨格を合成することは大変興味深い。*In silico* 解析より、*ishigamide* のポリエン骨格の生合成を担う KS (Iga11)、CLF (Iga12)、KR (Iga13) ドメインは典型的な II 型 PKS 中に存在するものと異なる系統分類を示すことが示唆された。これらの酵素は低還元度の芳香族化合物の代わりに高還元度のポリエンを合成するのに用いられると考えられる。そこで IgaPKS をこれまで知られていない新規な高還元型 II 型 PKS サブファミリーに属することを提唱し、そのさらなる解析を進めることにした。

第四章では、大腸菌を宿主に用いて、IgaPKS の構成要素を組み換えタンパク質として調製し、それらの触媒能 (Figure 7-1) を *in vitro* 解析により明らかにした。Iga11-Iga12 複合体を holo-Iga10、malonyl-CoA、hexanoyl-CoA と共に反応させたところ、3-oxooctanoyl-Iga10 のみが生成した。このことから、既知の II 型 PKS の KS-CLF が連続的な縮合反応を触媒するのに対し、Iga11-Iga12 複合体は単独では一回の縮合反応のみを触媒することが明らかになった。一方、Iga11-Iga12 複合体、holo-Iga10、Iga13、Iga16 を malonyl-CoA、hexanoyl-CoA、NADPH と共に反応させた後、Iga10 に結合しているポリケタイド鎖をアルカリ加水分解により切り離し、分析したところ、4 つの不飽和カルボン酸 (Figure 7-1、7-10) の生成が確認された。この結果から、Iga11-Iga12、Iga13、Iga16 がそれぞれ触媒する縮合、還元、脱水の反応サイクルによりポリエン骨格が伸長してい

ることが明らかになった。また、好む度合いは異なるが、IgaPKS は異なる長さの acyl-CoA (C₂~C₁₂) をスターター基質として取り込み、最終的に C₁₄ の不飽和脂肪酸骨格を合成することが明らかになった。さらに、本章で行った実験により、IgaPKS が厳密な立体制御を行っていることや、Iga11-Iga12 が KASIII と類似し、CoA エステルを基質とする自己アシル化能を示すといった興味深い発見を報告した。

IgaPKS 酵素群のうち、Iga13 が触媒するケト還元反応、Iga16 が触媒する水付加反応 (生合成経路における脱水反応の逆反応)、Iga11-Iga12 の自己アシル化反応に対し、速度論パラメーターを算出した。そのうち、Iga11-Iga12 の自己アシル化が律速反応であることが明らかになった。Iga10 の自己マロニル化反応は反応速度が極めて遅いと見受けられ、反応初速度を決めることが難航した。また、高濃度の malonyl-Iga10 が Iga11-Iga12 の自己アシル化能を阻害することが本章で行った実験より示唆され、malo-Iga10 を伸長基質とする Iga11-Iga12 が触媒する縮合反応の初速度を解析することができなかった。より良い分析系を構築し、速度論パラメーターを算出することは酵素学的に有意義であると考えられる。

第四章の結果は II 型 PKS の高還元度ポリエン骨格合成能を *in vitro* で示した初の例であり、II 型 PKS が芳香族化合物の生合成に特化しているという定説を補完し、II 型 PKS の触媒能に関する知見を広めた。

第五章では、IgaPKS の X 線結晶構造解析を行うことにより、その触媒機構の解明を目指した。本章において、ActKS-ActCLF に続く KS-CLF 結晶構造の二例目 (Iga11-Iga12、C6-Iga11-Iga12)、KS-CLF と ACP が形成する三者複合体結晶構造の初の例 (4'-phosphopantetheinyl アナログの先端に alkene chloride 構造を付加した crosslink プローブを利用して調製した C8Cl-Iga10=Iga11-Iga12) を報告した。結晶構造に基づき、異なる II 型 FAS / PKS システム由来の KS モノダイマー、KS-CLF ヘテロダイマー間の相違点を議論し、高還元型 II 型 PKS が触媒するポリエン合成の分子メカニズムを考察した。Iga11-Iga12 のうち、CLF である Iga12 は縮合活性を有さず、ポリエン鎖長の制御のみに関与することが示唆された。また、Iga10 と Iga11-Iga12 の相互作用に Iga10 helix II の酸性アミノ酸と Iga11、Iga12 両者の表面塩基性アミノ酸間で形成する水素結合が重要であることが結晶構造、及び変異実験により示された。

第六章では、PKS システムにおけるタンパク質間相互作用について調べた。IgaPKS システムにおいて、Iga10 の修飾状態に関わらず、Iga11-Iga12 はそれを認識し、相互作用することができる。その際、両者は複雑かつ段階的な相互作用様式を示すことが推測

される。また、両者の K_D はおよそ $10 \mu\text{M}$ である。さらに、異なる II 型 FAS / PKS システム由来の ACP と KS (KS-CLF) も相互作用できることが示唆された。

第三章から第六章にかけて、放線菌新規化合物生合成経路の解明、生合成メカニズムの解析を行った。その過程において、新規な高還元型 II 型 PKS サブファミリーを発見し、その活性を *in vitro* で確認、触媒メカニズムを結晶構造解析や相互作用解析により探求した。ここまでに各章ごとに考察を行ってきたが、章を跨った議論からも興味深い発見を導く。例えば、第四章では CoA 体に対する Iga11-Iga12 自己アシル化の基質特異性を調べ、Iga11-Iga12 が CoA 体に対する K_m が数十 μM であることが示された。さらに、第六章で行った iTC 解析から Iga11-Iga12 が ACP 体 (PK-ADTP-Iga10, holo-Iga10) に対する K_D が $10 \mu\text{M}$ 程度であることが示された。これらの結果を統合すると、Iga11-Iga12 は基質に CoA 体より ACP 体を好むことが示唆される。また、第六章では Iga11-Iga12 が他の II 型 FAS / PKS システム由来の ACP を認識し、それらと相互作用できることが示された。ここから生体内における IgaPKS の基質の由来を連想すると、IgaPKS が Iga10、もしくは他のシステムの ACP を借用し、基質を取り込む可能性が高いと予想される。Iga10 は acyl-CoA に対して自己アシル化能を示さない。Iga10 が IgaPKS への開始基質輸送を担うのであれば、他の ACP から Iga10 への直接なアシル転移反応が起こる可能性が考えられる。同一生物が持つ異なる II 型 FAS / PKS システムがどのようにお互いを認識、区別した上で crosstalk する機構を更に研究することは興味深い知見を導くだろう。

全体的に、本研究により PKS の進化、分類、触媒機構に関する知見が広がり、学術的に有意義であると考えられる。ここで得られた知見をさらに、生合成経路のリエンジニアリング、酵素工学、コンビナトリアル生合成を利用したものづくりに応用し、有用な新規化合物の創出に繋がることのできるなら喜ばしい。例えば、結晶構造解析より得られた Iga10 と Iga11-Iga12 相互面に関する知見は他の II 型 FAS / PKS システムにも応用できると考えられる。ACP と触媒ドメイン間の相互作用を改変し、本来相互作用の弱い者同士の相互作用を強化すれば、人工設計した ACP が仲介する生合成経路により目的化合物を合成できると考えられる。

引用文献

1. Newman, D. J. & Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **79**, 629–661 (2016).
2. Hertweck, C. The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity. *Angewandte Chemie International Edition* **48**, 4688–4716 (2009).
3. Staunton, J. & Weissman, K. J. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural Product Reports* **18**, 380–416 (2001).
4. Smith, S. & Tsai, S.-C. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Natural Product Reports* **24**, 1041 (2007).
5. Dreier, J., Li, Q. & Khosla, C. Malonyl-CoA:ACP transacylase from *Streptomyces coelicolor* has two alternative catalytically active nucleophiles. *Biochemistry* **40**, 12407–12411 (2001).
6. Schweizer, E. & Hofmann, J. Microbial type I fatty acid synthases (FAS): major players in a network of cellular FAS systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 501–517, table of contents (2004).
7. Leibundgut, M., Jenni, S., Frick, C. & Ban, N. Structural Basis for Substrate Delivery by Acyl Carrier Protein in the Yeast Fatty Acid Synthase. *Science* **316**, 288–290 (2007).
8. Maier, T., Leibundgut, M. & Ban, N. The Crystal Structure of a Mammalian Fatty Acid Synthase. *Science* **321**, 1315–1322 (2008).
9. Maier, T. Architecture of Mammalian Fatty Acid Synthase at 4.5 Å Resolution. *Science* **311**, 1258–1262 (2006).
10. Johansson, P. *et al.* Multimeric Options for the Auto-Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* FAS Type I Megasynthase. *Structure* **17**, 1063–1074 (2009).
11. White, S. W., Zheng, J., Zhang, Y.-M. & Rock, null. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 791–831 (2005).
12. Weissman, K. J. Uncovering the structures of modular polyketide synthases. *Natural Product Reports* **32**, 436–453 (2015).
13. Dutta, S. *et al.* Structure of a modular polyketide synthase. *Nature* **510**, 512–517 (2014).
14. Lowry, B. *et al.* In vitro reconstitution and analysis of the 6-deoxyerythronolide B synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16809–16812 (2013).
15. Xu, W., Qiao, K. & Tang, Y. Structural analysis of protein–protein interactions in type I polyketide synthases. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* **48**, 98–122 (2013).
16. Herbst, D. A., Townsend, C. A. & Maier, T. The architectures of iterative type I PKS and FAS. *Natural Product Reports* **35**, 1046–1069 (2018).
17. Chen, H. & Du, L. Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 541–557 (2016).

18. Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y. & Bechthold, A. Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat Prod Rep* **24**, 162–190 (2007).
19. Dreier, J. & Khosla, C. Mechanistic Analysis of a Type II Polyketide Synthase. Role of Conserved Residues in the β -Ketoacyl Synthase–Chain Length Factor Heterodimer[†]. *Biochemistry* **39**, 2088–2095 (2000).
20. Tang, Y., Tsai, S.-C. & Khosla, C. Polyketide chain length control by chain length factor. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 12708–12709 (2003).
21. Koppisch, A. T. & Khosla, C. Structure-based mutagenesis of the malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase from *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry* **42**, 11057–11064 (2003).
22. Beltran-Alvarez, P. *et al.* Preliminary kinetic analysis of acyl carrier protein–ketoacylsynthase interactions in the actinorhodin minimal polyketide synthase. *Molecular BioSystems* **5**, 511 (2009).
23. Keatinge-Clay, A. T., Maltby, D. A., Medzihradzky, K. F., Khosla, C. & Stroud, R. M. An antibiotic factory caught in action. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 888–893 (2004).
24. Katsuyama, Y. & Ohnishi, Y. Type III Polyketide Synthases in Microorganisms. in *Methods in Enzymology* **515**, 359–377 (Elsevier, 2012).
25. Shimizu, Y., Ogata, H. & Goto, S. Type III Polyketide Synthases: Functional Classification and Phylogenomics. *ChemBioChem* **18**, 50–65 (2017).
26. Austin, M. B. & Noel, J. P. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **20**, 79–110 (2003).
27. Walsh, C. T., Gehring, A. M., Weinreb, P. H., Quadri, L. E. & Flugel, R. S. Post-translational modification of polyketide and nonribosomal peptide synthases. *Curr Opin Chem Biol* **1**, 309–315 (1997).
28. Cronan, J. E. The chain-flipping mechanism of ACP (acyl carrier protein)-dependent enzymes appears universal. *Biochemical Journal* **460**, 157–163 (2014).
29. Lim, J. *et al.* Solution Structures of the Acyl Carrier Protein Domain from the Highly Reducing Type I Iterative Polyketide Synthase CalE8. *PLoS ONE* **6**, e20549 (2011).
30. Płoskoń, E. *et al.* Recognition of Intermediate Functionality by Acyl Carrier Protein over a Complete Cycle of Fatty Acid Biosynthesis. *Chemistry & Biology* **17**, 776–785 (2010).
31. Keatinge-Clay, A. T. Stereocontrol within polyketide assembly lines. *Natural Product Reports* **33**, 141–149 (2016).
32. Weissman, K. J. Polyketide stereocontrol: a study in chemical biology. *Beilstein Journal of Organic Chemistry* **13**, 348–371 (2017).
33. Keatinge-Clay, A. T. A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides. *Chemistry & Biology* **14**, 898–908 (2007).

34. Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651–2674 (1997).
35. Payne, J. A. E., Schoppet, M., Hansen, M. H. & Cryle, M. J. Diversity of nature's assembly lines - recent discoveries in non-ribosomal peptide synthesis. *Mol Biosyst* **13**, 9–22 (2016).
36. Walsh, C. T. Insights into the chemical logic and enzymatic machinery of NRPS assembly lines. *Nat Prod Rep* **33**, 127–135 (2016).
37. Röttig, M. *et al.* NRSPredictor2--a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucl. Acid. Res.* **39**, W362–W367 (2011).
38. Ye, Z. & Williams, G. J. Mapping a Ketosynthase:Acyl Carrier Protein Binding Interface via Unnatural Amino Acid-Mediated Photo-Cross-Linking. *Biochemistry* **53**, 7494–7502 (2014).
39. Finzel, K. *et al.* Probing the Substrate Specificity and Protein-Protein Interactions of the E. coli Fatty Acid Dehydratase, FabA. *Chemistry & Biology* **22**, 1453–1460 (2015).
40. Miyanaga, A. *et al.* Structural Basis of Protein-Protein Interactions between a trans-Acting Acyltransferase and Acyl Carrier Protein in Polyketide Disorazole Biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **140**, 7970–7978 (2018).
41. Herbst, D. A. *et al.* The structural organization of substrate loading in iterative polyketide synthases. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 474–479 (2018).
42. Jackson, D. R. *et al.* Structural and Functional Studies of the Daunorubicin Priming Ketosynthase DpsC. *ACS Chemical Biology* **13**, 141–151 (2018).
43. Chen, A., Re, R. N. & Burkart, M. D. Type II fatty acid and polyketide synthases: deciphering protein–protein and protein–substrate interactions. *Natural Product Reports* (2018). doi:10.1039/C8NP00040A
44. Shapiro, E., Biezuner, T. & Linnarsson, S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nature Reviews Genetics* **14**, 618–630 (2013).
45. Ochi, K. Insights into microbial cryptic gene activation and strain improvement: principle, application and technical aspects. *J. Antibiot.* **70**, 25–40 (2017).
46. Baral, B., Akhgari, A. & Metsä-Ketelä, M. Activation of microbial secondary metabolic pathways: Avenues and challenges. *Synthetic and Systems Biotechnology* **3**, 163–178 (2018).
47. Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. & Zeeck, A. Big Effects from Small Changes: Possible Ways to Explore Nature's Chemical Diversity. *ChemBioChem* **3**, 619 (2002).
48. Ochi, K., Tanaka, Y. & Tojo, S. Activating the expression of bacterial cryptic genes by rpoB mutations in RNA polymerase or by rare earth elements. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **41**, 403–414 (2014).
49. Onaka, H., Mori, Y., Igarashi, Y. & Furumai, T. Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 400–406 (2011).

50. Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S. & Ochi, K. The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Letters* **274**, 311–315 (2007).
51. Baltz, R. H. *Streptomyces* and *Saccharopolyspora* hosts for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **37**, 759–772 (2010).
52. Chen, Y., Smanski, M. J. & Shen, B. Improvement of secondary metabolite production in *Streptomyces* by manipulating pathway regulation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**, 19–25 (2010).
53. Martín, J.-F. & Liras, P. Engineering of regulatory cascades and networks controlling antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Current Opinion in Microbiology* **13**, 263–273 (2010).
54. Liu, G., Chater, K. F., Chandra, G., Niu, G. & Tan, H. Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**, 112–143 (2013).
55. Arias, P., Fernández-Moreno, M. A. & Malpartida, F. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **181**, 6958–6968 (1999).
56. Huang, J. *et al.* Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*: Cross-regulation between antibiotic pathways. *Molecular Microbiology* **58**, 1276–1287 (2005).
57. Horinouchi, S. AfsR as an integrator of signals that are sensed by multiple serine/threonine kinases in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **30**, 462–467 (2003).
58. Ohno, S. *et al.* Identification and Characterization of the Streptazone E Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *ChemBioChem* **16**, 2385–2391 (2015).
59. Blin, K. *et al.* antiSMASH 2.0--a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers. *Nucleic Acids Res.* **41**, W204–212 (2013).
60. Du, D. *et al.* Production of a Novel Amide-Containing Polyene by Activating a Cryptic Biosynthetic Gene Cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *Chembiochem* **17**, 1464–1471 (2016).
61. Anton, N. *et al.* PimM, a PAS domain positive regulator of pimaricin biosynthesis in *Streptomyces natalensis*. *Microbiology* **153**, 3174–3183 (2007).
62. Chen, Y., Yin, M., Horsman, G. P., Huang, S. & Shen, B. Manipulation of pathway regulation in *Streptomyces globisporus* for overproduction of the enediyne antitumor antibiotic C-1027. *The Journal of Antibiotics* **63**, 482–485 (2010).
63. Bergmann, S. *et al.* Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 213–217 (2007).

64. Chen, Y., Wendt-Pienkowski, E. & Shen, B. Identification and Utility of FdmR1 as a Streptomyces Antibiotic Regulatory Protein Activator for Fredericamycin Production in Streptomyces griseus ATCC 49344 and Heterologous Hosts. *Journal of Bacteriology* **190**, 5587–5596 (2008).
65. Onaka, H., Taniguchi, S., Ikeda, H., Igarashi, Y. & Furumai, T. pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-Escherichia coli integrating vectors for heterologous gene expression. *J. Antibiot.* **56**, 950–956 (2003).
66. Hatanaka, T. *et al.* pTONA5: A hyperexpression vector in streptomycetes. *Protein Expression and Purification* **62**, 244–248 (2008).
67. Keatinge-Clay, A. T. The structures of type I polyketide synthases. *Nat Prod Rep* **29**, 1050–1073 (2012).
68. Dreier, J. & Khosla, C. Mechanistic analysis of a type II polyketide synthase. Role of conserved residues in the beta-ketoacyl synthase-chain length factor heterodimer. *Biochemistry* **39**, 2088–2095 (2000).
69. Bisang, C. *et al.* A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature* **401**, 502–505 (1999).
70. Pohle, S., Appelt, C., Roux, M., Fiedler, H.-P. & Süssmuth, R. D. Biosynthetic gene cluster of the non-ribosomally synthesized cyclodepsipeptide skyllamycin: deciphering unprecedented ways of unusual hydroxylation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 6194–6205 (2011).
71. Yu, Z., Vodanovic-Jankovic, S., Kron, M. & Shen, B. New WS9326A Congeners from *Streptomyces* sp. 9078 Inhibiting *Brugia malayi* Asparaginyl-tRNA Synthetase. *Organic Letters* **14**, 4946–4949 (2012).
72. Bilyk, O. *et al.* New Simocyclinones: Surprising Evolutionary and Biosynthetic Insights. *ACS Chem. Biol.* **11**, 241–250 (2016).
73. Petříčková, K. *et al.* Biosynthesis of Colabomycin E, a New Manumycin-Family Metabolite, Involves an Unusual Chain-Length Factor. *ChemBioChem* **15**, 1334–1345 (2014).
74. Rui, Z. *et al.* Biochemical and Genetic Insights into Asukamycin Biosynthesis. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 24915–24924 (2010).
75. Myronovskyi, M., Welle, E., Fedorenko, V. & Luzhetskyy, A. β -Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Reporter in Actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* **77**, 5370–5383 (2011).
76. Oppermann, U. *et al.* Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem. Biol. Interact.* **143–144**, 247–253 (2003).
77. Javidpour, P., Das, A., Khosla, C. & Tsai, S.-C. Structural and biochemical studies of the hedamycin type II polyketide ketoreductase (HedKR): molecular basis of stereo- and regiospecificities. *Biochemistry* **50**, 7426–7439 (2011).
78. Javidpour, P. *et al.* The determinants of activity and specificity in actinorhodin type II polyketide ketoreductase. *Chem. Biol.* **20**, 1225–1234 (2013).

79. Keatinge-Clay, A. T. A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides. *Chem. Biol.* **14**, 898–908 (2007).
80. Liu, C. *et al.* Substrate-bound structures of a ketoreductase from amphotericin modular polyketide synthase. *Journal of Structural Biology* **203**, 135–141 (2018).
81. Bonnett, S. A. *et al.* Structural and Stereochemical Analysis of a Modular Polyketide Synthase Ketoreductase Domain Required for the Generation of a cis-Alkene. *Chemistry & Biology* **20**, 772–783 (2013).
82. Javidpour, P., Korman, T. P., Shakya, G. & Tsai, S.-C. Structural and Biochemical Analyses of Regio- and Stereospecificities Observed in a Type II Polyketide Ketoreductase. *Biochemistry* **50**, 4638–4649 (2011).
83. Crosby, J. *et al.* Acylation of Streptomyces type II polyketide synthase acyl carrier proteins. *FEBS Lett.* **433**, 132–138 (1998).
84. Cacho, R. A. *et al.* Understanding Programming of Fungal Iterative Polyketide Synthases: The Biochemical Basis for Regioselectivity by the Methyltransferase Domain in the Lovastatin Megasyntase. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 15688–15691 (2015).
85. Siskos, A. P. *et al.* Molecular Basis of Celmer’s Rules: Stereochemistry of Catalysis by Isolated Ketoreductase Domains from Modular Polyketide Synthases. *Chemistry & Biology* **12**, 1145–1153 (2005).
86. Surin, B. P. & Downie, J. A. Characterization of the Rhizobium leguminosarum genes nodLMN involved in efficient host-specific nodulation. *Mol. Microbiol.* **2**, 173–183 (1988).
87. Rivers, S. L., McNairn, E., Blasco, F., Giordano, G. & Boxer, D. H. Molecular genetic analysis of the moa operon of Escherichia coli K-12 required for molybdenum cofactor biosynthesis. *Mol. Microbiol.* **8**, 1071–1081 (1993).
88. Singh, R. & Reynolds, K. A. Identification and Characterization of FabA from the Type II Fatty Acid Synthase of *Streptomyces coelicolor*. *Journal of Natural Products* **79**, 240–243 (2016).
89. Li, Y. *et al.* Functional Characterization of a Dehydratase Domain from the Pikromycin Polyketide Synthase. *Journal of the American Chemical Society* **137**, 7003–7006 (2015).
90. Faille, A. *et al.* Insights into Substrate Modification by Dehydratases from Type I Polyketide Synthases. *Journal of Molecular Biology* **429**, 1554–1569 (2017).
91. Misra, A., Sharma, S. K., Surolia, N. & Surolia, A. Self-Acylation Properties of Type II Fatty Acid Biosynthesis Acyl Carrier Protein. *Chemistry & Biology* **14**, 775–783 (2007).
92. Dunn, B. J., Cane, D. E. & Khosla, C. Mechanism and Specificity of an Acyltransferase Domain from a Modular Polyketide Synthase. *Biochemistry* **52**, 1839–1841 (2013).
93. Molnos, J., Gardiner, R., Dale, G. E. & Lange, R. A continuous coupled enzyme assay for bacterial malonyl-CoA:acyl carrier protein transacylase (FabD). *Analytical Biochemistry* **319**, 171–176 (2003).

94. Izumikawa, M., Cheng, Q. & Moore, B. S. Priming type II polyketide synthases via a type II nonribosomal peptide synthetase mechanism. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 1428–1429 (2006).
95. Kalaitzis, J. A. *et al.* Policing starter unit selection of the enterocin type II polyketide synthase by the type II thioesterase EncL. *Bioorg. Med. Chem.* **19**, 6633–6638 (2011).
96. Pan, H. *et al.* Crystal structure of the priming beta-ketosynthase from the R1128 polyketide biosynthetic pathway. *Structure* **10**, 1559–1568 (2002).
97. Jackson, D. R. *et al.* Structural and Functional Studies of the Daunorubicin Priming Ketosynthase DpsC. *ACS Chem. Biol.* **13**, 141–151 (2018).
98. Bililign, T., Hyun, C.-G., Williams, J. S., Czisny, A. M. & Thorson, J. S. The hedamycin locus implicates a novel aromatic PKS priming mechanism. *Chem. Biol.* **11**, 959–969 (2004).
99. Du, D., Katsuyama, Y., Shin-Ya, K. & Ohnishi, Y. Reconstitution of a Type II Polyketide Synthase that Catalyzes Polyene Formation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **57**, 1954–1957 (2018).
100. Hertweck, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **48**, 4688–4716 (2009).
101. Chen, H. & Du, L. Iterative polyketide biosynthesis by modular polyketide synthases in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 541–557 (2016).
102. Weissman, K. J. Correction: Uncovering the structures of modular polyketide synthases. *Nat Prod Rep* (2017). doi:10.1039/c7np90027a
103. Dong, C. *et al.* Crystal structure and mechanism of a bacterial fluorinating enzyme. *Nature* **427**, 561–565 (2004).
104. Shakya, G. *et al.* Modeling linear and cyclic PKS intermediates through atom replacement. *J. Am. Chem. Soc.* **136**, 16792–16799 (2014).
105. Soehano, I. *et al.* Insights into the programmed ketoreduction of partially reducing polyketide synthases: stereo- and substrate-specificity of the ketoreductase domain. *Org. Biomol. Chem.* **12**, 8542–8549 (2014).
106. Zhou, H. *et al.* A fungal ketoreductase domain that displays substrate-dependent stereospecificity. *Nature Chemical Biology* **8**, 331–333 (2012).
107. Ran, C., Zhang, W. & Sayre, L. M. Synthesis and protein reactivity of 2E,4E,6E-dodecatrienal. *Tetrahedron Letters* **45**, 7851–7853 (2004).
108. Finzel, K., Lee, D. J. & Burkart, M. D. Using Modern Tools To Probe the Structure-Function Relationship of Fatty Acid Synthases. *ChemBioChem* **16**, 528–547 (2015).
109. Finzel, K. *et al.* Probing the Substrate Specificity and Protein-Protein Interactions of the E. coli Fatty Acid Dehydratase, FabA. *Chemistry & Biology* **22**, 1453–1460 (2015).
110. Konno, S., La Clair, J. & Burkart, M. D. Trapping the complex molecular machinery of polyketide and fatty acid synthases with tunable silyl-cyanohydrin crosslinkers. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* (2018). doi:10.1002/anie.201806865

111. Gulick, A. M. & Aldrich, C. C. Trapping interactions between catalytic domains and carrier proteins of modular biosynthetic enzymes with chemical probes. *Natural Product Reports* (2018). doi:10.1039/C8NP00044A
112. Klaus, M. *et al.* Protein-Protein Interactions, Not Substrate Recognition, Dominate the Turnover of Chimeric Assembly Line Polyketide Synthases. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 16404–16415 (2016).
113. Barajas, J. F., Blake-Hedges, J. M., Bailey, C. B., Curran, S. & Keasling, J. D. Engineered polyketides: Synergy between protein and host level engineering. *Synthetic and Systems Biotechnology* **2**, 147–166 (2017).
114. Worthington, A. S., Porter, D. F. & Burkart, M. D. Mechanism-based crosslinking as a gauge for functional interaction of modular synthases. *Organic & Biomolecular Chemistry* **8**, 1769 (2010).
115. Bruegger, J. *et al.* Probing the Selectivity and Protein-Protein Interactions of a Nonreducing Fungal Polyketide Synthase Using Mechanism-Based Crosslinkers. *Chemistry & Biology* **20**, 1135–1146 (2013).
116. Worthington, A. S. *et al.* Probing the Compatibility of Type II Ketosynthase-Carrier Protein Partners. *ChemBioChem* **9**, 2096–2103 (2008).
117. Jenner, M. *et al.* Mechanism of intersubunit ketosynthase-dehydratase interaction in polyketide synthases. *Nat. Chem. Biol.* **14**, 270–275 (2018).
118. Nguyen, C. *et al.* Trapping the dynamic acyl carrier protein in fatty acid biosynthesis. *Nature* **505**, 427–431 (2014).
119. Evans, S. E. *et al.* An ACP structural switch: conformational differences between the apo and holo forms of the actinorhodin polyketide synthase acyl carrier protein. *Chembiochem* **9**, 2424–2432 (2008).
120. Kim, Y., Kovrigin, E. L. & Eletr, Z. NMR studies of Escherichia coli acyl carrier protein: Dynamic and structural differences of the apo- and holo-forms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **341**, 776–783 (2006).
121. Li, Q., Khosla, C., Puglisi, J. D. & Liu, C. W. Solution Structure and Backbone Dynamics of the Holo Form of the Frenolicin Acyl Carrier Protein[†]. *Biochemistry* **42**, 4648–4657 (2003).
122. Ishikawa, F., Haushalter, R. W., Lee, D. J., Finzel, K. & Burkart, M. D. Sulfonyl 3-Alkynyl Pantetheinamides as Mechanism-Based Cross-Linkers of Acyl Carrier Protein Dehydratase. *Journal of the American Chemical Society* **135**, 8846–8849 (2013).
123. Crosby, J. & Crump, M. P. The structural role of the carrier protein – active controller or passive carrier. *Natural Product Reports* **29**, 1111 (2012).
124. Velázquez Campoy, A. & Freire, E. ITC in the post-genomic era...? Priceless. *Biophysical Chemistry* **115**, 115–124 (2005).
125. Fivash, M., Towler, E. M. & Fisher, R. J. BIAcore for macromolecular interaction. *Current Opinion in Biotechnology* **9**, 97–101 (1998).

126. Moretto, L., Vance, S., Heames, B. & Broadhurst, R. W. Dissecting how modular polyketide synthase ketoreductases interact with acyl carrier protein-attached substrates. *Chem. Commun.* **53**, 11457–11460 (2017).
127. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L.-N. Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a non-isothermal titration calorimeter. *Analytical Biochemistry* **179**, 131–137 (1989).
128. Hodgkinson, J. T. *et al.* Robust routes for the synthesis of N-acylated-L-homoserine lactone (AHL) quorum sensing molecules with high levels of enantiomeric purity. *Tetrahedron Letters* **52**, 3291–3294 (2011).

謝辞

本研究を行うにあたり、醗酵学研究室を始め、様々な方にお世話になりました。当研究室との縁は「醗酵学研究室ホームページ」から始まりました。留学を決めた当時、自分が日本国内に來れなかったため、研究室に関する「イメージ」は大体ホームページを通じて立てました。興味深い研究内容だけでなく、研究室の真面目で前向きな雰囲気は凄く心が惹かれておりました。またホームページには当研究室教授でおられます大西康夫先生が対象者別に研究室を志望する人に向けたメッセージを掲載しておられまして、私はそのメッセージを拝読し、醗酵学研究室を志望する意思を固めました。醗酵学研究室に在籍した五年半の間、大西先生が真剣にサイエンスや教育に関する仕事に取り組んでいる姿勢に激励され、自分も先生が仕切る醗酵学研究室にいて相応しい学生になりたいと頑張れるようになりました。また、自分の実験や発表に対する先生のご指摘から、研究者としての心構えや行動方針について学ばせていただきました。これまでご指導いただきありがとうございます。これからも、先生の教えを大事に、細かいところまで念入りに確認し、分かりやすく、正確に結果をまとめること常に意識し、研究を続けていきたいと思っております。

当研究室准教授でおられます勝山陽平先生には、研究室に來た時から直接研究についてご指導いただきました。言葉の通じにくい私でしたが、一から優しく実験方法やデータの解析方法を教えてくれた先生のお陰で、実験を進められて、論文をまとめることができました。また、自分の専門分野だけでなく、ほかの研究分野にも関心を持っておられ、知識豊富でいろんな技術や器械を駆使できる先生は自分が目指すべき存在であると日々感じています。自分より遥かに優秀な先生が自分より速いスピードで沢山のことを学習している光景を見ますと、焦ります。置いていかれすぎないようにという思いを頑張りに変換しつつ(効率はともかく)、研究を進めてきました。研究者、教育者、人として魅力的な先生の指導下で研究を進められたことに大変感謝しております。

当研究室助教でおられます手塚武揚先生には RNA に関する実験を教わりました。また、研究の方向性等に関するご指導をして頂いたり、ゼミ後の飲み会で楽しい話を聞かせてくれたり、ありがとうございます。

微生物潜在機能酵素寄付講座教授でおられます尾仲宏康先生にはゼミで鋭いご指摘をいただき、研究を進める上で非常に参考になりました。また、先生が主催されている輪読会に参加させていただき、毎週有用な知識を勉強でき、大変有意義な時間を過ごせるようになりました。さらに、使わせていただいた pTYM 系のベクターもこの研究において大変活躍しました。微生物潜在機能探索寄付講座特任助教でおられます浅水俊平先生にはゼミでのご指摘、ご助言をいただき、ありがとうございます。先生が

厳密に研究と向き合う姿は常に私に良い刺激を与えてくれました。また、LCMS を使わせていただき、ありがとう御座います。

東京電機大学教授でおられます川崎寿先生には、飲み会の場で企業での研究や企業と大学の違いについて話を聞かせていただき、大変有用な情報を与えてくれました。

産業技術総合研究所臨海副都心センター主任研究員でおられます新家一男先生から、研究対象である放線菌 *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 を頂き、研究を始められました。また、データ解析等で大変お世話になりました。ありがとう御座います。

沖縄科学技術大学院大学の佐藤矩行教授、藤江学技術主任に放線菌のドラフトゲノム解析でお世話になりました。ありがとう御座います。

東京大学酵素学研修室の伏信進矢教授には X 線結晶構造解析で大変お世話になりました。ありがとう御座います。

東京大学細胞機能工学研究室の吉田彩子博士には iTC の測定とデータの解析等で大変お世話になりました。何度も測定を手伝ってください、相談に乗って下さりありがとう御座います。

降旗一夫先生には NMR の測定方法などについて教えていただき、大変助かりました。

I would like to thank people from Michael Burkart lab in UCSD for accepting me as a visiting student and walking me through with the fancy one-pot and crosslink technique. Everyone was so nice, and I learn a lot from you guys. It was quite a wonderful experience for me to work in a different lab from a different country with different culture background. Also, I would like to specially thank Dr. Sho Konno, Aochiu Chen and Terra Sztain-Pedone for not only discuss with me about my project, but also take me out for fun. Overall, the three months' experience really forced me to rethink about working efficiency and the importance of life work balance.

順番が前後していると思いますが、ここで私の彼氏さんにも感謝したいと思います。君がすこぶる良いタイミングで出現し、私の life にも、work にも、balance にも貢献して下さい、ありがとう御座います。

二年前に当研究室秘書でおられます松本真紀子さんと現在の秘書を務めておられます寺田朋子さんには、書類関連のことでいろいろお世話になりました。

菅井佳宣博士、富田宏矢博士、菅英一郎さん、浅野麻衣さん、豊田貴子さん、齋藤駿博士、河内護之博士、武田弘毅さん、福田隆雄さん、寺本和矢博士、牧野拓也博士、高橋慶さん、竹村知也さん、高橋里菜さん、キム ヒョウキョンさん、辛利弥博士、大野翔登さん、胡韋さん、毛利佳弘博士、江年博士、佐藤啓さん、曾根薫博士、角田毅さん及び研究室を出て行かれた皆様には、先輩として研究の手法や生命科学に関する知識を

教えてくださり、ありがとうございました。また、私のくだらない人生相談などにも付き合ってください、ありがとうございました。

同期の室井太木さん、太島有香さん、平松秀基さん、安田理沙さん、安久都卓哉さん、石川佳世子さん、堤隼馬さん、小野拓人さん、山下湖奈さんにおいても、大変お世話になりました。素晴らしい同期が近くにいるとつい頼ってしまう私ですが、みんな優しく接してくれてありがとうございました。

後輩の萩原亮太さん、東山洋輔くん、堺隆之くん、上野堅登くん、櫻雅也くん、土田晃令くん、岡本悠志くん、下村杜人くん、柳澤昌臣くん、アプロリ アグス チャハヤ プラマナくん、罗佳杰くん、戚思聪くん、小川友希さん、小山達樹くん、菅谷優子さん、橋口優一朗さん、金田彬くん、加藤愛美さん、藤田夏澄さん、山田研人くん、光山京太くん、前田聡史くん、鈴木遼太くん、姜博さん、桐原 正隆くん、石塚くん、浦野直樹くん、堀内真展様、新田峻平くん、矢田佳子さん、小境くん、李佳鳳さんが勉学や実験に励んでいる姿はいつも自分の動力に繋がっています。先輩として何も教えられることはありませんでしたが、個性豊かな面白い後輩がたくさんいたお陰で楽しいラボ生活を送ることができました。

実験するために必要な試薬、機械を届けてくれている業者さんにも大変感謝しております。ありがとうございます。

また、留学を決意した私を支えてくれた家族と友人達にも大変感謝しております。

醗酵学研究室に来た五年間半、楽しく研究生活を送れたのは研究室の皆さんと皆さんが作り上げた真面目で前向きな雰囲気のお陰です。来年度から醗酵学研究室を離れますが、研究関連、プライベート等の機会でみなさんと会うことを楽しみにしています。これからも引き続きよろしく申し上げます。