

博士論文（要約）

希少放線菌由来芳香族ポリケタイド fogacin 類の生合成機構の解析

佐藤 啓

## 本論文で用いた略記号

本論文で用いた略記号のうち、特に使用頻度の高い物を一覧として記載する。

**Table 1-1. 本論文で用いた略記号**

略記号	名称
ACN	acetonitrile
ACP	acyl carrier protein
ARO	aromatase
AT	acyltransferase
CLF	chain length factor
CoA	coenzyme A
COSY	correlated spectroscopy
CYC	cyclase
DC	decarboxylase
DH	dehydratase
ECH	enoyl-CoA hydratase
ER	enoylreductase
EtOAc	ethyl acetate
HCS	HMG-CoA synthase
HMG-CoA	hydroxymethylglutaryl-CoA
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	high performance liquid chromatography
HR-MS	high resolution mass spectrometry
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D(-)-thiogalactopyranoside
KR	ketoreductase
KS	ketosynthase
MAT	malonyl-CoA:ACP transacylase
min PKS	minimal PKS

MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
NOESY	nuclear Overhauser enhancement and exchange spectroscopy
PCR	polymerase chain reaction
PKS	polyketide synthase

---

## 目次

第1章 序論.....	8
1.1 ポリケタイド.....	8
1.2 ポリケタイド合成酵素 (PKS).....	9
1.3 I型 PKS.....	11
1.4 II型 PKS.....	13
1.4.1 ポリエンを合成する II型 PKS.....	15
1.5 III型 PKS.....	16
1.6 II型 PKS の結晶構造.....	18
1.7 actinorhodin.....	19
1.8 II型 PKS による actinorhodin 生合成.....	20
1.9 II型 PKS の開始基質.....	22
1.9.1 R1128 合成酵素における短鎖脂肪酸の導入.....	23

1.9.2 daunorbicin 合成酵素における propionate の導入 .....	25
1.9.3 hedamycin 合成酵素における 2,4-hexadienate の導入 .....	27
1.9.4 oxytetracycline 合成酵素における malonamate の導入 .....	28
1.9.5 enterocin 合成酵素における benzoate の導入 .....	29
1.9.6 trioxacarcin 生合成経路で提唱された分枝炭素鎖導入 .....	32
1.10 ポリケトメチレン鎖の $\beta$ -アルキル化 .....	33
1.10.1 HCS cassette .....	33
1.10.2 branching ドメイン .....	35
1.11 希少放線菌 <i>Actinoplanes missouriensis</i> .....	36
1.12 <i>A. missouriensis</i> が持つ II 型 PKS 遺伝子 .....	38
1.13 先行研究における <i>mip</i> クラスターの機能解析 .....	42
1.14 本研究の目的 .....	44
第 2 章 <i>A. missouriensis</i> が生産する芳香族ポリケタイドの同定 .....	46
2.1 目的 .....	46
2.2 実験と結果 .....	46
2.2.1 <i>A. missouriensis</i> の培養条件検討 .....	46
2.2.2 目的の化合物の単離と構造決定 .....	49

2.2.3 化合物 1 の構造決定 .....	50
2.2.4 化合物 2 の構造決定 .....	54
2.2.5 化合物 3 の構造決定 .....	56
2.3 考察 .....	65
2.4 実験項 .....	73
第 3 章 異種発現による 2 組の KS-CLF と HCS cassette の機能解析 .....	81
3.1 目的 .....	81
3.2 実験と結果 .....	84
3.2.1 異種発現による <i>fogNO</i> の機能解析 .....	84
3.2.1.1 発現用プラスミドの構築 .....	84
3.2.1.2 異種発現実験 .....	85
3.2.2 強制発現により生産された化合物の構造決定 .....	88
3.2.2.1 化合物 6 の構造決定 .....	89
3.2.2.2 化合物 7 の構造決定 .....	102
3.2.2.3 改良した分析系での異種発現実験 .....	113
3.3 考察 .....	116
3.4 実験項 .....	122

第4章 遺伝子破壊による2組のKS-CLFの機能解析.....	132
4.1 目的.....	132
4.2 実験と結果.....	134
4.2.1 <i>A. missouriensis</i> $\Delta fogA10$ 株の作製.....	134
4.2.2 <i>A. missouriensis</i> $\Delta fogN$ 株、 $\Delta fogA10fogN$ 株の作製.....	135
4.2.3 <i>A. missouriensis</i> $\Delta fogA11$ 株の作製.....	135
4.2.4 野生株と各破壊株の生産物比較.....	136
4.2.4 野生株と $\Delta fogA11$ 株の生産物比較.....	138
4.3 考察.....	140
4.4 実験項.....	144
第5章 <i>fog</i> クラスターの <i>in vitro</i> 機能解析.....	154
第6章 総合討論.....	155
参考文献.....	164
謝辞.....	173



# 第1章 序論

## 1.1 ポリケタイド

ポリケタイドは酢酸を構造の基本単位とする化合物の総称であり、天然化合物の中で巨大なグループを形成している。自然界においては、ポリケタイドは細菌、真菌、植物が持つポリケタイド合成酵素 (PKS) によって合成される。

ポリケタイドに属する化合物の構造は非常に多岐にわたる。その中には医学・薬学的に重要な生理活性を有するものが数多く存在する (Staunton and Weissman, 2001)。その為、ポリケタイドは医学、農学といった幅広い分野で活用されている (van Keulen and Dyson, 2014)。

代表的なポリケタイドを **Figure 1-1** に示す。ivermectin B1a は放線菌 *Streptomyces avermitilis* の生産する avermectin (Ikeda and Ōmura, 1997) の化学誘導体であり、抗寄生虫薬として活用される。放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* から単離された tacrolimus (Goto *et al.*, 1987) は免疫抑制剤として幅広く利用されている。他にも erythromycin や tetracycline など、多くのポリケタイドが臨床の場で抗生剤、抗腫瘍剤として用いられている。医薬品として利用される化合物以外の例として、赤ワインに含まれる resveratrol は抗菌・抗真菌活性 (Cichewicz and Kouzi, 2002) を有する他、抗老化成分として知られている (Russo *et al.*, 2019)。



また、ウコン (*Curcuma longa*) の持つ黄色色素である curcumin もポリケタイドに属している。

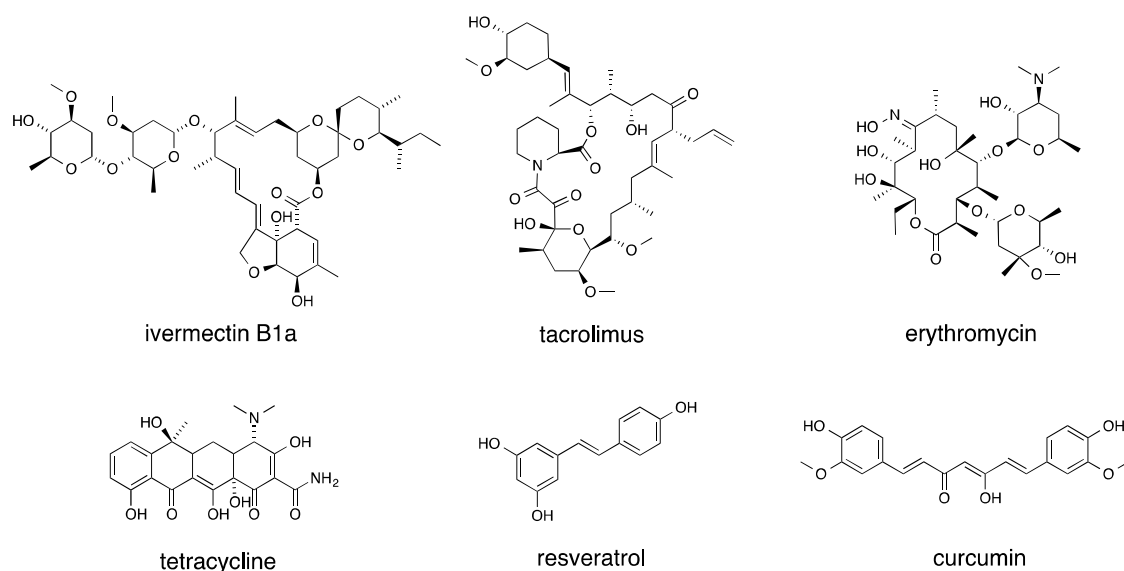


Figure 1-1. 代表的なポリケタイド

## 1.2 ポリケタイド合成酵素 (PKS)

PKS は多くが ketosynthase (KS)、acyl carrier protein (ACP)、acyltransferase (AT) 等の機能を持つ多様なドメインで構成されている。これらのドメインは、それぞれの機能に応じてポリケタイド鎖の合成、繫留、修飾を行い、ポリケタイドの合成に寄与する。

KS は、ポリケタイドの基本骨格となるポリケタイド鎖の伸長反応を触媒するドメインである (Figure 1-2)。KS の触媒する反応では、まず KS が開始基質となる acyl-CoA または acyl-ACP の acyl 基とチオエステル結合を形成する。この時、

acyl 基は KS の活性部位に存在する活性三残基 (catalytic triad) のシステインに結合、繫留される。次に、AT が ACP に malonyl-CoA や methylmalonyl-CoA 等の伸長基質の acyl 基を転移し、ACP のチオエステル結合体を形成する。このとき、ACP は phosphopantetheinyl transferase (PPTase) による修飾を受けた *holo*-ACP となっている。ACP は mRNA から翻訳される際、活性を持たない *apo*-ACP として翻訳される。PPTase は、補酵素 A (CoA) などの phosphopantetheinyl 基を *apo*-ACP に保存されたセリン残基上に転移する反応を触媒し、*apo*-ACP を活性型の *holo*-ACP への変換する (Lambalot *et al.* 1996)。

PPTase は *Escherichia coli* が持つ PPTase に代表される AcpS と、*Bacillus subtilis* に代表される Sfp の 2 つの大きなグループに分類することが出来、これらは基質として認識する ACP の大きさが異なっている (Finking *et al.*, 2002)。AcpS は脂肪酸合成酵素 (FAS) や II 型 PKS の比較的サイズの小さな ACP のみを基質として認識する (Gehring *et al.*, 1997)。対して、Sfp はより広い基質選択性を持つ。

ACP に acyl 基が転移した後、KS が開始基質と伸長基質との脱炭酸を伴う Claisen 縮合を触媒し、ポリケタイド鎖を合成する。この基礎的な伸長反応を繰り返し、dehydratase (DH) 、ketoreductase (KR) 、enoyl reductase (ER) 等による修飾を受けることによってポリケタイドの基本骨格は形成される。また、PKS はその構造から I 型、II 型、III 型に分類する事が出来る。

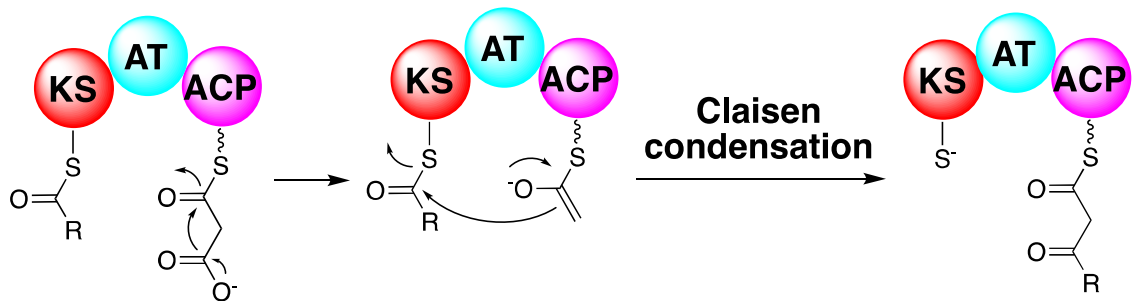


Figure 1-2. KS によるポリケトメチレン鎖の伸長反応

### 1.3 I 型 PKS

I 型 PKS とは、長大なポリペプチド鎖が形成する巨大な構造を持つ PKS である。I 型 PKS はそのポリペプチド鎖が部位ごとに単独の触媒活性を持つドメインを形成している。それらのドメインが多数連結し I 型 PKS を構成している。I 型 PKS による伸長反応は AT、ACP、KS ドメインが担い、その他のドメインはポリケタイド鎖の還元や脱水といった修飾を行う。I 型 PKS におけるドメインの集合の最小単位、即ち伸長基質を 1 つ利用して起きる伸長・修飾反応を担うドメインの集合は伸長モジュールと呼ばれる。また、伸長モジュールによるポリケタイド鎖合成の前後、伸長モジュールへの基質導入を担うモジュールと、合成されたポリケタイド鎖の放出を担う thioesterase (TE) ドメインはそれぞれローディングモジュール、終末ドメインと呼ばれる。

I 型 PKS には反復型とモジュール型が存在する。モジュール型の PKS は複数

のモジュールが連なった構造を有する。モジュール毎にポリケタイド鎖の伸長反応と修飾を行い、それが終わると次のモジュールへとポリケタイド鎖を受け渡し反応が進んでいく。**Figure 1-3** に代表的なモジュール型 PKS である 6-deoxyerythronolide B 合成酵素 (DEBS) の触媒する反応を示す (Staunton and Wilkinson, 1997)。ローディングモジュールの AT によって開始基質である propionyl-CoA の propionyl 基が ACP へと導入されると、モジュール 1 の KS 上に移動し KS によってモジュール 1 の ACP に結合した methylmalonyl-CoA と脱炭酸的に縮合する。生じたポリケタイド鎖は KR による還元を受け、モジュール 2 の KS へ移動する。このような反応を繰り返し、ポリケタイド鎖は伸長しながらモジュール 6 まで移動する。モジュールには KS、AT、ACP による基礎的な伸長反応のみを触媒するものもあれば、KR や DH 等のドメインによる修飾反応を行うものもある。モジュール 6 まで移動したポリケタイド鎖は、末端の TE ドメインにより切り離されると同時に環化されマクロライド環構造を持つ 6-deoxyerythronolide B を形成する。

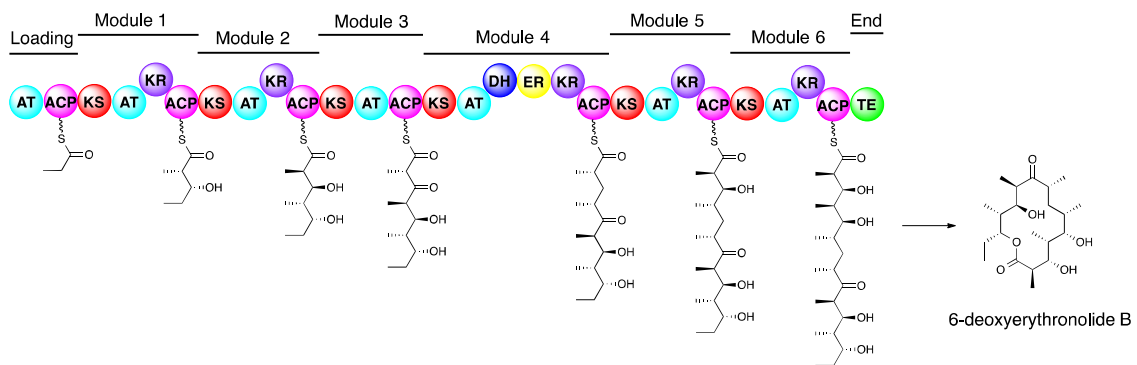


Figure 1-3. DEBS による 6-deoxyerythronolide の合成

一方、反復型の PKS はモジュール型と比較してより小さな構造を有し、少数のモジュール上で伸長反応が繰り返される。

#### 1.4 II 型 PKS

II 型 PKS はそれぞれ独立した遺伝子にコードされた KS、ACP、KR 等がサブユニットとして複合体を形成した PKS である。II 型 PKS の多くは一般に芳香環が連なった構造をとる化合物を生産し、それらの II 型 PKS 産物は芳香族ポリケタイドと呼ばれる。II 型 PKS ではポリケタイド鎖の伸長反応は KS と chain length factor (CLF) の 2 サブユニットのヘテロダイマーが触媒する。I 型、II 型の PKS では KS ドメインまたは KS-CLF ジドメインによるポリケタイド鎖の伸長反応の際、伸長基質の acyl-CoA から ACP へ acyl 基の転移が起きる必要がある。しかし、II 型 PKS は通常、自身の ACP への acyl 基転移を触媒する専用の AT を持たない。その代わりとして、脂肪酸合成酵素 (FAS) の malonyl-CoA:ACP

transacylase (MAT) が malonyl 基の転移反応を触媒する。また、KS、ACP、CLF の 3 つのサブユニットをポリケタイド骨格となるポリケトメチレン鎖の伸長反応に必須な最小単位としてミニマル PKS (min PKS) と呼ぶ。また、min PKS の ACP の中には malonyl-CoA の malonyl 基を自己触媒によって ACP 上へと転移する self-malonylation 活性を有するものもあることが報告されている (Matharu *et al.*, 1998; Hitchman *et al.*, 1998; Misra *et al.*, 2007)。

II 型 PKS の触媒する反応を代表的な II 型 PKS である actinorhodin 合成酵素 (*act* PKS) を例に説明する (**Figure 1-4**)。 *act* PKS では min PKS と MAT によってポリケトメチレン鎖伸長反応が行われる。始めに MAT によって開始基質である malonyl-CoA から ACP へと malonyl 基が転移し malonyl-ACP が生じる。ACP と結合した malonyl 基は脱炭酸され acetyl 基となるが、この反応は KS が触媒すると考えられている。その後 acetyl 基は KS-CLF の KS ドメインの活性中心に存在するシステイン残基に転移する。MAT によって合成された malonyl-ACP 上の malonyl 基と KS-CLF 上の acetyl 基は KS に触媒されて Claisen 縮合を行う。こうして ACP 上に形成されたジケタイドは再び KS へ転移し、ACP にロードされた malonyl 基と縮合する。この反応を複数回繰り返すことで、ポリケトメチレン鎖が形成される。I 型 PKS とは異なり、一般的な II 型 PKS のポリケタイド鎖合成において還元、脱水といった修飾反応は伸長反応が完了するまで起こらない。

min PKS による一連の反応で形成されたポリケトメチレン鎖は、KR や aromatase (ARO)、cyclase (CYC) 等の修飾酵素による修飾を受け、最終生産物となる。

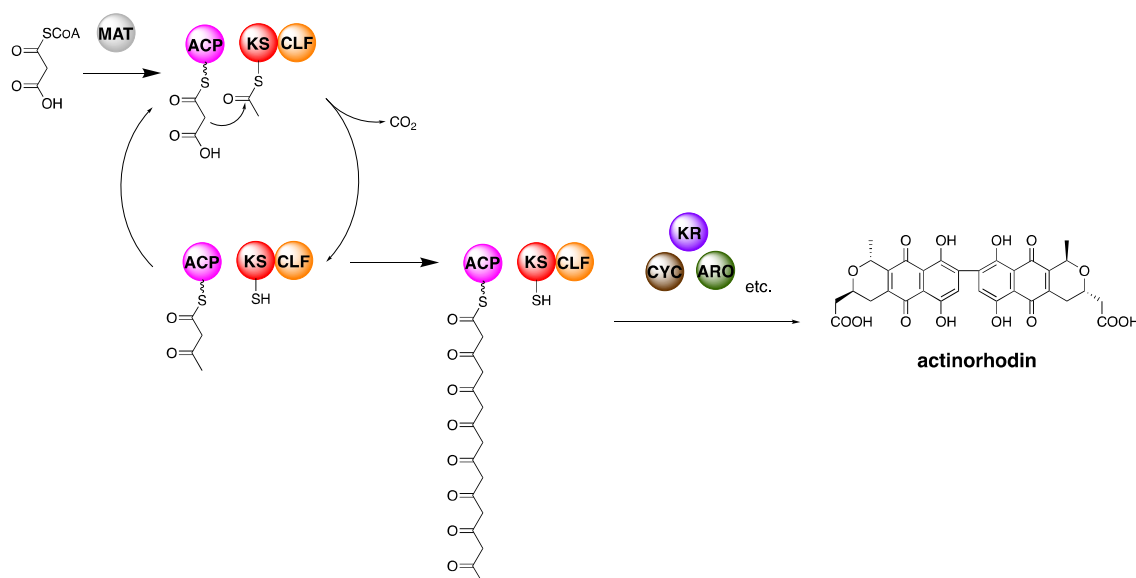


Figure 1-4. *act* PKS の反応模式図

#### 1.4.1 ポリエンを合成する II 型 PKS

ほとんどの II 型 PKS の min PKS は反復的な伸長反応を触媒しポリケトメチレン鎖を合成する。しかし、ポリケタイド鎖の還元、脱水を伴う伸長反応を触媒する II 型 PKS の報告例も存在する。*Streptomyces* sp. MSC090213JE08 より単離された ishigamide (Du *et al.*, 2016) はポリエン化合物である。しかし、ishigamide のポリエン部分の骨格は ishigamide 生合成遺伝子クラスター (*iga* クラスター) にコードされた II 型 PKS の KS-CLF ホモログである Iga11-Iga12 によって合成され

る。Iga11-Iga12 の触媒する伸長反応では、合成されたポリケタイド鎖が 1 回の伸長反応毎に Iga13 (KR) による還元と Iga16 (DH) による脱水化を受ける脂肪酸生合成に似た機構によってポリエンが生合成される (Du *et al.*, 2018)。

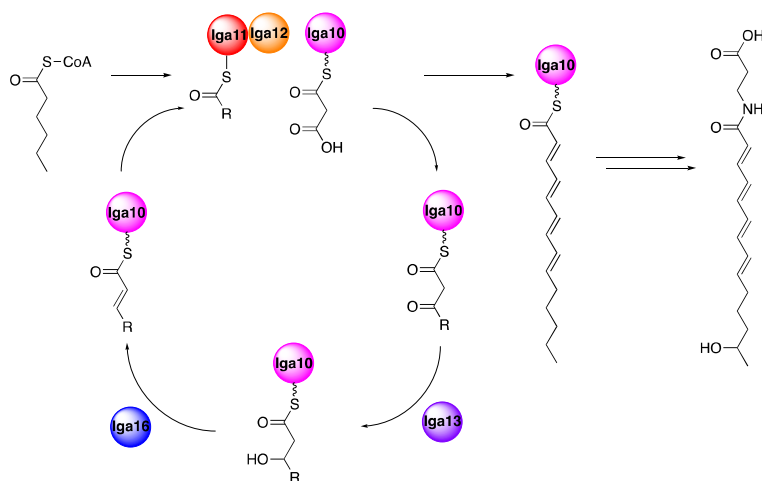


Figure 1-5. ishigamide の生合成機構

## 1.5 III 型 PKS

III 型 PKS は KS のホモダイマーのみで構成された PKS である。III 型 PKS のモノマーは約 40kDa であり、それぞれ一つずつ活性中心を持つ。I 型、II 型 PKS の KS の catalytic triad が Cys-His-His であるのに対し、III 型 PKS の活性中心には Cys-His-Asn の 3 残基で構成される catalytic triad が存在する。

III 型 PKS の触媒する反応について、もっとも代表的な III 型 PKS である chalcone 合成酵素 (CHS) を例に挙げて説明する (Figure 1-6)。まず、開始基質である *p*-coumaroyl-CoA の *p*-coumaroyl 基が活性中心の Cys に受け渡される。



次に、伸長鎖基質の malonyl-CoA が脱炭酸することでアニオンとなり、KS に保持された acyl 基と求核的に反応する。以上の伸長反応を繰り返し、CHS は *p*-coumaroyl-CoA に 3 分子の malonyl-CoA を縮合させ、中間体であるテトラケタイドを合成する。CHS は更にテトラケタイドを Claisen 縮合によって環化し、その結果生じた環状トリケタイドを芳香化することで naringenin chalcone を合成する。

このように III 型 PKS は ACP を利用することなく開始基質と malonyl-CoA 等の伸長鎖基質との脱炭酸を伴う縮合反応を触媒する。また、III 型 PKS は伸長反応によって生成したポリケトメチレン鎖を Claisen 縮合、aldol 縮合、ラクトン形成のいずれかの様式で環化する。

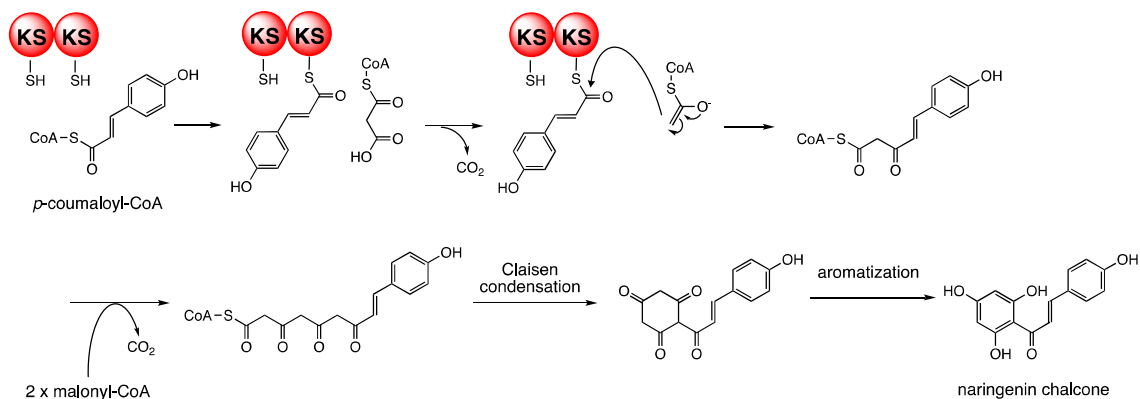
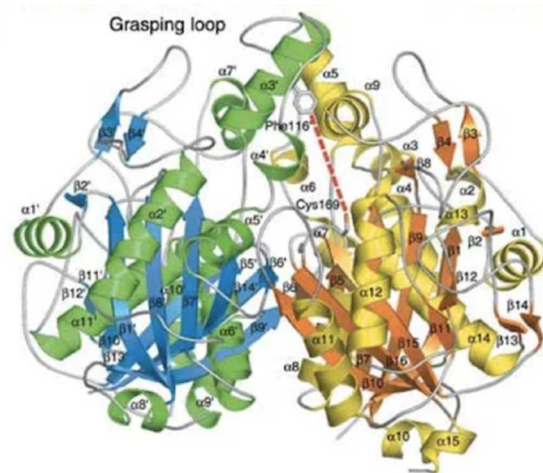


Figure 1-6. CHS による naringenin chalcone 合成反応

## 1.6 II 型 PKS の結晶構造

II 型 PKS はそれぞれ約 40kDa の KS と CLF で構成されたヘテロダイマーである。Figure 1-7 に代表的な II 型 PKS である actinorhodin 合成酵素の KS-CLF (*act* KS-CLF) の結晶構造を示す (Keatinge-Clay *et al.*, 2004)。*act* KS-CLF は thiolase superfamily に属し、同 superfamily に共通して見られる  $\alpha\beta\alpha\beta\alpha$  構造をとる。KS には活性中心を構成するシステイン残基 (Cys169) が存在し、ポリケトメチレン鎖の伸長反応を触媒する。伸長反応中ポリケトメチレン鎖は KS と CLF の間の図中に赤い点線で示された cavity に収納される。CLF では Cys169 に該当する残基がグルタミン残基 (Gln161) となっている。また、CLF では KS の活性中心付近に存在する基質ポケットがない。これらの知見から、CLF はポリケトメチレン鎖の伸長反応は触媒せず、ポリケトメチレン鎖の鎖長決定に関与すると考えられている (Christian Hertweck *et al.*, 2007)。



**Figure 1-7. *act* KS-CLF の結晶構造** (Keatinge-Clay *et al.*, 2004 より引用)

KS を黄およびオレンジ色、CLF を青および緑色で示す。KS 活性中心の基質ポケットは KS の Cys169 と CLF の Phe116 との間の赤い点線によって示す。

## 1.7 actinorhodin

放線菌は土壌中または水中に生息するグラム陽性細菌である。細胞が菌糸を形成し、糸状菌のような形態となるものが多いことが命名の由来となっており、DNA の GC 含量が高い、多くの種が二次代謝産物として抗生物質を生産するといった特徴を持つ。

その大部分は *Streptomyces* 属に分類されており、この属の *Streptomyces*



れる (Taguchi *et al.*, 2017)。さらに、ActVI-1、ActVI-2 により 2 度に渡って還元され 6-deoxy-dihydrokalafungin が形成される。この後、6 位と 8 位が ActVA-5/ActVB によって 2 つの水酸基で置換され actinorhodin のモノマーである tetrahydronaphthalene 体 (THN) が形成される (Hashimoto *et al.*, 2019)このとき、actVA の 2 つの ORF にコードされた ActVA-5,6 が活性を示さない場合 actinoperylone が形成することが分っている (Taguchi *et al.*, 2008)。生合成経路の最終段階で、ActVA-4 によって THN がホモダイマーとなり actinorhodin が合成されると考えられている (Taguchi *et al.*, 2013)。この dimerase による反応を停止させた場合、tetrahydrokalafungin へと可逆的に変化することが市瀬博士らによって発見された (Taguchi *et al.*, 2012)。

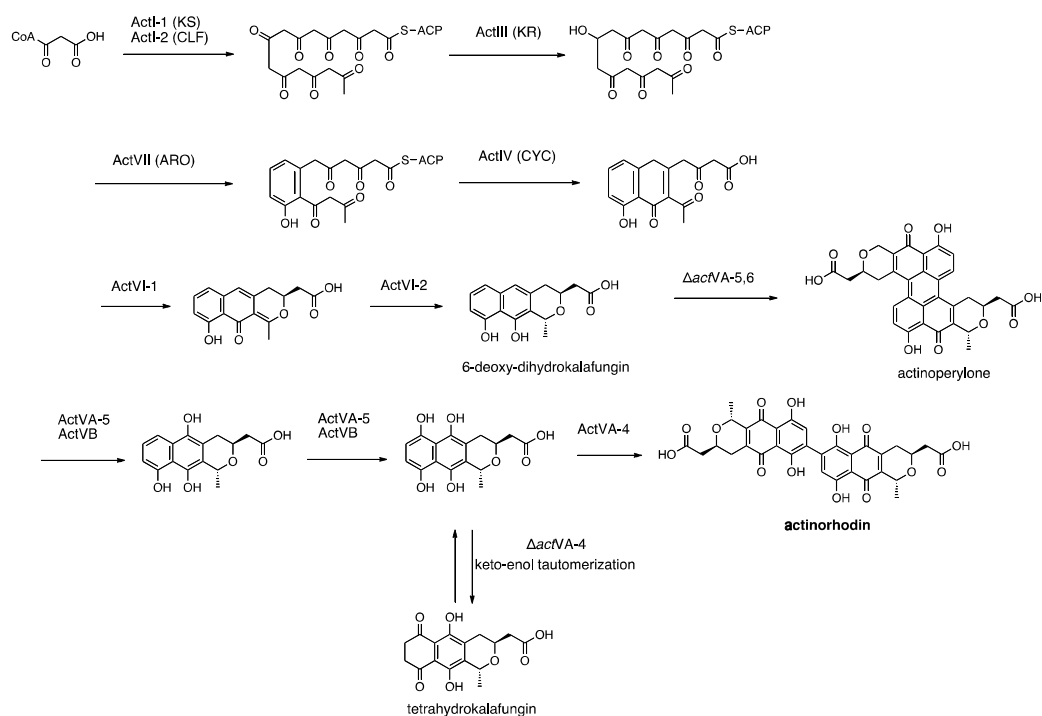


Figure 1-9. actinorhodin 生合成経路

## 1.9 II 型 PKS の開始基質

II 型 PKS がポリケトメチレン鎖の伸長反応を触媒する際、一般的に開始基質には酢酸が利用される。酢酸を開始基質とする場合、その導入は min PKS と MAT のみによって触媒される (Hertweck *et al.*, 2007)。この場合まず、MAT によって malonyl-CoA から ACP へと malonyl 基が転移し malonyl-ACP が合成される。合成された malonyl-ACP は脱炭酸され、acetyl-ACP となる。この酢酸 (acetyl 基) は開始基質として KS に受け渡され、後に続く伸長反応に利用される。

初期の研究では malonyl-ACP の脱炭酸は CLF の Gln161 が触媒すると考えら

れていた (Bisang *et al.*, 1999)。しかし、Gln161 を Ala 残基に置き換えても脱炭酸が起きる (Dreier and Khosla, 2000) ことや、actinorhodin 合成酵素の KS-CLF の結晶構造から CLF には基質ポケットがないことが明らかになった (Keatinge-Clay *et al.*, 2004) ことから、現在では KS が malonyl-ACP の脱炭酸反応を触媒すると考えられている。しかしながら、この脱炭酸反応の正確な機構は明らかになっていない。

II 型 PKS の開始基質としては多くの場合酢酸が利用されるが、一方で propionate、isobutyrate などの短鎖脂肪酸や malonamate、そして benzoic acid が開始基質として利用される例も報告されている。そのような場合は独自の開始基質供給システムを持っている。以降に酢酸以外の開始基質を利用する II 型 PKS を例示する。

### 1.9.1 R1128 合成酵素における短鎖脂肪酸の導入

*Streptomyces* sp.R1128 より単離された芳香族ポリケタイド R1128 の生合成経路ではポリケトメチレン鎖伸長反応の開始基質として propionate や isobutyrate などの短鎖脂肪酸が利用される (Marti *et al.*, 2000)。これらの短鎖脂肪酸を開始基質として利用する場合、ketoacylsynthase III ホモログ (KSIII)、acyl-ACP thioesterase (AATE)、ACP から構成される酵素群 (initiation module) が必要となる。Initiation module はこれまで複数の II 型 PKS で見出され、R1128 合成酵素で最も詳細な解

析がなされている (Marti *et al.*, 2000; Meadows and Khosla, 2001; Tang *et al.*, 2003; Tang *et al.*, 2004)。

R1128 合成酵素の initiation module の KSIII、AATE、ACP はそれぞれ ZhuH、ZhuC、ZhuG と呼ばれる (**Figure 1-10**) (Marti *et al.*, 2000)。R1128 生合成経路では、まず MAT によって ZhuG へと malonyl 基が転移し malonyl-ZhuG が合成される。次に、propionyl-CoA や isovaleryl-CoA などの acyl-CoA が ZhuH によって malonyl-ZhuG と縮合する。生じた  $\beta$ -ketoacyl-ZhuG は FAS の KR、DH、ER によって還元され、より長鎖の acyl-ZhuG となる。ZhuG に結合した acyl 基が min PKS (ZhuA、ZhuB、ZhuN) へと受け渡され、伸長反応が開始する (Meadows and Khosla, 2001)。Initiation module と min PKS の ACP (ZhuG、ZhuN) はそれぞれの反応に選択的に関与するため、交換は不可能である (Tang *et al.*, 2003)。ZhuC は thioesterase 活性を有しており、acetyl 基や propionyl 基など本来の基質と異なる acyl 基が KS-CLF と結合した場合、これを切り離すことが確認されている (Tang *et al.*, 2004)。このことから、ZhuC は本来の基質ではない acyl 基が KS-CLF に導入された場合これを除き開始基質の選択性を向上させると考えられている。

R1128 と同様の機構により開始基質として短鎖脂肪酸を利用する化合物として frenolicin、alnumycin、benastatin、fredericamycin などが挙げられる (Hertweck *et al.*, 2007; Oja *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2010)。



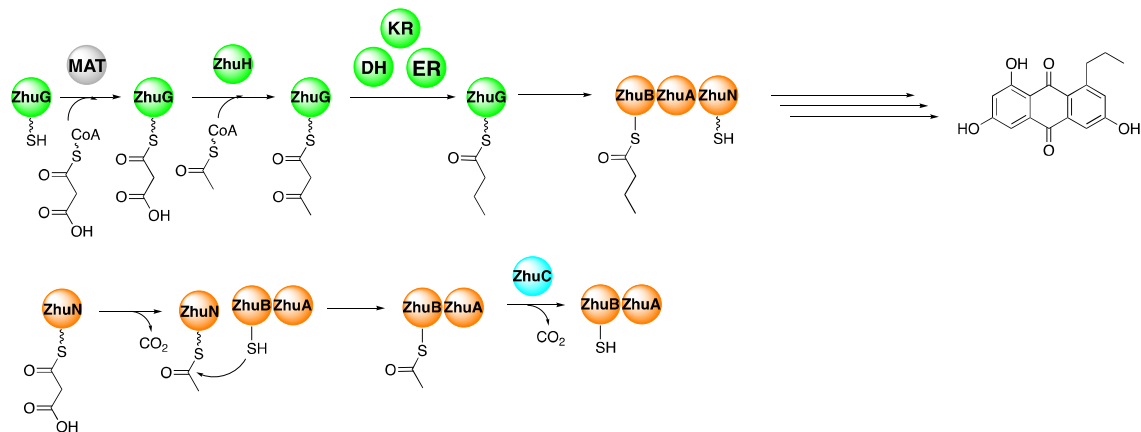


Figure 1-10. R1128 合成酵素の initiation module が触媒する反応

initiation module を緑色、min PKS を橙色、MAT を灰色、ZhuC を水色で示した。A, initiation module による伸長反応への短鎖脂肪酸の導入; B, ZhuC による acetyl 基の排除

### 1.9.2 daunorubicin 合成酵素における propionate の導入

*Streptomyces peucetius* や *Streptomyces* sp. C5 がもつ daunorubicin 合成酵素は propionate を開始基質として利用する II 型 PKS である。Daunorubicin 生合成遺伝子クラスターは ZhuH ホモログ (DpsC) と ZhuC ホモログ (DpsD) をコードした遺伝子が含まれるが、ZhuG ホモログは存在しない (Grimm *et al.*, 1994)。また、DpsC は ZhuH と異なり活性中心の Cys 残基が Ser 残基に置換されている。このように DpsC、DpsD は R1128 合成酵素の initiation module とは異なる特徴を有しており、様々な解析の結果から daunorubicin 生合成では R1128 合成酵素とは異なる機構によって開始基質の導入が行われると考えられている (Rajgarhia. *et al.*,

2001)。 *In vitro* 実験により DpsC には propionyl-CoA と malonyl-ACP の縮合反応ならびに propionyl-CoA から ACP への propionyl 基の転移反応を触媒する 2 つの活性があることが明らかになった。このため、当初 DpsC は 2 つの活性のいずれかによって propionyl 基を導入すると考えられていた (Bao *et al.*, 1999)。しかし、異種発現実験において DpsC 非存在下でも propionate を開始基質とするポリケタイドが生産されたことから DpsC は開始基質導入において決定的な役割を担っている訳ではないと考えられている (Figure 1-11) (Rajgarhia. *et al.*, 2001)。現在では propionate の導入は別の酵素によって触媒され、DpsC は min PKS への開始基質導入の正確性を向上させる”忠誠因子”として機能すると予想されている (Rajgarhia. *et al.*, 2001)。現在も propionyl 基を導入する機構や DpsC が fidelity factor として作用する機構は解明されていない。また上記の異種発現実験において DpsD の有無が生成物に影響しなかったことから、DpsD の機能は不明である。

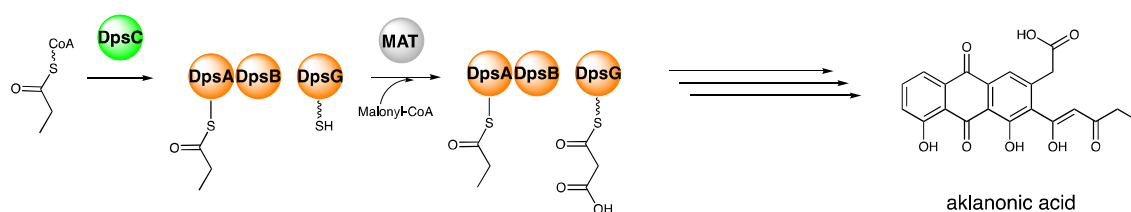
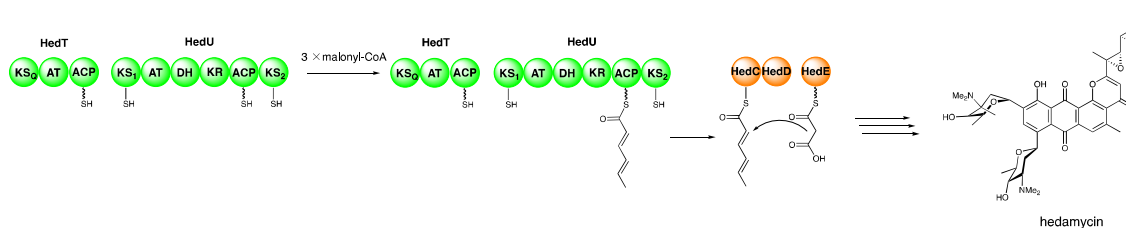


Figure 1-11. daunorubicin 合成酵素における開始基質導入

DpsC を緑色、min PKS を橙色、MAT を灰色で示した。DpsC 存在下では propionate を開始基質とする aklanonic acid のみが生産される。DpsC 非存在下では aklanonic acid に加え酢酸を開始基質とする desmethylaklanonic acid も生産される。

### 1.9.3 hedamycin 合成酵素における 2,4-hexadienate の導入

*Streptomyces griseoruber* が生産する hedamycin は 2,4-hexadienate を開始基質として合成される芳香族ポリケタイドである。Hedamycin 生合成遺伝子クラスターは min PKS を構成する HedCD (KS-CLF)、HedE (ACP) や ZhuH ホモログ (HedS)、ZhuC ホモログ (HedF) といった II 型 PKS の initiation module に加え、I 型 PKS (HedT、HedU) をコードした遺伝子が含まれている。HedS は DpsC と同様に活性中心の Cys 残基が Ser 残基に置換されている。遺伝子破壊実験により開始基質として 2,4-hexadienate を利用するには HedT が不可欠であることが明らかになったことから、HedT、HedU の 2 つの I 型 PKS によって合成された 2,4-hexadienyl-ACP が開始基質として min PKS に導入され、伸長反応に利用されるというモデルが提唱されている (**Figure 1-12**) (Bililign *et al.* , 2004)。その後、*in vitro* 実験によって HedS、HedF の有無に関わらず HedU の ACP から HedCD への基質の受け渡しが起きることが明らかになり (Das and Khosla, 2009)、HedS、HedF は 2,4-hexadienate の受け渡しには不要であると考えられている。また、HedU の ACP ドメインと HedE の機能は独立しており、交換は不可能である。



**Figure 1-12. Hedamycin 合成酵素における 2,4-hexadienate の導入**

I 型 PKS (HedT、HedU) を緑色、min PKS (HedCDE) を橙色で示した。

#### 1.9.4 oxytetracycline 合成酵素における malonamate の導入

oxytetracycline は *Streptomyces rimosus* から単離された抗生物質である。その合成には ATP 依存型 amidotransferase (OxyD) によって合成される malonamate が開始基質として利用される (**Figure 1-13**) (Zhang *et al.*, 2006)。しかしながら、min PKS (OxyABC) が触媒する伸長反応に malonamate が導入される機構は未だ解明されていない。この開始基質導入には ZhuC ホモログ OxyP が関与すると考えられている (Wang *et al.*, 2011)。しかしながら、*oxyP* 遺伝子を失活化させても oxytetracycline の生産がなくなることはない。一方で、*oxyP* の失活化により malonamate ではなく acetyl 基を開始基質とする 2-acetyl-2-decarboxyamido-oxytetracycline の生産量が増大することから、OxyP は acetyl-ACP から acetyl 基を除去することで malonamate 導入を補助すると考えられている。また、異種発現実験において、*oxyD*、*oxyP* を共発現させた場合のみ malonamate が導入された化合物の生産量が増加することが報告されている (Lešnik *et al.*, 2015)。

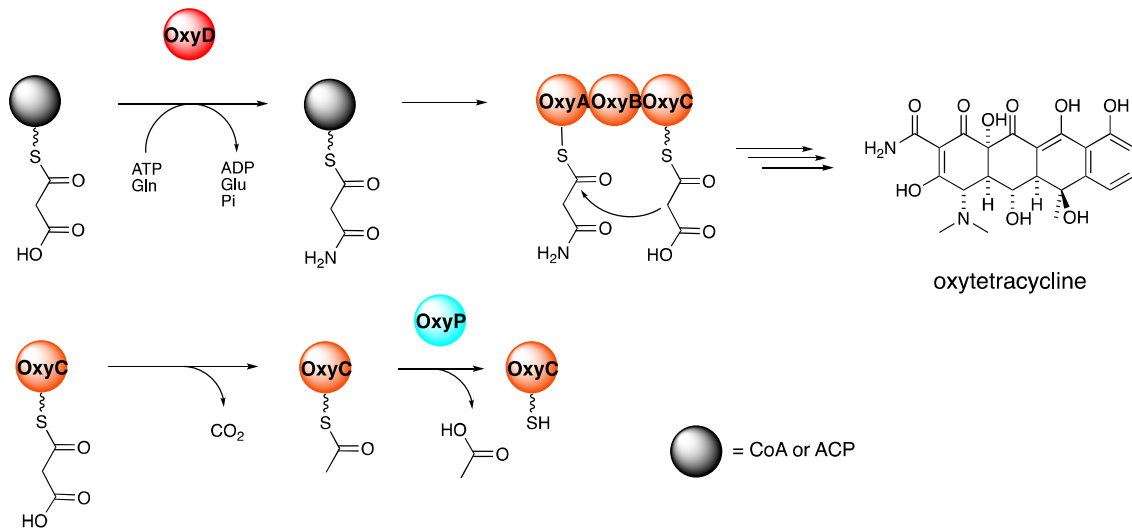


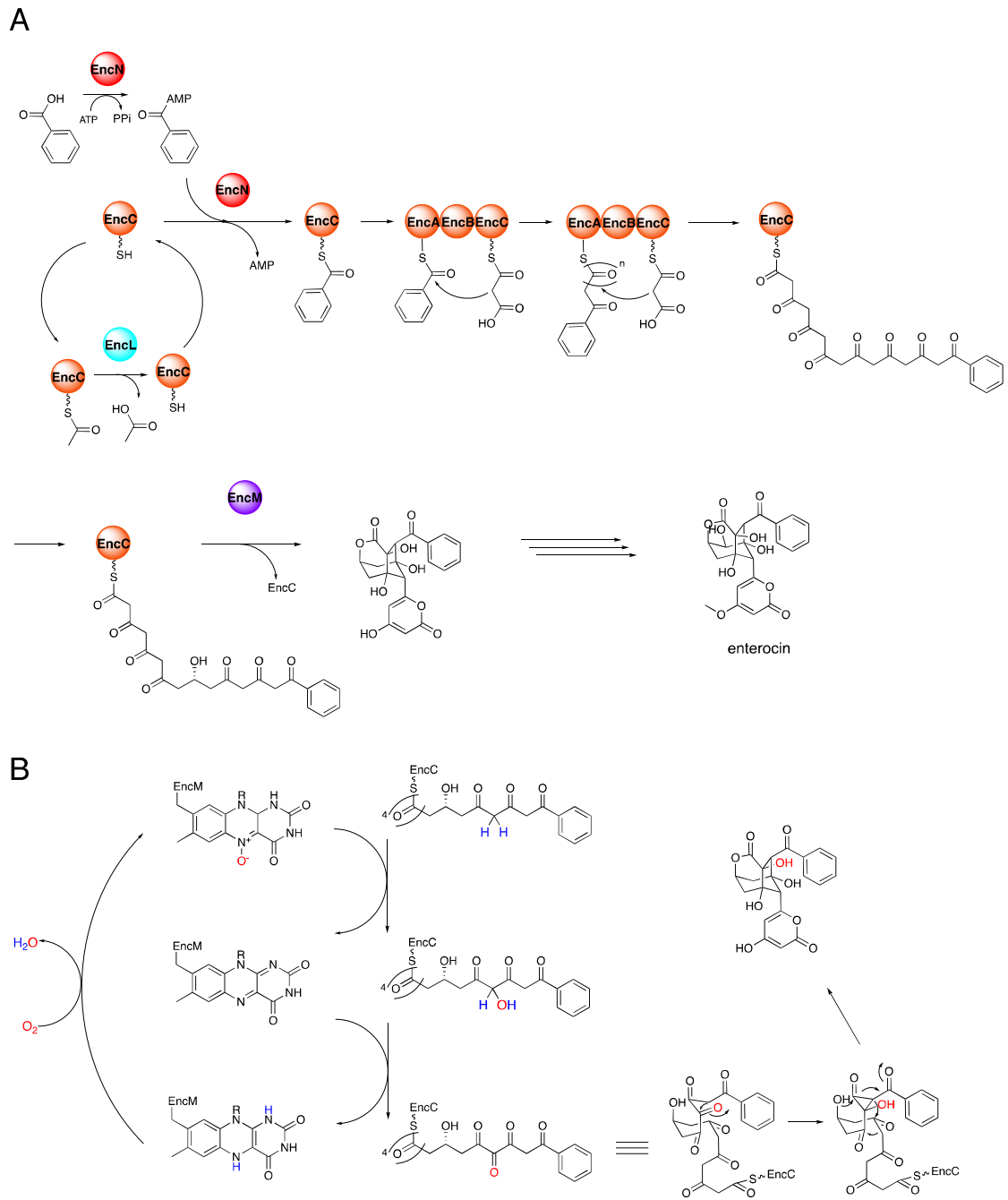
Figure 1-13. Oxytetracycline 合成酵素における malonamate の導入

min PKS (OxyABC) を橙色、ZhuC ホモログ (OxyP) を水色、amidotransferase (OxyD) を赤色で示した。

### 1.9.5 enterocin 合成酵素における benzoate の導入

*Streptomyces maritimus* から単離された enterocin は多くの芳香族ポリケタイドとは異なる構造を持つ II 型 PKS 生産物である。enterocin 生合成では開始基質として benzoate が利用される (Figure 1-14)。benzoate は ATP 依存的な benzoate:ACP ligase (EncN) によって carboxyl 基に AMP が結合し、benzoyl-AMP が形成される。さらに EncN は benzoyl-AMP の benzoyl 基を min PKS の ACP (EncC) に転移し benzoyl-ACP を形成する。この benzoyl 基は EncC から KS-CLF (EncAB) に移動しポリケトメチレン鎖の伸長反応が起きる (Cheng *et al.*, 2007)。また、酢酸が開始基質として EncC に導入された場合、ZhuC ホモログの type II thioesterase

(EncL) が acetyl 基を加水分解によって脱離する(Kalaitzis *et al.*, 2011)。これにより enterocin 生合成の開始基質として benzoate が選択的に導入されると考えられている。EncAB による伸長反応後、合成されたポリケタイド鎖が修飾される過程において flavin 依存型 favorskiiase (EncM) の触媒する favorskii 転位により炭素骨格の組み換えが起き (Xiang *et al.*, 2004)、enterocin 骨格が形成される。EncM に結合した flavin は 5 位の窒素原子に酸素原子が結合した構造をとることが報告されている(Teufel *et al.*, 2015)。EncM が favorskii 転位を触媒する際、その酸素原子がポリケタイド鎖に結合し反応が進行すると提唱されている。



**Figure1-14. Enterocin 生合成経路**

A, enterocin 生合成経路の概略図。min PKS (EncABC) を橙色、AMP ligase (EncN) を赤色、thioesterase (EncL) を水色、favolskiiase (EncM) を紫色で示した。; B, EncM の触媒する favolskii 転移と EncM に結合した flavin の状態。

### 1.9.6 trioxacarcin 生合成経路で提唱された分枝炭素鎖導入

*Streptomyces bottropensis* DO-45 から単離された trioxacarcin は入り組んだ複環構造を有する芳香族ポリケタイドであり、抗細菌、抗腫瘍を有している (Fujimoto and Morimoto, 1983)。同位体標識実験の結果から、trioxacarcin は特殊な開始基質を利用して生合成される可能性が提唱された (Zhang *et al.*, 2015)。開始基質導入についての詳細な解析例は未だ報告されていないが、L-ロイシンを基に合成された分枝炭素鎖が KS-CLF である TxnA1-TxnA2 の触媒する伸長反応に導入されると提唱されている (Figure 1-15)。

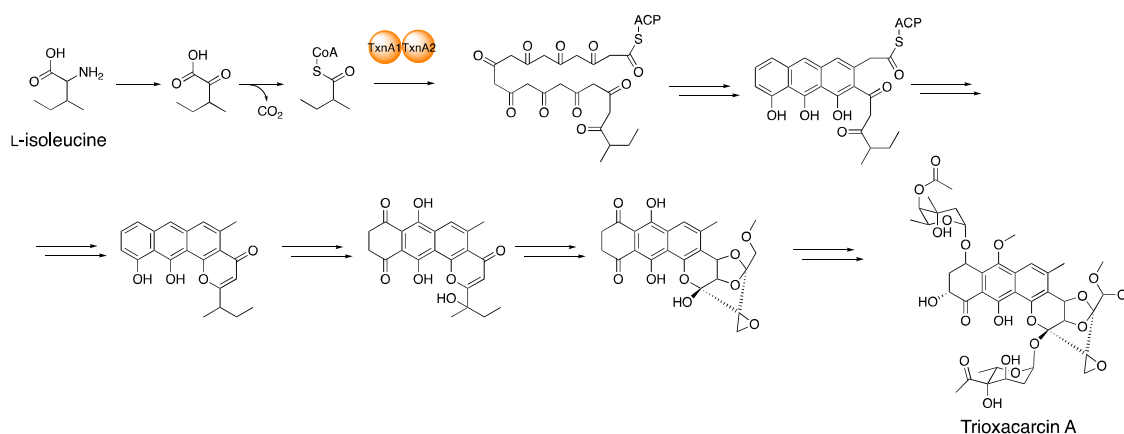


Figure 1-15 提唱されている trioxacarcin 生合成経路



## 1.10 ポリケトメチレン鎖の $\beta$ -アルキル化

一般的に、2つのカルボニル基挟まれたポリケトメチレン鎖の  $\alpha$  位は求核性であり、容易にメチル化される。 $\alpha$  位のメチル化は、*S*-adenosylmethionine (SAM) を補因子として、methyltransferase (MT) により触媒される (Calderone, 2008)。また、methylmalonyl-CoA や ethylmalonyl-CoA などを伸長鎖基質とする伸長反応によっても、 $\alpha$  位がアルキル化されたポリケトメチレン鎖が形成される。

一方で、ポリケトメチレン鎖の  $\beta$  位は求電子性が強いため、 $\beta$ -アルキル化には求核的なアルキル基が必要となる。ポリケタイドの  $\beta$ -アルキル化反応は HCS cassette と呼ばれる遺伝子群にコードされた酵素のグループ、あるいは branching ドメインと呼ばれる I 型 PKS のドメインによって触媒される (Hertweck, 2009)。これらの反応では、ポリケトメチレン鎖は malonyl-ACP が脱炭酸されて生じた acetyl-ACP の求核攻撃によって  $\beta$ -アルキル化される。

### 1.10.1 HCS cassette

HCS cassette は遺伝子のグループ (cassette) であり、それぞれの遺伝子にコードされた酵素のグループがポリケタイド鎖の  $\beta$ -アルキル化を触媒する。HCS cassette と協働する I 型 PKS である bacillaene 合成酵素遺伝子クラスター (*pks* クラスター) を例に説明する (Figure 1-16) (Butcher *et al.*, 2007)。*pks* クラスターと

協働する HCS cassette には KS (PksF)、AT (PksC)、ACP (AcpK)、hydroxy-methyl-glutaryl-CoA 合成酵素ホモログ (HMG-CoA synthase homologue、HCS) (PksG)、2 つの enoyl-CoA hydratase ホモログ ECH1、ECH2 (PksH、PksI) がコードされている。まず、AT が malonyl-CoA から ACP への malonyl 基の転移を触媒し、malonyl-ACP を形成する。malonyl-ACP は KS によって脱炭酸され、acetyl-ACP が生じる。この acetyl-ACP は HCS の触媒作用により伸長中のポリケタイド鎖の  $\beta$  位に対して求核攻撃を行い (Theisen *et al.*, 2004)、alkylhydroxyglutaryl-ACP を生じる。ECH1 はヒドロキシル基の脱水、ECH2 は脱炭酸を触媒し、その結果  $\beta$  位のケト基がメチル基に変換されたポリケトメチレン鎖が生じる。

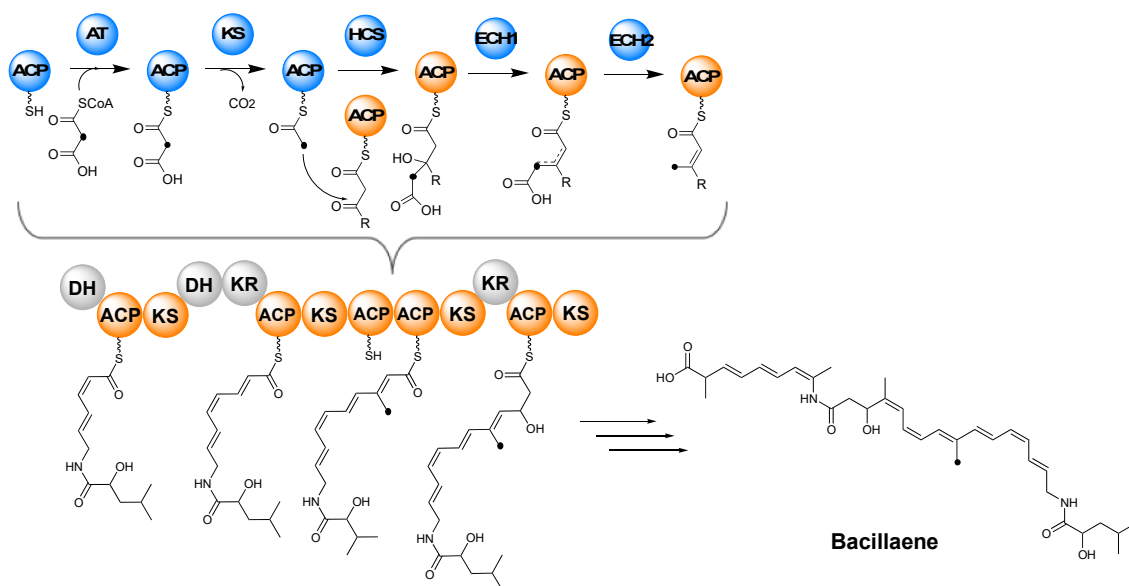


Figure 1-16. HCS cassette によるポリケタイド鎖の修飾

HCS cassette にコードされた酵素を水色、PKS の KS、ACP を橙色、修飾酵素を灰色で示し

た。

### 1.10.2 branching ドメイン

クモノスカビの内共生細菌 *Burkholderia rhizoxinica* の生産する抗有糸分裂剤 rhizoxin は I 型 PKS によって生合成されるポリケタイドであり、その構造内にラクトン環を有している (Iwasaki *et al.* 1984; Scherlach *et al.*, 2006)。このラクトン環は I 型 PKS によるポリケタイド鎖合成の途中  $\beta$ -アルキル化反応によって合成されると考えられている (Partida-Martinez and Hertweck, 2007)。しかし、Rhizoxin 生合成遺伝子クラスターには HCS cassette をコードした遺伝子は存在しない。rhizoxin の生合成における  $\beta$ -アルキル化は branching ドメイン (B ドメイン) によって触媒される (**Figure 17A**) (Bretschneider *et al.*, 2013)。B ドメインの作用により隣接する ACP に結合した malonyl 基は脱炭酸を伴いながら KS に結合したポリケタイド鎖の  $\beta$ -位に対して Michael 付加反応をする (**Figure 1-17B**)。これにより  $\beta$ -アルキル化されたポリケタイド鎖は次のモジュールへ受け渡され、伸長反応を続ける。

B ドメインホモログによる  $\beta$ -アルキル化は isomigrastatin や cycloheximide などの glutarimide 構造を含有するポリケタイド (**Figure 1-17C**) の生合成にも関与すると考えられている (Heine *et al.*, 2014)。

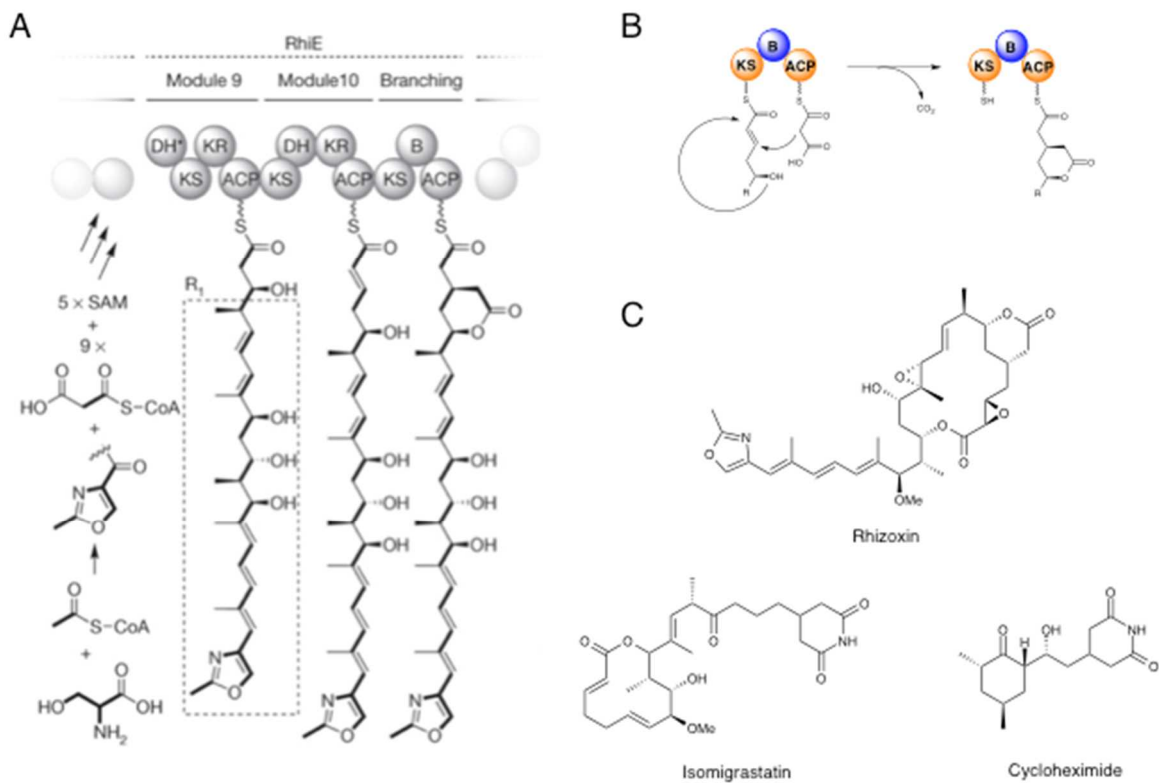


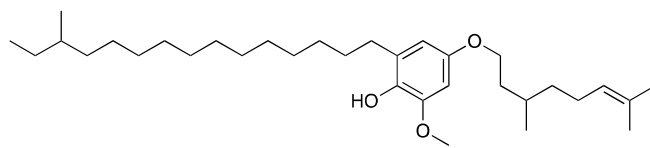
Figure 1-17. B ドメインによる反応とその生産物

A, Rhizoxin 生合成においてポリケタイド鎖は B ドメインによる  $\beta$ -アルキル化を受ける (Bretschneider *et al.*, 2013 より引用); B, B ドメインは malonyl-ACP の脱炭酸を伴う Michael 付加による  $\beta$ -アルキル化を触媒する; C, B ドメインが生合成に関与する代表的な化合物。

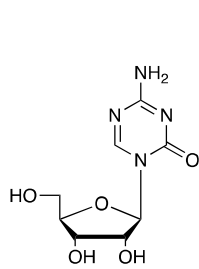
### 1.11 希少放線菌 *Actinoplanes missouriensis*

自然界から分離される放線菌の 90% 以上は *Streptomyces* 属に分類されるが、そこに属さない比較的分離頻度の低い放線菌を希少放線菌と言う。希少放線菌 *Actinoplanes* 属の標準的な株である *Actinoplanes missouriensis* 431 株 (NBRC 102363) は気中菌糸を形成しない。また、菌糸を分化させ遊走胞子を形成するといった *Streptomyces* 属とは大きく異なる形質を有する。

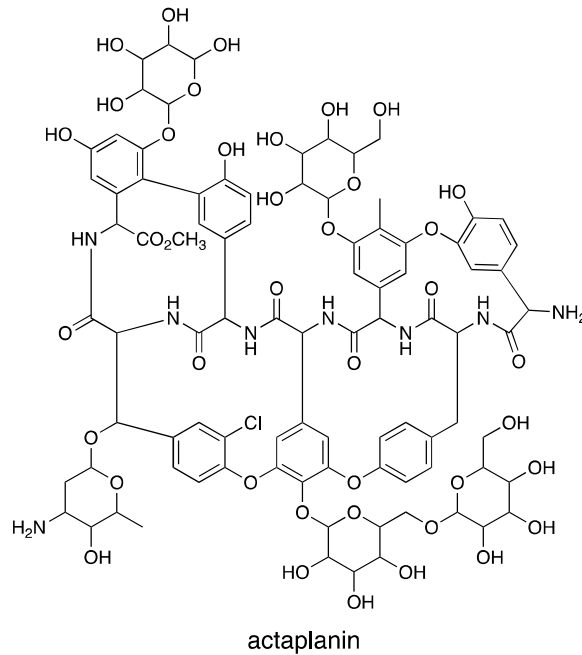
*A. missouriensis* 431 株は独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE) によって全ゲノム配列が解読された。これまでに類縁株からはグリコペプチド系抗生物質である actaplanin (Debono *et al.* 1984) や DNA メチル化阻害剤である 5-azacytidine (Toyo *et al.* 1978) などの特徴的な二次代謝産物が単離されていることから、本株も珍しい構造を持つ二次代謝産物の生合成遺伝子を持つことが期待される。解読されたゲノム情報から醗酵学研究室の淡川博士によって alkyl-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinone の生合成遺伝子クラスターである *agq* クラスターが発見され、解析が行われた (Awakawa *et al.*, 2011)。



alkyl-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinone



5-aza-cytidine



actaplanin

Figure 1-18. *A. missouriensis* から単離された二次代謝産物の構造

### 1.12 *A. missouriensis* が持つ II 型 PKS 遺伝子

本研究の前任者である所属研究室の横田康介氏による *in silico* 解析の結果、*A. missouriensis* は 2 つの *act* KS-CLF ホモログ (*AMIS50430-50420*、*AMIS50640-50650*) を有することが明らかになった。また、その近傍には芳香族ポリケタイドの修飾に関与することが予想される遺伝子が数多く存在した (Table. 1-2、Figure 1-19)。このことから *A. missouriensis* は II 型 PKS を有することが予想され

る。さらに、*AMIS50430* の近傍には HCS cassette が存在し、II 型 PKS をコードする遺伝子とクラスターを形成している可能性が示唆された。HCS cassette と II 型 PKS が同一のクラスター内に存在する例はそれまで報告されていなかった。*AMIS50340* から *AMIS50450* までの *AMIS50430* (KS) と HCS cassette を含む遺伝子クラスターは横田氏によって *mip* (*Actinoplanes missouriensis* polyketide synthase) クラスターと命名された (**Table 1-3**)。しかしながら、この II 型 PKS 遺伝子クラスターが芳香族ポリケタイド fogacin の生合成遺伝子クラスターであることが本研究を進める過程で判明したため、本論文中において *mip* クラスターを含むこの II 型 PKS 遺伝子クラスター (**Figure 1-19**) を *fog* クラスターと改めて命名した。

**Table 1-2. *A. missouriensis* ゲノム配列から見出された KS ホモログと近傍の遺**

**伝子**

min PKS を橙色、ポリケタイドの修飾酵素遺伝子を紫色、糖の生合成や転移を触媒する酵素を桃色、転写制御因子を赤色、HCS cassette を水色、min PKS 以外の KS、ACP を緑色、その他の遺伝子を黒色で示した。*fog* クラスタと命名した後の各遺伝子名は **Table 2-6** に記述した。

Gene	Size (bp)	Annotation	Gene	Size (bp)	Annotation
50280	551	TetR-family transcriptional regulator	50530	908	hymerythrin HHE cation binding domain-containing protein
50290	1349	MFS transporter	50540	1205	acyltransferase
50300	497	hypothetical protein	50550	1196	cytochrome P450
50310	1925	RHS repeat family Laminin G domain	50560	1190	glycosyl transferase
50320	482	hypothetical protein	50570	1157	carboxylesterase
50330	767	luciferase-like monooxygenase	50580	1355	NDP-deoxyglucose-2,3-dehydratase
50340	398	hypothetical protein	50590	1121	aminotransferase
50350	1778	beta-ketoacyl synthase	50600	806	methyltransferase
50360	773	enoyl-CoA hydratase/ isomerase	50610	590	dTDP-4-dehydrorhamnose-3,5-epimerase
50370	737	enoyl-CoA hydratase/ isomerase	50620	995	NAD-dependent epimerase/dehydratase
50380	1220	HMG-CoA synthase	50630	1130	glycosyl transferase
50390	242	ACP	50640	1262	beta-ketoacyl synthase beta subunit
50400	944	hypothetical protein	50650	1196	beta-ketoacyl synthase alpha subunit
50410	284	ACP	50660	971	polyketide cyclase/dehydrase
50420	1208	beta-ketoacyl synthase beta subunit	50670	1187	carboxyesterase
50430	1265	beta-ketoacyl synthase alpha subunit	50680	779	short chain dehydrogenase
50440	233	ACP	50690	1727	ABC transporter ATPase and permease protein
50450	1121	3-oxoacyl-ACP synthase III	50700	995	dDTP-glucose-4,6-dehydratase
50460	737	short chain dehydrogenase	50710	887	glucose-1-phosphate thymidyltransferase
50470	1043	luciferase-like monooxygenase	50720	584	NADPH-dependent FMN reductase
50480	512	hymerythrin HHE cation binding domain-containing protein	50730	848	alpha/beta hydrolase
50490	1142	oxidoreductase	50740	1499	gluconate permease
50500	848	SARP-family transcriptional activator	50750	602	TetR-family transcriptional regulator
50510	920	polyketide cyclase	50760	1511	MFS transporter



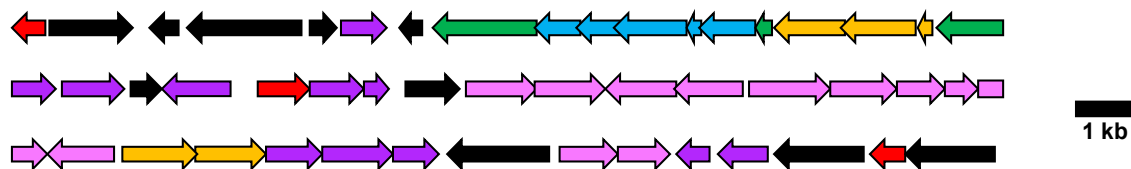


Figure 1-19. AMIS50430、AMIS50540 周辺の遺伝子構成

min PKS 遺伝子を橙色、修飾酵素遺伝子を紫色、糖の生合成や転移を触媒する酵素の遺伝子を桃色、転写制御因子を赤色、HCS cassette を水色、min PKS 以外の KS、ACP を緑色、機能未知を黒色で示した。

Table 1-3. *mip* クラスター

min PKS を橙色、HCS cassette を水色、min PKS 以外の KS、ACP を緑色、機能未知を黒色で示した。各遺伝子の *mip* クラスターと *fog* クラスターにおける名称の対応は Table 2-6 に記述した。

Gene	Name	Size (bp)	Annotation	Cloest relative	Organism	Identity %
50340	<i>mipL</i>	398	hypothetical protein	<i>salbJ_18723</i>	<i>Streptomyces albus</i>	41%
50350	<i>mipK</i>	1778	beta-ketoacyl synthase	<i>virA</i>	<i>Streptomyces virginiae</i>	44%
50360	<i>mipJ</i>	773	enoyl-CoA hydratase/ isomerase	<i>snaK</i>	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>	44%
50370	<i>mipI</i>	737	enoyl-CoA hydratase/ isomerase	<i>snaJ</i>	<i>S. pristinaespiralis</i>	48%
50380	<i>mipH</i>	1220	HMG-CoA synthase	<i>snaI</i>	<i>S. pristinaespiralis</i>	56%
50390	<i>mipG</i>	242	ACP	<i>lnmL</i>	<i>Streptomyces actroolivaceus</i>	50%
50400	<i>mipF</i>	944	hypothetical protein	<i>lnmK</i>	<i>S. actroolivaceus</i>	45%
50410	<i>mipE</i>	284	ACP	<i>jamE</i>	<i>Lyngbya majuscula</i>	41%
50420	<i>mipD</i>	1208	beta-ketoacyl synthase beta subunit	<i>actI-orf2</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	63%
50430	<i>mipC</i>	1265	beta-ketoacyl synthase alpha subunit	<i>gra-orf1</i>	<i>Streptomyces violaceoruber</i>	70%
50440	<i>mipB</i>	233	ACP	<i>zhuN</i>	<i>Streptomyces</i> sp. R1128	77%

### 1.13 先行研究における *mip* クラスターの機能解析

*mip* クラスターに存在する HCS cassette が II 型 PKS と共同して二次代謝産物を生産するか調べるために、横田氏によって異種発現実験が行われた。まず、*Streptomyces lividans* を用いて min PKS (MipBCD) の異種発現を行ったところ、芳香族ポリケタイドのシャント化合物 SEK4、SEK4b の生産が確認された (Figure 1-20)。このことから、MipBCD は II 型 PKS の min PKS としての活性を有することが明らかになった。さらに、*mip* クラスターを全て異種発現すると芳香族ポリケタイドの SEK4、SEK4b に加え  $\beta$ -アルキル化された構造を持つ mpSEK4b が生産された。mpSEK4b はその構造から  $\beta$ -アルキル化された構造を持つ SEK4 の脱水体であることが示唆された (Figure 1-21) これらの結果から、*mip* クラスターの遺伝子産物は  $\beta$ -アルキル化された化合物を開始基質として芳香族ポリケタイドを合成すると考えられた。以上の結果に加え、MipA や MipH を除いた *mip* クラスターの異種発現実験の結果などから、*mip* クラスター遺伝子

産物の反応機構が予想された (Figure 1-21)。まず、*mip* クラスタに存在する min PKS に属さない ACP と KS (MipEK) によって malonyl-CoA から acetoacetyl-ACP (MipE) が合成される。この acetoacetyl-ACP から HCS cassette (MipFGHIJ) の触媒する methylmalonyl-CoA を用いた  $\beta$ -アルキル化反応により methylpentenoyl-ACP (MipE) が形成される。Methylpentenoyl 基は min PKS (MipBCD) へと受け渡され、methylpentenoate を開始基質とする伸長反応が起き、ポリケトメチレン鎖が形成される。その後 *mip* クラスタ近傍にコードされた修飾酵素によって最終産物の芳香族ポリケタイドが合成されると予想された。

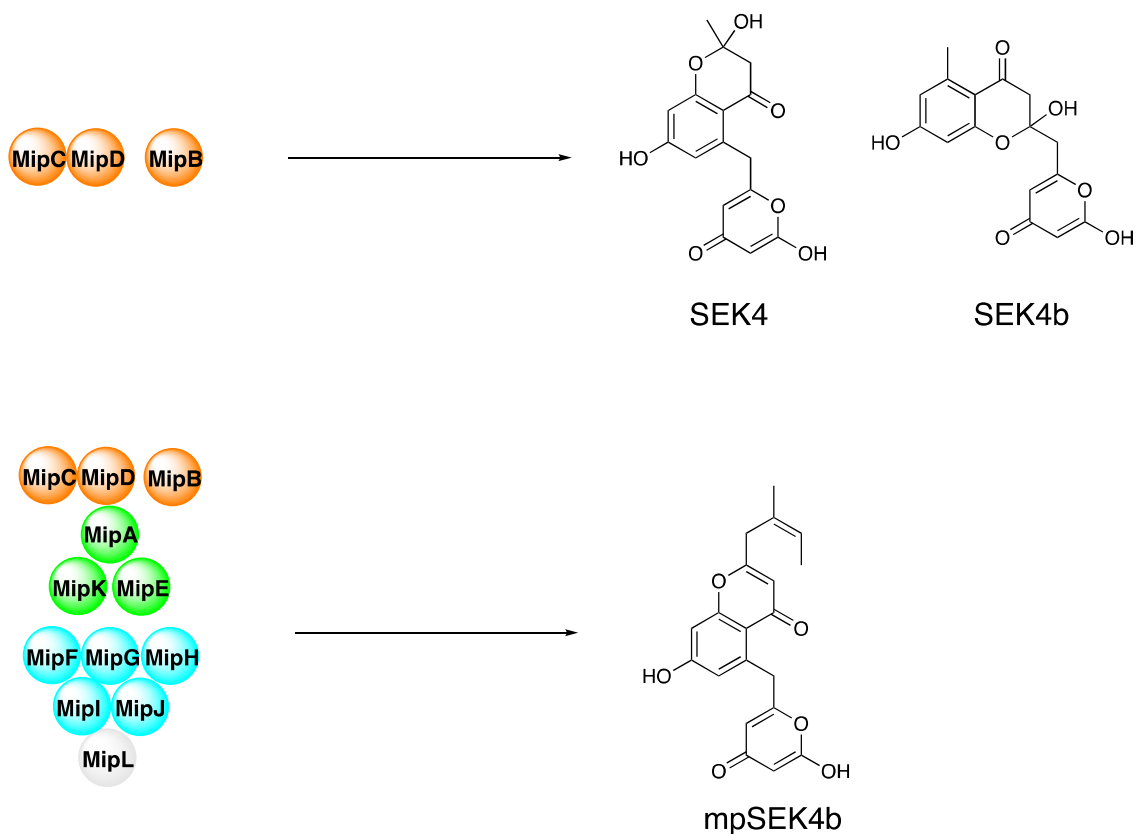


Figure 1-20. *mip* クラスターの異種発現実験で生産が確認された化合物

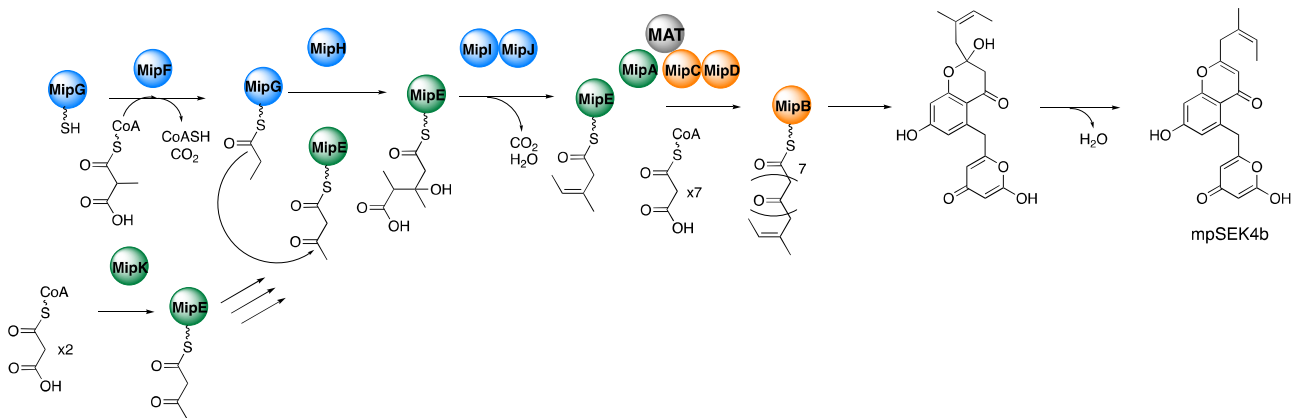


Figure1-21. *mip* クラスター遺伝子産物の予想反応機構

#### 1.14 本研究の目的

*A. missouriensis* のゲノムから発見された II 型 PKS 遺伝子クラスターは、他の II 型 PKS 遺伝子クラスターでは報告例の無い HCS cassette が存在すること、並びに通常の II 型 PKS 遺伝子クラスターでは 1 組しか存在しない KS-CLF 遺伝子が 2 組コードされているという特徴を有していた。これらの特徴から、この II 型 PKS 遺伝子クラスターが未知の機構により化合物を生産する可能性が強く

示唆されたことから当クラスターの解析が行われた。先行研究において行われた異種発現実験の結果から HCS cassette 酵素群とこれに隣接する KS-CLF が協働して  $\beta$ -アルキル化されたオクタケタイド鎖を合成することが示唆されたが (Figure 1-21)、このクラスターにコードされたもう 1 組の KS-CLF の機能は明らかにされていなかった。また、このクラスターが生合成を担う化合物も未同定であった。本研究はこの II 型 PKS 遺伝子クラスターにさらなる機能解析を行い、

- (i) 当クラスターが生産を担う化合物
- (ii) II 型 PKS 遺伝子クラスターが有する HCS cassette の機能
- (iii) 2 組の KS-CLF のそれぞれの機能

を解明することを目的としている。

## 第 2 章 *A. missouriensis* が生産する芳香族ポリケタイドの同定

### 2.1 目的

*A. missouriensis* のゲノム上にコードされた II 型 PKS 遺伝子クラスターはその特徴 (2 組の KS-CLF、HCS cassette の存在) から未知化合物の生産を担うことが強く示唆された。本研究ではまず *A. missouriensis* の培養条件を検討し、当クラスターの生産物を探索した。

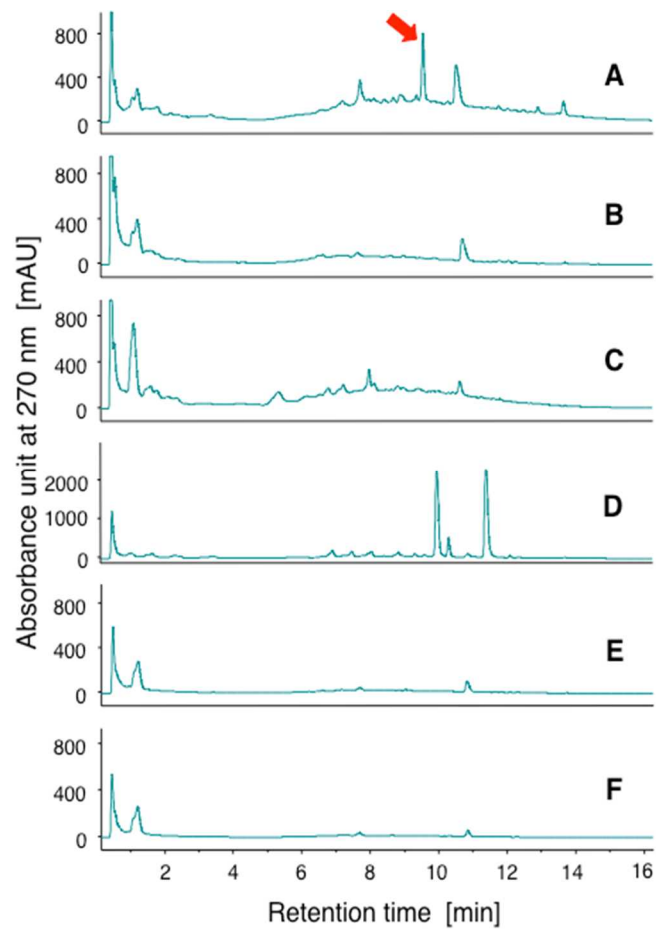
### 2.2 実験と結果

#### 2.2.1 *A. missouriensis* の培養条件検討

*A. missouriensis* の II 型 PKS クラスターの生産物を同定を試みるに当たり、まず *A. missouriensis* の培養条件を検討し、各培養液中の *A. missouriensis* の生産物の中から II 型 PKS の主な生産物である芳香族ポリケタイドの探索を行った。*A. missouriensis* を PYM 培地で前培養し、Q 培地、Bennett Maltose (BM) 培地、BE 培地、Mannitol Soya flour (MS) 培地、YEME 培地、0.5 %グリシンを含む YEME 培地の 6 種の培地にそれぞれ植菌した。4 日間培養した後、各培養液から培養産物を抽出し liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) 分析に供した (Figure 2-1)。LC-MS 分析のデータを解析し、UV スペクトルを指標として芳香族ポリケタイドと思われる化合物を探索した。その結果、Q 培地におけ

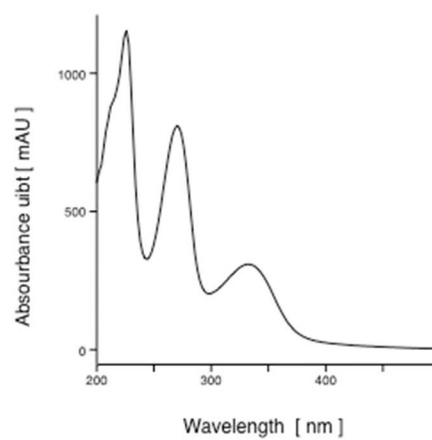
る生産物の中から芳香族ポリケタイドと予想される化合物のピークを発見した (Figure 2-1、赤色の矢印)。

このピークの UV スペクトル (Figure 2-2) を見ると 280 nm と 340 nm に極大吸収が存在した。一般的に、芳香族化合物は芳香環固有の 280 nm 付近に極大吸収が存在する。それに加え複環構造を有する場合 280 nm より長波長側にも紫外吸光を示し、構造中の芳香核の数が増えるほど吸収波長はより長波長側に移動する (Jones, 1943)。280 nm と 340 nm に極大吸収を持つことから、目的の化合物は芳香族ポリケタイドである可能性が高いと考えられた。そこで、この化合物の単離と構造解析を試みた。



**Figure 2-1. LC-MS 分析結果**

A, Q 培地; B, BM 培地; C, BE 培地; D, MS 培地; E, YEME 培地; F, 0.5 %グリシンを含む YEME 培地。目的の化合物のピークを赤い矢印で示した。





**Figure 2-2. Fig. 2-1 の赤矢印のピークに含まれる化合物の UV スペクトル**

## 2.2.2 目的の化合物の単離と構造決定

構造解析に十分な量の化合物を得るため、4 L の Q 培地で *A. missouriensis* を大量培養した。合成吸着剤を用いて培養液中の化合物を抽出し、脱イオン水と酢酸エチルによる液液分離を行った後、回収した有機層を減圧濃縮した。更に、Sephadex LH-20 (GE 社) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーによって目的の化合物を精製した。LC-MS 分析により目的の化合物を含む画分を分析したところ、目的の化合物と同様の UV スペクトルを示す化合物を複数発見した。そこで、それらの化合物のうち最もメジャーな 3 つの化合物 (**1, 2, 3**) を単離することにした。目的の化合物を含む画分をさらに逆相 high performance liquid chromatography (HPLC) によって精製し、**Figure 2-2** に示した UV スペクトルを指標に化合物を単離し、結果として 3 L の Q 培地から 2.3 mg の化合物 **1** と 2.5 mg の化合物 **2** を、26 L の Q 培地から 0.7 mg の化合物 **3** を取得した。high resolution mass spectrometry (HR-MS)、nuclear magnetic resonance (NMR) 分析に供した。HR-MS による分子量の測定と  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR および correlated spectroscopy (COSY)、heteronuclear multiple bond correlation (HMBC)、heteronuclear multiple quantum coherence (HMQC)、nuclear Overhauser enhancement

and exchange spectroscopy (NOESY)、heteronuclear single quantum correlation spectroscopy (HSQC)といった二次元 NMR による構造解析の結果、化合物 **1**、**2**、**3** の構造を決定した。以下に各化合物の構造解析の結果を記述する。

### 2.2.3 化合物 **1** の構造決定

HR-MS 分析によって化合物 **1** の分子量を測定した結果、 $m/z = 475.1626$   $[M+Na]^+$  が観測された。これは組成式  $C_{22}H_{28}O_{10}$  の化合物に  $Na^+$  が付加したと仮定して算出される  $m/z$  475.158 との差が 5 ppm 以下であることから、化合物 **1** の組成式は  $C_{22}H_{28}O_{10}$  であることが判明した。さらに、NMR 分析により化合物 **1** の構造を解析した (Table 2-1、Figure 2-4)。

5 位の水素が 6.92 ppm と低磁場に、積分値  $^1H$ 、シングレットのシグナルを示すことから C-5 は芳香環を構成していると考えられた (Figure 2-3, A)。C-6、C-7、C-8 は COSY の結果直鎖状に連なっていた。HMQC により 7 位と 8 位には 2 つずつ、6 位には 1 つの水素原子が結合しているとわかった。また、C-6 は  $^1H$  のシグナルが 4.77 ppm、 $^{13}C$  NMR のシグナルが 65.8 ppm に出ていることから酸素原子が結合していると考えられた (Figure 2-3, B)。 $^1H$ 、 $^{13}C$  NMR から methyl 基と判明した C-13 は、COSY の結果 C-1 と隣接していた。C-1 は  $^1H$ 、 $^{13}C$  NMR、HMQC から、C-6 同様酸素原子と結合していると考えられた

(Figure 2-3, C)。 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR、HMQC から、C-4、C-11 は methylene 基であり、C-3 は C-1、C-6 同様酸素原子との結合が示唆された。さらに、COSY により C-3 は C-4、C-11 と隣接していることが判明した (Figure 2-3, D)。C-9 は 205.1 ppm の炭素シグナルを示すことから aldehyde 基、または carbonyl 基であると分かった (Figure 2-3, E)。C-12 は 169.1 ppm の炭素シグナルを示し、carboxyl 基と判明した (Figure 2-3, F)。 $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR、HMQC の結果から C-1'、C-2'、C-3'、C-4'、C-5' はいずれも酸素原子と直接結合していることが示唆された。また、COSY により C-1'、C-2'、C-3'、C-4'、C-5'、C-6' が連結していることが判明したことから、これらの炭素は糖を形成していることが示唆された (Figure 2-3, G)。C-4a、C-5a、C-9a、C-10、C-10a は何れも 110 ppm 以上の炭素シグナルを示し、 $^1\text{H}$  NMR、HMQC から水素原子とも結合していないことが判明した。従って、これらの炭素は C-5 とともに芳香環を構成すると予想された。また、C-10 は 157.6 ppm と特に低磁場に炭素シグナルを示すことから、酸素原子と結合している可能性が考えられた。HMBC の結果、5 位の水素原子は C-6、C-9a、C-10a と相関を示した。さらに、8 位の水素原子が C-9、C-9a と相関を示したことから、C-6、C-7、C-8、C-9 は芳香環に隣接する 6 員環を構成することが示唆された。C-4 位の水素原子が HMBC において C-4a、C-5、C-10a と相関を示したことに加え、1 位の水素原子が C-3、C-4a、C-10 との

相関を示したことから、C-1、C-3 は酸素原子を介して連なっており、これらは C-4 とともに芳香環に隣接する 6 員環を形成することが明らかになった。11 位の水素原子は C-12 と HMBC で相関を示した。NOESY の結果 13 位の水素原子と 3 位の水素原子に相関があったことから、*cis* 型の立体配座であることが判明した。これらの結果から、化合物 **1** は 3 環性の芳香族ポリケタイド骨格を持つことが明らかになった。SciFinder を利用して同様の骨格を持つ化合物を探索したところ、この骨格は fogacin (Radzom *et al.*, 2006) と一致した。<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR の結果を fogacin の文献値と比較したところ、ほぼ合致した。

HMBC から、1'位の水素原子と C-12 に相関が見えたことから、C-1'、C-2'、C-3'、C-4'、C-5'、C-6'が形成する糖は fogacin 骨格と 12 位でエステル結合していることが分かった。次に、<sup>1</sup>H NMR から見えたカップリング定数に基づき糖質の立体構造を解析した (**Figure 2-4, B**)。C-4'上の水素原子と C-3'、C-5'上の水素原子のカップリング定数が 9.5 Hz であったことからこれらの水素原子はアキシアルに位置することがわかった。また、C-2'上の水素原子と C-3'上の水素原子ではカップリングによるシグナルの分裂が僅かであったことから C-2'上の水素はエクatorialに位置する。同様に C-1'と C-2'のカップリングによるシグナルの分裂がわずかであったこと、HSQC により C-1'と H-1'のカップリング定数が 177.4 Hz と判明したことから、C-1'上の水素原子はエクatorialに位置し

C-1'、C-2'、C-3'、C-4'、C-5'、C-6'は  $\alpha$ -rhamnose を構成することが判明した。以上の結果から化合物 **1** を fogacin 骨格に rhamnose が結合した fogacin B (Figure 2-4, C) と同定した。

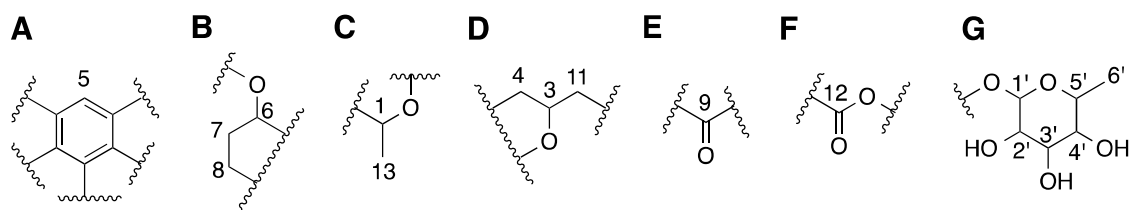
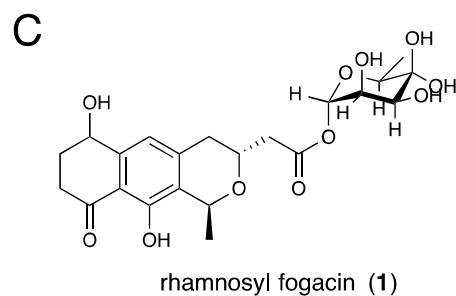
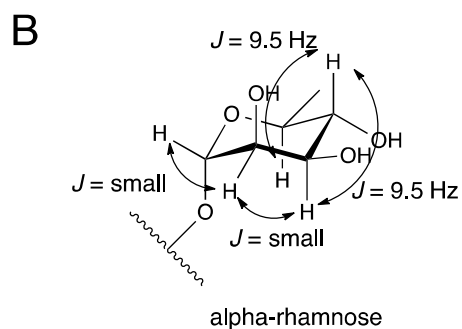
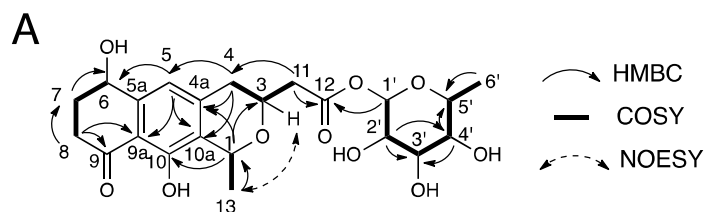


Figure 2-3. 化合物 **1** の部分構造

Table 2-1. NMR の結果得られたシグナル

position	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1	5.04 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H)	67
3	4.39 (m, 1H)	63.3
4	2.88 (m, 1H), 2.67 (m, 1H)	33.6
4a		142.2
5	6.92 (s, 1H)	117.4
5a		145.9
6	4.77 (br, 1H)	65.8
7	2.24 (m, 1H), 2.00 (m, 1H)	31.6
8	2.80 (m, 2H)	35.2
9		205.1
9a		112.7
10		157.6
10a		125.3
11	2.82 (m, 1H), 2.55 (m, 1H)	40.5
12		169.1
13	1.49 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H)	18.6

1'	5.89 (br, 1H)	94.4
2'	3.72 (br, 1H)	69.4
3'	3.55 (dd, $J = 3.9$ Hz, 1H)	70.2
4'	3.33 (dd, $J = 9.5$ Hz, 1H)	71.4
5'	3.63 (m, 1H)	71.1
6'	1.20 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H)	17.9



**Figure 2-4. NMR の結果から判明した fogacin B (1)の構造**

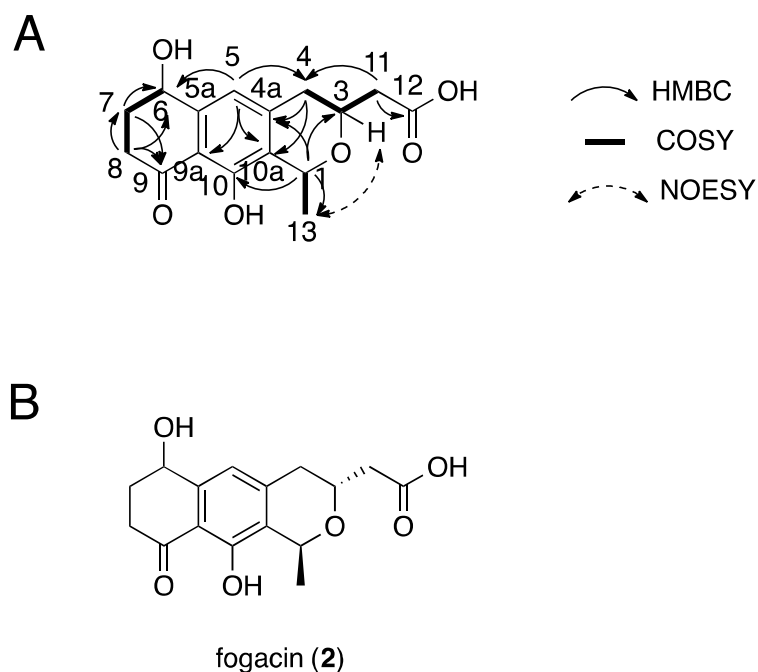
A,各番号に対応する水素原子及び炭素原子の位置と二次元 NMR で検出された原子同士の相関;  
 B, スピンスピン結合から推定される糖の構造; C, fogacin B (1) の構造

## 2.2.4 化合物 2 の構造決定

HR-MS 分析による化合物 **2** の測定の結果、 $m/z$  305.1021 [M-H]<sup>-</sup>が観測された。これは組成式 C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub> の化合物からプロトンが脱離したと仮定して算出される  $m/z$  305.1025 と合致することから、化合物 **2** の組成式は C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>6</sub> であることが判明した。これは fogacin の組成式と一致する。Fogacin 配糖体である化合物 **1** と同じ UV スペクトルを示し fogacin と一致する組成式であることから、化合物 **2** は fogacin であることが強く示唆された。そこで <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR および COSY、HMBC、HMQC、NOE などの二次元 NMR による分析結果 (Table 2-2、Figure 2-5) を文献と比較した (Radzom *et al.*, 2006)。NMR による分析結果が文献値とほぼ一致したことから、化合物 **2** を fogacin と同定した。

Table 2-2. 化合物 **2** の NMR 分析で検出されたシグナル

position	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
1	5.03 (q, $J = 6.5$ Hz, 1H)	67
3	4.34 (m, 1H)	63.3
4	2.88 (m, 1H), 2.67 (m, 1H)	33.6
4a		142.2
5	6.91 (s, 1H)	117.4
5a		145.9
6	4.76 (br, 1H)	65.8
7	2.24 (m, 1H), 2.00 (m, 1H)	31.6
8	2.80 (m, 2H)	35.2
9		205.1
9a		112.7
10		157.6
10a		125.3
11	2.64 (m, 1H), 2.47 (m, 1H)	40.5
12		169.1



**Figure 2-5. NMR の結果から同定された化合物 2 の構造**

A,各番号に対応する水素原子及び炭素原子の位置と二次元 NMR で検出された原子同士の相関;  
 B, 化合物 2 (fogacin) の構造

### 2.2.5 化合物 3 の構造決定

化合物 1、2 と並行して化合物 3 も単離したが構造解析に十分な量を得ることが出来なかった。そこで、さらに 23 L の Q 培地で *A. missouriensis* を培養し、計 26 L の培養液から化合物 3 を単離した。得られた化合物 3 を HR-MS、NMR 分析に供し構造解析を行った。

HR-MS 分析によって化合物 3 の分子量を測定した結果、 $m/z$  433.1457 [M-H]<sup>-</sup> が観測された。これは組成式  $C_{23}H_{30}O_8$  の化合物からプロトンが脱離したと仮定



して算出される  $m/z$  433.1499 と 5 ppm 未満で合致する。従って、化合物 **3** の組成式は  $C_{23}H_{30}O_8$  であることが判明した。

$^1H$  NMR、 $^{13}C$  NMR による分析の結果 (Table 2-3)、C-1 から C-10a にかけて化合物 **1**、**2** と類似した値が得られた。また、COSY、HMBC、HMQC の結果 (Figure 2-6) 明らかになったこれらの原子同士の位置関係も化合物 **1**、**2** と同様であったことから化合物 **3** も化合物 **1**、**2** と同様 fogacin 骨格を有することが判明した。一方で、fogacin と異なり化合物 **3** では C-11 が methyl 基ではなくなっており、ここに何らかの置換基が付加していると考えられた。また、fogacin には存在しないシグナルとして 2 つの methyl 基 (C-14、C-15)、2 つの  $sp^2$  炭素シグナル (C-12、C-13)、そしてそれぞれ酸素原子と結合していると考えられる 3 つの炭素シグナル (C-19、C-20、C-21) が検出された。

まず、2 つの  $sp^2$  炭素近傍の構造について考察した。C-14、C-15 上の水素原子はそれぞれ C-12、C-13 に対し HMBC で相関を示した。COSY の結果 C-13 と C-15 は隣接していた。以上から C-12、C-13、C-14、C-15 は 2 位に置換基を持つ *trans*-butene を形成していることが分かった。さらに、C-13、C-14 上の水素原子が C-11 に対し HMBC で相関を示したことから C-12 が C-11 と結合していることが判明した。C-12、C-13、C-14、C-15 の炭素原子の化学シフトを前任者が残した mpSEK4b の  $^{13}C$  NMR 分析結果と比較したところ、 $\beta$ -アルキル化された

構造と類似していた (**Table 2-4**、**Figure 2-7**)。以上から化合物 **3** は *trans*-butene が fogacin の 13 位に付加した構造を持つことが明らかになった。

C-19、C-20、C-21 は組成式と COSY、HMQC の結果から glycerol であることがわかった。この glycerol は C-17 のカルボキシ基とエステル結合、もしくは 10 位か 6 位の水酸基とエーテル結合していると予想されたが、HMBC では C-19 の水素と fogacin 骨格の炭素の間に相関は見られなかった。

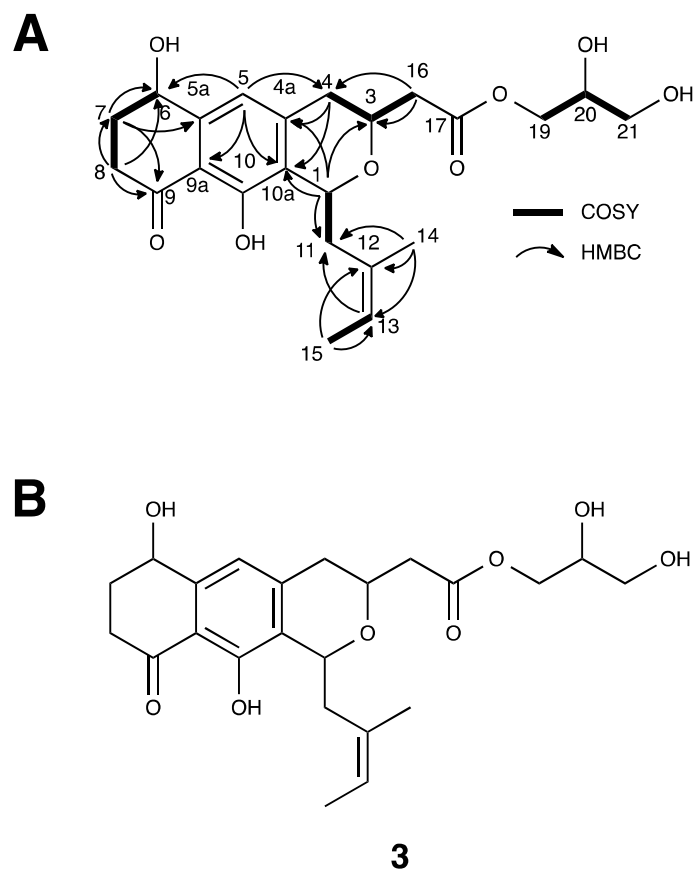
glycerol が fogacin 骨格のどこに結合しているかを明らかにするために、化合物 **3** のアルカリ処理を行った。Glycerol が C-17 とエステル結合しているのであれば、アルカリ処理により容易に加水分解するがエーテル結合しているのであれば加水分解は起こらないと考えられる。化合物 **3** のメタノール溶液に水酸化ナトリウムを加え、1 時間 65°C で加熱後、LC-MS 分析に供した。その結果、2 つの化合物が生成した (**Figure 2-8, A**)。a のピークにおける MS スペクトルからは 359.51 [M-H]<sup>-</sup> と 719.57 [2M-H]<sup>-</sup> の 2 つの *m/z* が検出された (**Figure 2-8, B**)。化合物 **3** が加水分解されたと仮定した際の予想分子量は 360.2 である。従って、2 つの *m/z* は加水分解された化合物 **3** が二量体を形成し、そこから 1 つのプロトンが脱離したものと一致する。従って、アルカリ処理により化合物 **3** が加水分解されたことが判明した。また、b のピークにおける MS スペクトルからは 719.46 [2M-H]<sup>-</sup> の *m/z* が検出された (**Figure 2-8, B**)。これも、同様に化合物 **3** が

加水分解された構造がダイマーを形成しプロトンが脱離したと考えられた。いずれのピークもアルカリ処理によって化合物 **3** が加水分解されたことを示したことにより、C-19、C-20、C-21 からなる glycerol は C-17 とエステル結合を形成していることが強く示唆された。アルカリ処理後の化合物 **3** が2つのピークに分かれたのは、アルカリ処理によって異性体化したためと予想される。

また、C-17 と C-20 (glycerol 中央) の炭素を介してエステル結合していると仮定した場合、構造が対象になるため C-19 と C-21 の NMR シグナルは等価になると考えられる。しかし、実際は  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  のシグナルともに異なっている。そのため、C-17 と C-19 (glycerol の末端) がエステル結合していると考えられる。以上の解析から化合物 **3** は **Figure 2-6** に示した構造を持つ fogacin C であることが明らかになった。

Table 2-3. 化合物 3 の NMR 分析で検出されたシグナル

position	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
1	5.03 (m, 1H)	71.1
3	4.26 (m, 1H)	64
4	2.87 (m, 2H)	34.3
4a		142.3
5	6.68 (s, 1H)	117.5
5a		143.6
6	4.67 (br, 1H)	67.6
7	2.23 (m, 1H), 2.08 (m, 1H)	31.5
8	2.85 (m, 1H), 2.6 (m, 1H)	34.6
9		204.1
9a		113.1
10		159.1
10a		126
11	2.5 (m, 2H)	40.8
12		133.4
13	5.27 (m, 1H)	121.4
14	1.75 (s, 3H)	23.7
15	1.53 (d, <i>J</i> = 6.5 Hz, 3H)	13.5
16	2.62 (m, 1H), 2.65 (m, 1H)	40.8
17		171.3
19	4.02 (m, 1H), 4.10 (m, 1H)	65.8
20	3.75 (m, 1H)	69.9
21	3.47 (m, 2H)	63.3



**Figure 2-6. NMR の結果から推定された fogacin C (3) の構造**

A,各番号に対応する水素原子及び炭素原子の位置と二次元 NMR で検出された原子同士の相関;

B, fogacin C (3) の構造

Table 2-4. 前任者が測定した mpSEK4b の  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR のデータ

position	$^1\text{H}$ NMR	$^{13}\text{C}$ NMR
1		167.9
2	5.29 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H)	89.3
3		172.0
4	6.10 (s, 1H)	101.9
5		164.3
6	4.35 (s, 2H)	37.4
7		138.0
8	6.79 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H)	118.4
9		161.7
10	6.88 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H)	103.1
11		160.2
12		114.1
13		180.2
14	5.82 (s, 1H)	110.0
15		166.5
16	3.22 (s, 2H)	36.0
17		129.2
18	5.47 (q, 1H, $J = 6.0$ Hz, 1H)	124.3
19	1.60 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H)	13.7
20	1.69 (s, 3H)	23.7

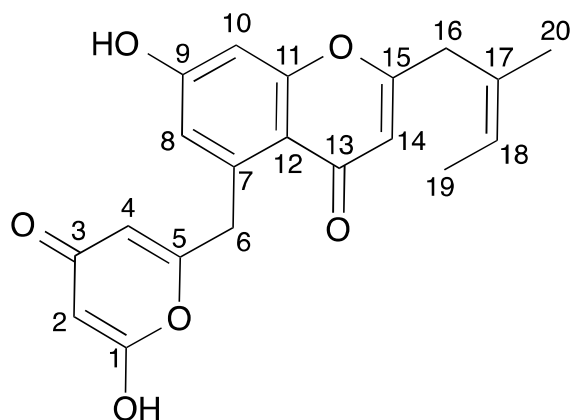


Figure 2-7. mpSEK4b の化学構造

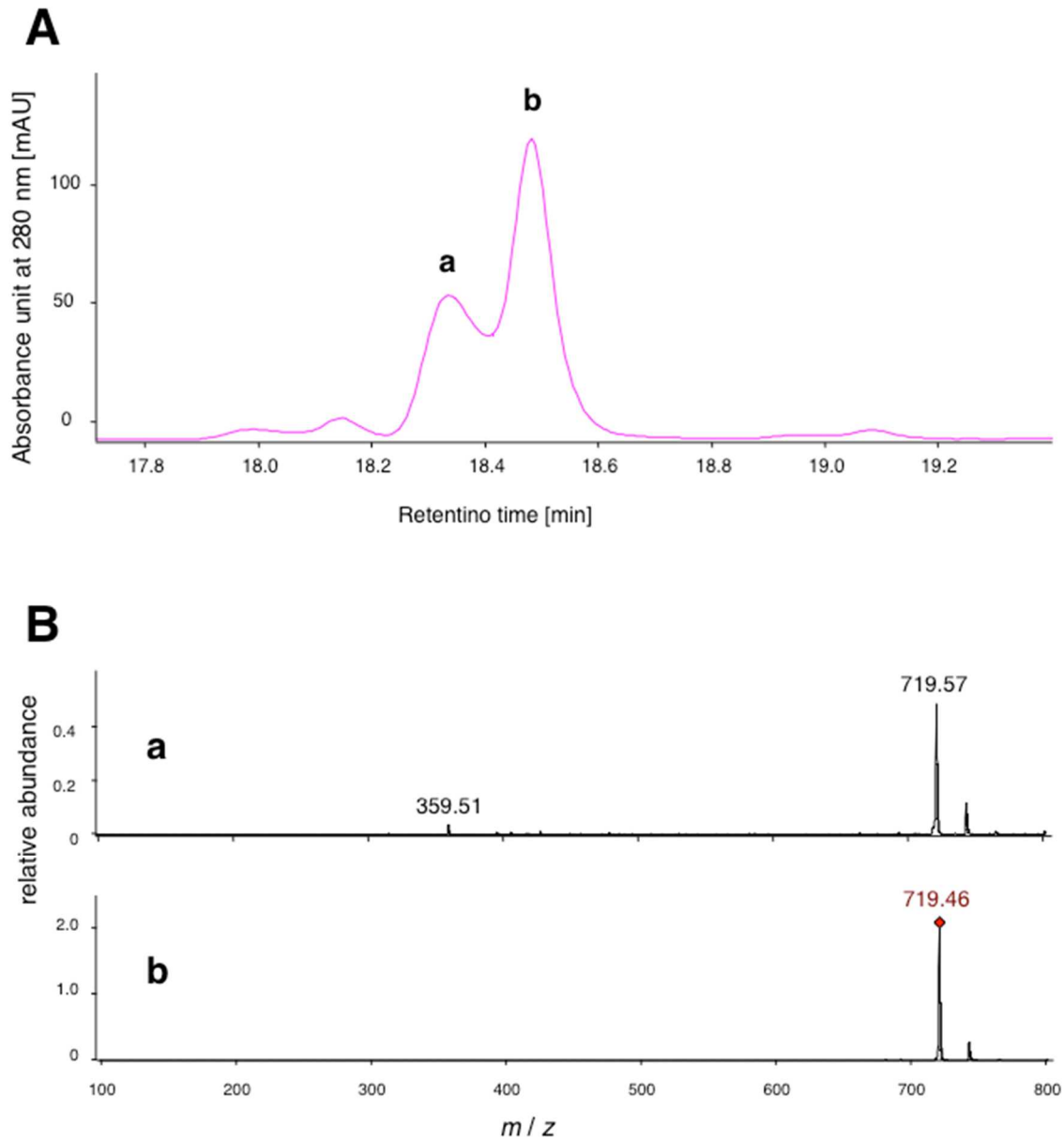


Figure 2-8. アルカリ処理した化合物 3 の LC-MS 分析結果

A, アルカリ処理した化合物 3 のクロマトグラム; B, a) ピーク a の MS スペクトル, b) ピーク b での MS スペクトル





## 2.3 考察

NMR による構造解析の結果などを基に *A. missouriensis* の二次代謝産物である化合物 **1**、**2**、**3** の構造をそれぞれ、fogacin の配糖体 (fogacin B)、fogacin、そして fogacin に分枝炭素鎖が付加し glycerol がエステル結合した化合物 (fogacin C) と同定した。

fogacin は II 型 PKS 産物である actinorhodin と類似した構造を持つ (**Figure 2-5 B**)。特に、actinorhodin の前駆体である dihydrokalafungin は fogacin と同様の炭素骨格を有している。また、dihydrokalafungin は dimerase によって actinorhodin の合成に消費されなかった場合ケトエノール平衡により tetrahydrokalafungin へと可逆的に変化するが、tetrahydrokalafungin は fogacin と更に類似した構造を持つ。故に、fogacin と actinorhodin は類似した生合成経路で生合成されることが予想された。*A. missouriensis* 由来 II 型 PKS 遺伝子クラスター中の *AMIS50510*、*AMIS50660*、*AMIS50680* はそれぞれ polyketide cyclase、polyketide cyclase / dehydrase、short chain dehydrogenase をコードしており、fogacin 生合成経路で炭素骨格の形成に寄与することが予想された (**Table 2-5**)。

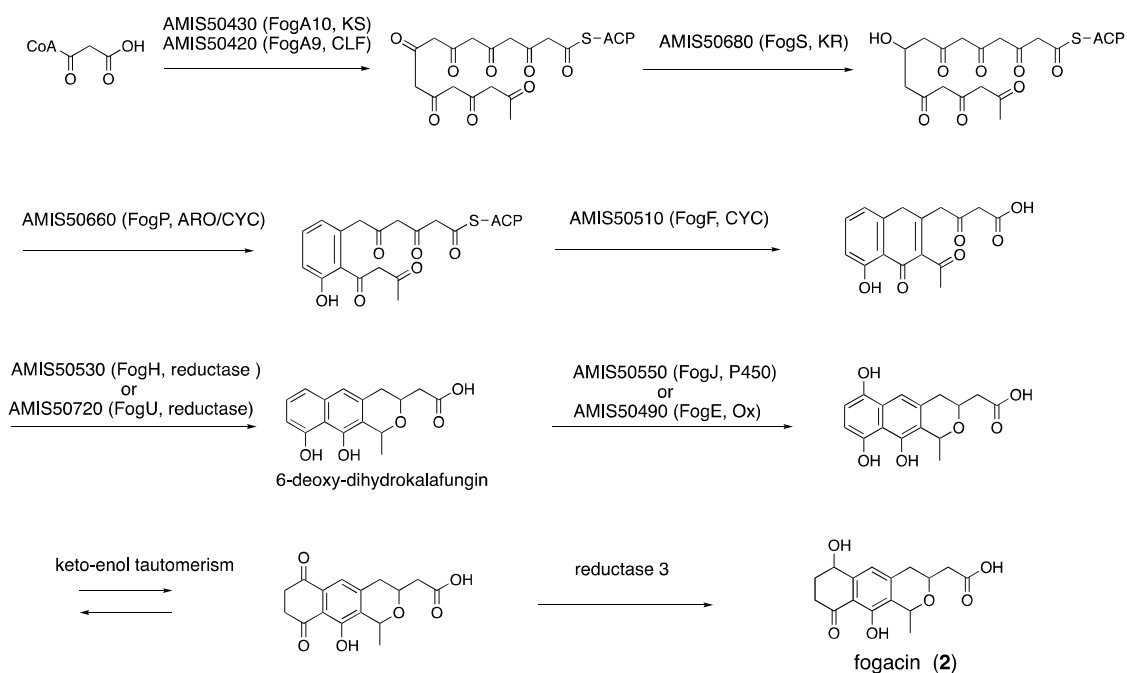
**Table 2-5. AMIS50510、AMIS50660、AMIS50680 に対して相同性を有する**

**actinorhodin 生合成遺伝子クラスター (act クラスター) 中のタンパク**

*fog* クラスターと命名した後の各遺伝子の名称は **Table 2-6** に記述した。

Gene	Annotation	homologous <i>act</i> protein	identity
<i>AMIS50510</i>	polyketide cyclase	cyclase ( <i>actIV</i> )	53%
<i>AMIS50660</i>	polyketide cyclase/ dehydrase	actinorhodin polyketide synthase bifunctional cyclase/ dehydratase ( <i>actVII</i> )	53%
<i>AMIS50680</i>	short chain dehydrogenase	actinorhodin polyketide reductase ( <i>actIII</i> )	67%
<i>AMIS50520</i>	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase ( <i>actVI-1</i> )	49%

*AMIS50510*、*AMIS50660*、*AMIS50680* はそれぞれ *actIV*、*actVII*、*actIII* と相同性を持つ。これらの *act* 遺伝子はいずれも actinorhodin 生合成経路において芳香環ポリケタイドの骨格形成に関与しているタンパク質である。従って、これらの酵素は fogacin と actinorhodin 生合成の対応する段階の反応を触媒と考えられる。これらの結果に基づき、actinorhodin と同様に開始基質として酢酸を利用すると考えられる化合物 **1**、**2** の fogacin の生合成経路を予想した (**Figure 2-11**)。



**Figure 2-11. fogacin の予想合成経路**

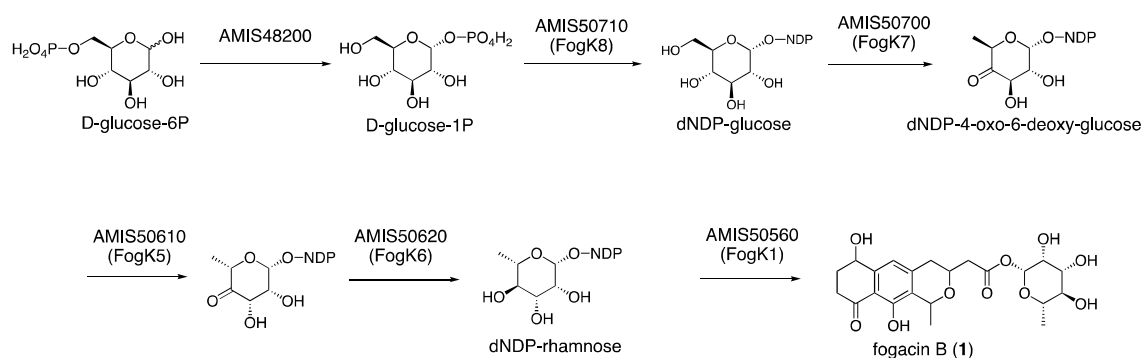
後述する *fog* クラスターにおける名称も併記した。

actinorhodin 生合成経路では KS-CLF によって合成されたポリケトメチレン鎖はまず ActIII (KR) によって 9 位のカルボニル基が還元され水酸基となる。故に、fogacin 生合成経路でも同様に ActIII ホモログである AMIS50680 による 9 位の還元が起きると予想される。actinorhodin 生合成経路では、9 位を還元されたポリケトメチレン鎖は ActVII によって 7 位と 12 位の炭素で環化、芳香化されるが fogacin 生合成経路では ActVII ホモログの AMIS50660 が同様の役割を担っていると考えられる。芳香環化された actinorhodin 中間体は ActIV により再び環化され 2 環性の構造となるが、fogacin の場合には ActIV ホモログである

AMIS50510 がこれを担うと考えられる。actinorhodin 生合成経路において、形成された 2 環性の中間体は ActVI-1 により 3 環性の芳香族ポリケタイド骨格を形成するが、fogacin の場合には *fog* クラスターにコードされた還元酵素である AMIS50530 か AMIS50720 のどちらかがこれを担うと考えられる。合成された中間体は還元を受けて 6-deoxy-dihydrokalafungin へ変換されると予想される。

fogacin と actinorhodin はここまで同様の生合成経路を取るが、この後に分岐すると考えられる。fogacin 生合成経路では、oxidoreductase (AMIS50490) または cytochrome P450 (AMIS50550) によって 6-deoxy-dihydrokalafungin の芳香環に水酸基が導入され、ケト-エノール平衡により非酵素的に *p*-ベンゾキノン様の構造となったところで 1 つのカルボニル基が還元され、fogacin となることが予想される。

また、化合物 1 の fogacin 骨格に結合していた rhamnose の生合成経路の予想も行った (Figure 2-12)。



## Figure 2-12. rhamnose の予想生合成経路

後述する *fog* クラスタにおける名称も併記した。

*A. missouriensis* 由来 II 型 PKS 遺伝子クラスターには糖の生合成や転移を触媒する酵素が多くコードされている (Table 1-2)。それらの遺伝子を基に rhamnose 生合成経路を予想した。rhamnose の生合成経路では、初発反応の基質として D-グルコース-6 リン酸 (D-glucose-6P) が利用され、最終産物として rhamnose が合成されると予想された。D-glucose-6P はほとんどの生物種に存在する生化学反応経路である解糖系の初期段階において中間産物として合成される化合物である。従って、*A. missouriensis* 体内にも豊富に存在すると考えられる。まず解糖系で合成された D-glucose-6P が *A. missouriensis* がもつ phosphoglucomutase (AMIS48200; II 型 PKS 遺伝子クラスター外の遺伝子) により D-グルコース-1 リン酸 (D-glucose-1P) へと変換される。D-glucose-1P は glucose-1-phosphate thymidyltransferase (AMIS50710) によって、デオキシヌクレオチドが結合した dNDP-glucose へと変換される。次に、dTDP-glucose-4,6-dehydratase (AMIS50700) により dNDP-glucose の 4 位と 6 位が酸化され dNDP-4-oxo-6-deoxy-glucose が合成されると考えられる。さらに、dTDP-4-dehydrorhamnose-3,5-epimerase (AMIS50610) によって 3 位に結合した水酸基と 6

位のメチル基がエピマー化し rhamnose と同様の立体配座となる。最後に NAD-dependent epimerase/ dehydratase (AMIS50620) により dNDP-rhamnose が合成され、glycosyltransferase (AMIS50560 または AMIS50630) によって fogacin に rhamnosyl 基が転移すると考えられる。

化合物 **3** の fogacin 骨格に付加した分枝構造は mpSEK4b の構造と一致した。このため、HCS cassette にコードされた酵素群が触媒する  $\beta$ -アルキル化反応により合成される (Z)-3-methylpent-3-enoate を開始基質として利用することが予想された。また、化合物 **3** も fogacin 骨格を有していたことから KS-CLF によってポリケトメチレン鎖を合成した後の生合成経路は化合物 **1**、**2** と共有していることが予想された。

本実験により、*A. missouriensis* から 3 つの芳香族ポリケタイド (fogacin、fogacin B、fogacin C) が同定された。*A. missouriensis* のゲノム上には II 型 PKS 遺伝子クラスターは 1 つしか存在しない。従って、fogacin 類の生合成はこのクラスターが担っていると考えた。予想された生合成経路を基に fogacin 類の生合成に関与すると思われる遺伝子をまとめ、改めて *fog* クラスターと命名した。以降、当クラスターのことを *fog* クラスターと呼称し、*fog* クラスターを構成する遺伝子群もこれに従った名称を用いることにした。**Table 2-6** に *fog* クラスターを構成する各遺伝子とその名称を示した。min PKS を橙色、修飾酵素遺

伝子を紫色、糖の生合成や転移を触媒する酵素の遺伝子を紫色、転写制御因子を赤色、HCS cassette を水色、min PKS 以外の KS、ACP を緑色、その他の遺伝子を黒色で示した。

Table 2-6. *fog* クラスターを構成する遺伝子

Gene	Name	Size (aa)	Putative function
AMIS50340	<i>fogA1</i>	133	hypothetical protein (= <i>mipL</i> )
AMIS50350	<i>fogA2</i>	593	beta-ketosynthase (= <i>mipK</i> )
AMIS50360	<i>fogA3</i>	258	enoyl-CoA hydratase/isomerase (= <i>mipJ</i> )
AMIS50370	<i>fogA4</i>	246	enoyl-CoA hydratase/isomerase (= <i>mipI</i> )
AMIS50380	<i>fogA5</i>	407	HMG-CoA synthase (= <i>mipH</i> )
AMIS50390	<i>fogA6</i>	81	acyl carrier protein (= <i>mipG</i> )
AMIS50400	<i>fogA7</i>	315	hypothetical protein (= <i>mipF</i> )
AMIS50410	<i>fogA8</i>	95	acyl carrier protein (= <i>mipE</i> )
AMIS50420	<i>fogA9</i>	403	beta-ketosynthase beta subunit (= <i>mipD</i> )
AMIS50430	<i>fogA10</i>	422	beta-ketosynthase alpha subunit (= <i>mipC</i> )
AMIS50440	<i>fogA11</i>	78	acyl carrier protein (= <i>mipB</i> )
AMIS50450	<i>fogA12</i>	374	3-oxoacyl-ACP synthase III (= <i>mipA</i> )
AMIS50460	<i>fogB</i>	246	short chain dehydrogenase
AMIS50470	<i>fogC</i>	348	luciferase-like monooxygenase
AMIS50480	<i>fogD</i>	171	hemerythrin HHE cation-binding domain-containing protein
AMIS50490	<i>fogE</i>	381	oxidoreductase
AMIS50500	<i>fogR</i>	283	SARP-family transcriptional activator
AMIS50510	<i>fogF</i>	307	polyketide cyclase
AMIS50520	<i>fogG</i>	149	polyketide cyclase
AMIS50530	<i>fogH</i>	303	reductase
AMIS50540	<i>fogI</i>	402	acyltransferase
AMIS50550	<i>fogJ</i>	399	cytochrome P450
AMIS50560	<i>fogK1</i>	397	glycosyl transferase
AMIS50570	<i>fogL</i>	386	beta-lactamase
AMIS50580	<i>fogK2</i>	452	NDP-deoxyglucose-2,3-dehydratase
AMIS50590	<i>fogK3</i>	374	aminotransferase
AMIS50600	<i>fogK4</i>	269	methyltransferase
AMIS50610	<i>fogK5</i>	197	dNTP-4-dehydrorhamnose-3,5-epimerase
AMIS50620	<i>fogK6</i>	332	NAD-dependent epimerase/dehydratase
AMIS50630	<i>fogM</i>	377	glycosyltransferase
AMIS50640	<i>fogN</i>	421	beta-ketosynthase alpha subunit
AMIS50650	<i>fogO</i>	399	beta-ketosynthase beta subunit
AMIS50660	<i>fogP</i>	324	polyketide cyclase/dehydrase
AMIS50670	<i>fogQ</i>	396	beta-lactamase
AMIS50680	<i>fogS</i>	260	ketoreductase
AMIS50690	<i>fogT</i>	576	ABC transporter ATPase and permease protein
AMIS50700	<i>fogK7</i>	332	dTDP-glucose-4,6-dehydratase
AMIS50710	<i>fogK8</i>	296	glucose-1-phosphate thymidyltransferase
AMIS50720	<i>fogU</i>	195	reductase



## 2.4 実験項

### 使用した菌株、ベクター、培地

#### ・菌株

*A. missouriensis* NBRC13243 株は独立行政法人 製品評価技術基盤機構 (NITE) から分与していただいた株を使用した。

#### ・培地

*A. missouriensis* の植継ぎには PYM 寒天培地を用いた。

PYM 寒天培地

2% agarose

0.5% Bacto peptone (BD 社)

0.3% Bacto yeast extract (BD 社)

0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

pH 7.0

培養条件検討の際の前培養には PYM 培地を用いた。培養条件検討には Q 培地、Bennett-Maltose (BM) 培地、BE 培地、Mannitol Soya flour (MS) 培地、YEME 培地、0.5%グリシンを加えた YEME 培地を用いた。

### PYM 培地

0.5% Bacto peptone (BD 社)

0.3% Bacto yeast extract (BD 社)

0.1%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

pH 7.0

### Q 培地

2% glycerol

1% molasses (大日本明治製糖社)

0.5% casein (関東化学社)

0.1% polypeptone (日本製薬社)

0.1%  $\text{CaCO}_3$  (小堺製薬社)

pH 7.2

### BM 培地

0.1% Bacto yeast extract (BD 社)

1% maltose

0.2% NZ amine typeA (和光純薬工業社)

0.07% エルリッヒカツオエキス (キョクトー社)

0.0376% 粉末肉エキス (キョクトー社)

pH 7.3

#### BE 培地

1% starch

1% D-glucose

1% glycerol

0.5% polypeptone (日本製薬株式会社)

0.2% Bacto yeast extract (BD 社)

0.6% corn steep liquor (オリエンタル酵母社)

#### MS 培地

2% mannitol

2% soya flour

オートクレーブ滅菌後、培地 100 ml あたり 0.4 ml の 2.5 M

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 水溶液を添加。

#### YEME 培地

0.5% Bacto peptone (BD 社)

0.3% Bacto yeast extract (BD 社)

0.3% Bacto Malt Extract (BD 社)

1% D-glucose

3.4% sucrose

pH 7 ~ 7.2

オートクレーブ滅菌後、培地 100 ml あたり 200 μl の 2.5 M

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 水溶液を添加。

### 0.5%グリシンを含む YEME 培地

YEME 培地をオートクレーブ滅菌後、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  水溶液と同時に培地 100ml あたり 2.5 ml の 20%グリシンを添加。

### A. missouriensis の培養条件の検討

*A. missouriensis* の野生株を PYM 寒天培地を用いて 2 日間 30°C で培養した。PYM 寒天培地から 1 cm 四方のプレート片を切り出して 50 ml の PYM 液体培地に植菌し、2 日間 30°C 120 rpm で培養した。この培養液を 1 ml ずつ各 50 ml の Q、BE、Bennett-maltose、mannitol soya flour、YEME (0.5%グリシンを含む)、YEME (0.5%グリシンを含まない) の 6 種の培地に植菌し (2%)、4 日間 30°C 120 rpm で培養した。培養後、1 g ずつ合成吸着剤を加え、カラムオープンで 2 時間攪拌した。合成吸着剤にはアンバーライト™ FPX66 (オルガノ社) を用いた。遠心により菌体及び合成吸着剤と培養上清を分離した。菌体と合成吸着剤を一晩凍結乾燥に供し、メタノールを加えた後ソニケーションによって菌体内と合成吸着剤表面の化合物を溶媒中に溶出させた。遠心により菌体と合成吸着剤を除き、上清を濾過して溶媒を回収した。溶媒を減圧濃縮し、1 ml のメタノールに溶かし切り 15000 rpm、1 min で遠心した。それぞれの上清を 100  $\mu\text{L}$  ずつバイアルに取り、LC-MS 分析に供した。LC-MS には Agilent 1100 series

(Agilent Technologies 社) 及び high-capacity trap plus system (Bruker Daltonics 社) を利用した。また、カラムには京都モノテック製 MonoBis 高圧タイプ ( $\phi$ 2.0 mm $\times$ 50 mm)を用いた。溶媒としてギ酸を終濃度 0.1 %となるようにそれぞれ加えた水と acetonitrile (ACN) を用意し、Table.2-7 に示したグラジエント系で濃度を変えながら流速 0.4 ml/min で分析した。

Table 2-7. LC-MS 溶媒のグラジエント

Time[min]	ACN の割合 [%]
0.0	5.0
2.0	5.0
30.0	100
32.0	100

#### Q 培地を用いた *A. missouriensis* による物質生産

*A. missouriensis* の野生株を培養していた PYM 寒天培地から 1 cm 四方を切り出して、50 ml の PYM 培地に植菌し、30°C、120 rpm で 2 日間培養した。5 L の三角フラスコ 4 本に 1 L ずつ Q 培地を作製し、*A. missouriensis* を培養していた PYM 培地を 1 ml 加えて植菌した。これを 30°C、150 rpm で 4 日間培養した。

## 化合物 1、2 の単離と構造決定

培養液に 2%量の XAD を加え、30°C、150 rpm で 2 時間震盪し、合成吸着剤に化合物を吸着させた。これを遠沈管に分注し、遠心により集菌した。上清を捨て、脱イオン水を加え洗浄した後、再び遠心し上清を捨てた。これを 3 回繰り返した後メタノールを加えた。ソニケーションにより菌体内及び合成吸着剤に吸着した化合物を抽出した。抽出液を濾紙で濾過し、減圧濃縮した。残留物を脱イオン水に溶かし切り、水と同量の酢酸エチルを加え vortex した。これを遠心し、上清である有機層を分取した。有機層を減圧濃縮し残留物をメタノールで溶かし切り、ゲル濾過クロマトグラフィーに供した。ゲル濾過クロマトグラフィーの担体には GE 社の Sephadex LH-20 を用いた。目的の化合物の UV スペクトルを示す分画を集めて濃縮し、1 ml のメタノールに溶かして逆相 HPLC で目的の化合物を単離した。HPLC は Waters 600E-996 (Waters 社) を利用し、カラムには DOCOSIL-B column 4.6 mm×250 mm (センシュー化学) を使用した。

単離した化合物は HR-MS 分析と NMR 分析によって構造を決定した。HR-MS 分析には Agilent 6500 series Accurate -Mass Q-TOF (Agilent Technologies 社) を、NMR 分析には JNM-A500 NMR system を用いた。

### 化合物 3 の単離と構造決定

化合物 3 は NMR 分析による構造決定が可能な収量を得られなかったため、さらに 23 L の培養液から単離した (計 26 L)。化合物 1、2 と同様の手順で水と酢酸エチルによる液液分離までを行い、回収した有機層を減圧濃縮した。残留物に攪拌子と 8 g の COSMOSIL 75C<sub>18</sub>-OPN (nacalai tesque) を加え、メタノールに懸濁し、攪拌した。減圧濃縮し残留物を吸着した COSMOSIL 75C<sub>18</sub>-OPN をカラムに充填し、Purif-Compact A (昭光サイエンス) による逆相 medium pressure liquid chromatography (MPLC) に供した。分離用のカラムには Purif-Pack<sup>®</sup>-ODS-25 μm SIZE: 60 (昭光サイエンス) を使用した。溶媒として 0.1%ギ酸を添加した 10%メタノール水溶液とメタノール (MeOH) を用意し、メタノールの濃度を変えながら (Table 2-8) 流速 20 ml/min で 40 分間流した。

**Table 2-8. MPLC 溶媒のグラジエント**

Time [min]	MeOH の割合 [%]
0.0	10.0
2.0	10.0
22.0	100
40.0	100

化合物 3 の UV スペクトルを示す分画を集めて濃縮し、1 ml のメタノールに溶かし、LC-20AT HPLC system (島津製作所) による逆相 HPLC に供し、化合物

**3** を精製した。まず COSMOSIL C<sub>18</sub>-AR-II Packed Column 10 mm × 250 mm (nacalai tesque) で一度精製し、さらに COSMOSIL πNAP Packed Column 10 mm × 250 mm (nacalai tesque) を用いて精製した。

単離した化合物 **3** は **1**、**2** と同様に HR-MS と NMR によって構造決定した。



## 第3章 異種発現による2組のKS-CLFとHCS cassetteの機能解析

### 3.1 目的

前任者によって *S. lividans* を宿主として *fog* クラスターの min PKS である *fogA9-A11* のみ、または *fogA1-A12* を強制発現する実験が行われていた。その結果、*fogA9-A11* 発現株、*fogA1-A12* 発現株ともに生産した化合物 **4**、**5** が acetyl 基を開始基質として KS-CLF が合成する II 型 PKS のシャント化合物 SEK4、SEK4b であることが示唆されていた (**Figure 3-1, A**)。また、*fogA1-A12* を強制発現した場合のみ未知化合物 **6** が生合成されることが判明しており、**6** は SEK4 の C-16 位に (*E*)-2-butene が付加した構造であると予想されていた。さらに、前任者によって **6** の脱水体と推測される化合物 mpSEK4b の構造決定がなされていた (**Figure 3-1, B**)。SEK4 と共通の骨格を有すると予想されたため、化合物 **6** は HCS cassette 酵素群の合成する  $\beta$ -アルキル化された開始基質を FogA10A9 が利用し合成するポリケタイドのシャント化合物であると考えられた。

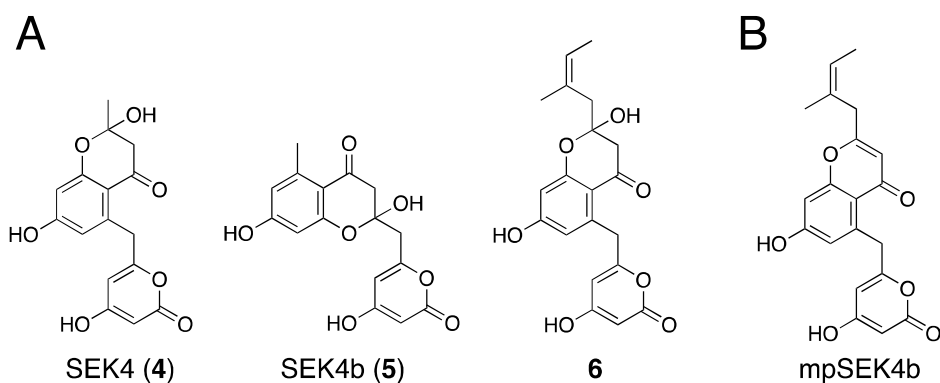


Figure 3-1. 前任者による異種発現実験において生産された化合物の予想構造と

### 実際に構造決定された化合物 mpSEK4b

A, *fogA9-A11* 発現株、*fogA1-A12* 発現株が共通して生産することが示唆された化合物 SEK4、SEK4b の構造と *fogA1-A12* 発現株のみ生産した化合物 **6** の予想された構造; B, **6** の脱水体と予想される実際に単離・構造決定された mpSEK4b の構造。

前章で述べた実験の結果 *A. missouriensis* から 3 つの fogacin 類 (fogacin B

(**1**)、fogacin (**2**)、fogacin C (**3**)) が単離された。NMR 分析による構造解析から **3**

には  $\beta$ -アルキル化された分枝構造が存在し、**1**、**2** にはこれが存在しないことが

判明した。**3** のみが持つこの構造は、先行研究で *fogA1-A12* 強制発現株が生産

し *fogA9-A11* 発現株は生産しなかった未知化合物 **6**、そして実際に *fogA1-A12*

強制発現株から単離・構造決定がなされた **6** の脱水体と予想される化合物

(Figure 3-1, B) に共通していた。このため、**3** は HCS cassette 酵素群が合成する

$\beta$ -アルキル化された構造を含む (*Z*)-3-methylpent-3-enoyl 基 (MP 基) を開始基質

として生合成されると予想された。また、**1**、**2** は一般的な II 型 PKS 産物と同

様に ACP に結合した malonyl 基の脱炭酸によって形成される acetyl 基を開始基質として生産されたと考えられた。

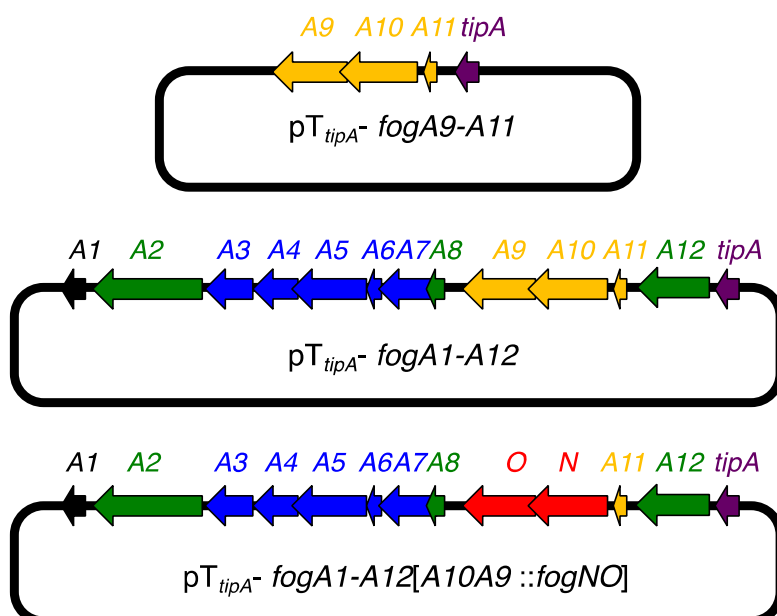
前章の実験結果と先行研究で行われた異種発現実験の結果を基に、fogacin 類の生合成は HCS cassette に隣接する *fogA9-A11* にコードされた min PKS が担っていると予想された。しかし、*fog* クラスターにはもう 1 組の KS-CLF 遺伝子 *fogNO* が存在する。*fogNO* の近傍には ACP をコードする遺伝子は存在しないが、*fogNO* 周辺の遺伝子には polyketide cyclase/dehydrase ホモログ (*fogP*, AMIS\_50660)、short chain dehydrogenase (*fogS*, AMIS\_50680) 等、芳香族ポリケタイド修飾に関連すると予想される酵素がコードされている。このため、*fogNO* にコードされた KS-CLF ホモログもまた FogA11 と min PKS を構成し fogacin 類生合成に関与する可能性が考えられた。そこで *fogNO* と fogacin 類生合成の関係を検証するため、異種発現実験による *fogNO* の機能解析を行った。

## 3.2 実験と結果

### 3.2.1 異種発現による *fogNO* の機能解析

#### 3.2.1.1 発現用プラスミドの構築

*fogNO* 異種発現用プラスミドは、*fogA1-A12* 発現用ベクター上の *fogA10A9* を *fogNO* に置き換えることで構築を試みた。まず、前任者の作製した pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12* (Figure 2-13) の KS-CLF 遺伝子 (*fogA10A9*) を大腸菌 GB2005-red 株を用いてクロラムフェニコール耐性遺伝子 (*Cm*) に置き換えた。制限酵素と Gibson Assembly システム (NEW ENGLAND BioLabs) で処理を行い、*Cm* が *fogNO* に置き換わった pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12*[*fogA10A9::fogNO*] を作製した (Figure 3-2)。

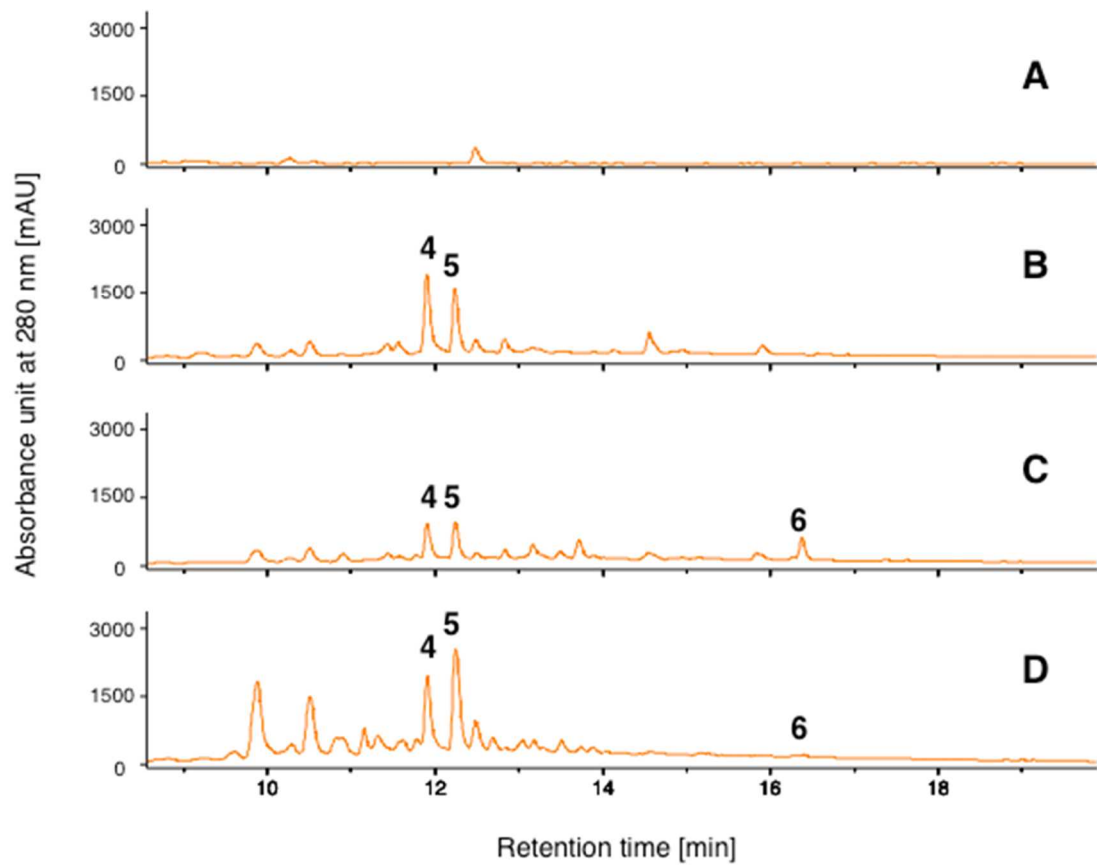


**Figure 3-2. 前任者の構築した pT<sub>tipA</sub>-fogA9-A11、pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12 と本実験で構築した pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]**

pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12 は大腸菌と放線菌のシャトルベクターである pTONA5(a) (Hatanaka *et al.*, 2008) に fogA1-A12 と tipA プロモーターを導入したプラスミドである。pTONA5(a) は kanamycin 耐性遺伝子 (*km*) の他に thiostrepton 耐性遺伝子 (*tsr*) を有しており、培養液に thiostrepton を添加することで tipA 下流の遺伝子の発現を誘導することができる。fogNO の遺伝子産物が KS-CLF として機能した場合、pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]を形質転換した菌株に thiostrepton で発現誘導をかけると、pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12 形質転換株の生産した化合物 4、5、6 の内いずれかが生産されると予想した。

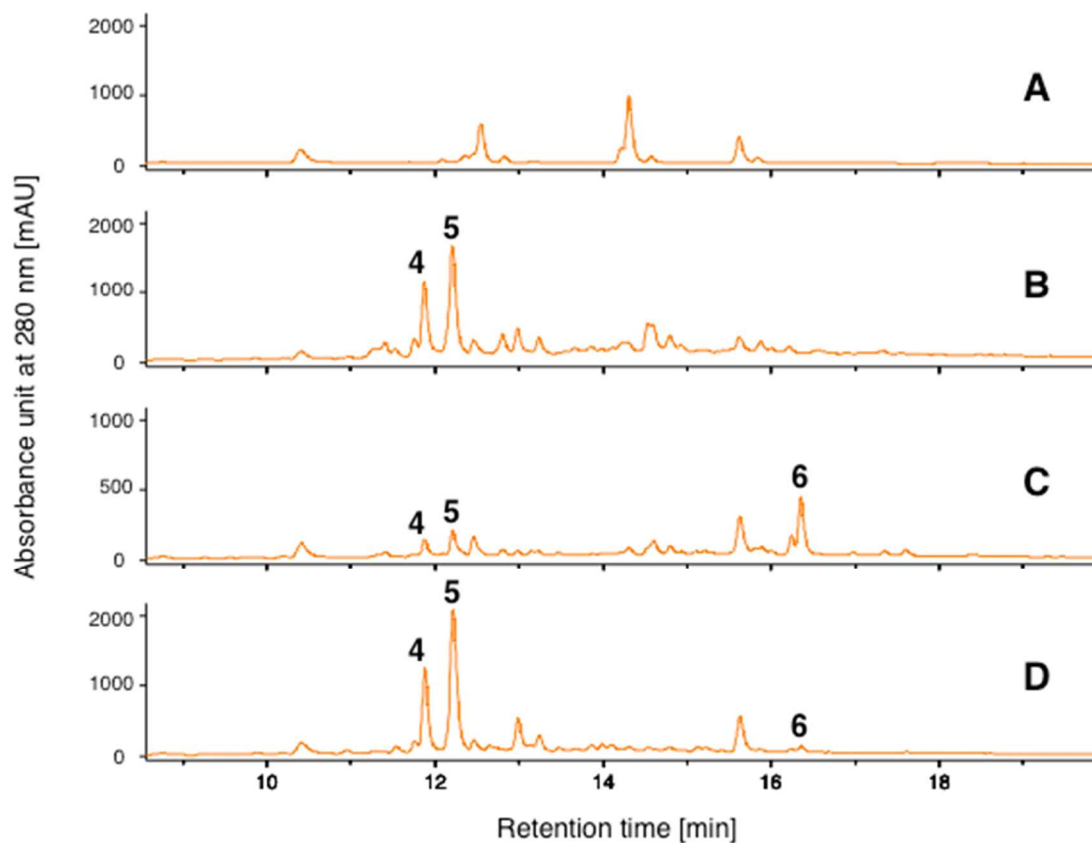
**3.2.1.2 異種発現実験**

宿主には異種発現実験に実績のある *Streptomyces albus* J1074 株と *S. lividans* TK21 株を用いた。作製した pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]と前任者によって作製された pT<sub>tipA</sub>-fogA9-A11、pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12、さらにコントロールとして pTONA5(a) をそれぞれ *S. lividans* と *S. albus* に導入した。各株を YEME 培地で培養した。培養終了後、各株の生産物を酸性条件下、酢酸エチルで抽出し LC-MS 分析に供した (Figure 3-3、3-4)。



**Figure 3-3. *S. albus* 形質転換体培養抽出物の LC-MS 分析結果**

A, コントロール; B, *fogA9-A11* 発現株; C, *fogA1-A12* 発現株; D, *fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株



**Figure 3-4. *S. lividans* 形質転換体培養液抽出物の LC-MS 分析結果**

A, コントロール; B, *fogA9-A11* 発現株; C, *fogA1-A12* 発現株; D, *fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株

まず *S. albus* における結果を説明する。コントロールからは化合物 4、5、6 のいずれも検出されなかった。

化合物 4、5 は全ての形質転換体が共通して生産した。*fogA9-A11* 発現株が生産したことから化合物 4、5 は改めて II 型 PKS のシャント化合物 SEK4、SEK4b であると示唆された。また、*fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株も化合物

4、5を生産したことから *fogNO* がコードする KS-CLF がポリケタイド鎖を合成することが示された。

*fogA1-A12* 発現株の培養抽出物から検出された化合物 6 は *fogA9-A11* 発現株からは検出されなかった。このことから、化合物 6 の生合成には HCS cassette にコードされた酵素群が関与することが改めて示された。また、化合物 6 は *fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株の培養液抽出物からもわずかながら検出された。

*S. lividans* においても同様の結果が得られた (Figure 3-4)。

### 3.2.2 強制発現により生産された化合物の構造決定

*S. lividans* TK21 株、*S. albus* J1074 株を用いた異種発現実験において、*fogA1-A12* 発現株と *fogA1-A12[fogA10A9::NO]* 発現株が生産した化合物 6 は、SEK4 (4) (Fu *et al.*, 1994) の C-16 に (*E*)-2-butene が付加した構造を有することが強く示唆されていた。これを確認するために化合物 6 の単離と構造決定を行った。

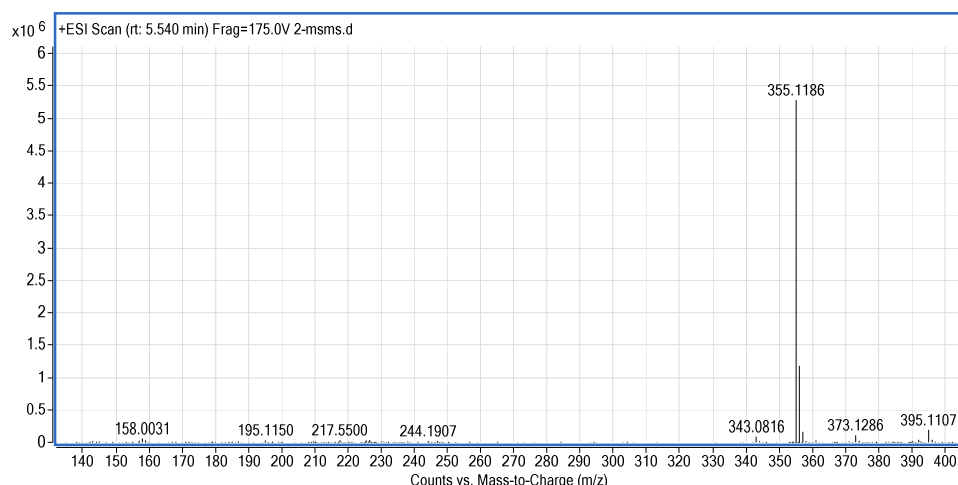
*S. albus* J1074 pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12* 発現株を 4 L の R5MS 液体培地で培養した。培養液から目的の化合物を抽出し、逆相 medium pressure liquid chromatography (MPLC)、逆相 HPLC で精製した。逆相 HPLC で精製を行った際、化合物 6 の溶出時間の直前に化合物 7 が発見された (Figure 3-22 参照)。化合物 7 が SEK4b (5) と同様の UV 波形を示したため、これは SEK4b の C-16 に (*E*)-2-



butene が付加した構造を有すると予想し、確認のため **6** に加え **7** も精製した。その結果、13.7 mg の化合物 **6** と 4.3 mg の化合物 **7** を取得した。精製後、HR-MS による分子量の推定と  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR および COSY、HMBC、HMQC といった二次元 NMR による構造解析を行い化合物 **6**、**7** の構造を同定した。

### 3.2.2.1 化合物 **6** の構造決定

HR-MS 分析による化合物 **6** の測定の結果、 $m/z$  355.1186 が観測された (**Figure 3-5**)。これは組成式  $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$  の化合物に 1 つのプロトンが付加したと仮定して算出される質量 355.1176 Da との差が 1 mDa であり、 $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_6$  の組成式は先行研究で前任者が構造決定した **6** の脱水体と予想された化合物 (**Figure 3-1, B**) と一致する。また、同時に  $m/z$  373.1286 が検出された。これは組成式  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$  の化合物にプロトンが付加したと仮定して算出される質量 373.1282 Da との差が 1 mDa 未満である。さらに NMR 分析の結果がこれを支持していたことから化合物 **6** の組成式は  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_7$  であると判明した。



**Figure 3-5. 化合物 6 の HR-MS 分析で得られた MS スペクトル**

続いて NMR 分析の結果を説明する。C-19、C-20 は  $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$  NMR、HMQC の結果から methyl 基であると判明した (Figure 3-9, 3-11, 3-12)。C-19 に結合した 1.50 ppm の  $^1\text{H}$  シグナルは COSY の結果 5.36 ppm にあるカルテットの  $^1\text{H}$  シグナルと相関を見せた (Figure 3-10)。HMQC の結果これは C-18 に結合していることが判った。さらに HMBC の結果、C-19 の  $^1\text{H}$  シグナルは 130.8 ppm にある C-17 の  $^{13}\text{C}$  シグナルと相関を見せた (Figure 3-13)。C-20 に結合した 1.74 ppm の  $^1\text{H}$  シグナルは HMBC の結果 C-18 と相関を示した。さらに、C-20 は HMBC において 41.8 ppm にある C-16 の  $^{13}\text{C}$  シグナルとも相関を見せた。HMQC の結果から、C-16 には 4.01 ppm と 4.13 ppm に検出された 2 つの水素原子が結合していると判明した。以上のことから化合物 6 には methylbutene 様の部分構造があることが明らかになった (Figure 3-6)。



**Figure 3-6. 化合物 6 の部分構造**

A, Z 体の部分構造; B, E 体の部分構造

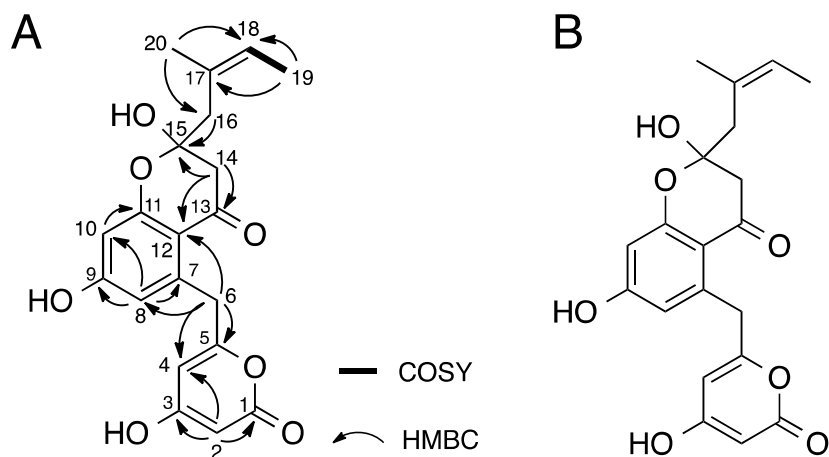
この部分構造には Z 体と E 体の 2 つの異性体が考え得る (Figure 3-6)。Z 体であった場合、C-20 の  $^{13}\text{C}$  シグナルは  $\delta 21 \sim 28$  ppm 程度に検出されると考えられる (Figure 3-6A)。一方、E 体であった場合 C-20 は C-19 と *cis* 側に位置することになり、C-19 からの立体圧縮を受ける。これにより C-20 の  $^{13}\text{C}$  シグナルは高磁場側に移動し  $\delta 11 \sim 18$  ppm 程度に検出される (Figure 3-6B)。C-20 の  $^{13}\text{C}$  シグナルが 25.2 ppm であることから、この部分構造は Z 体であると判明した。C-1 ~ C-15 の構成する構造については NMR 分析によって得られたスペクトルを SEK4 の文献値と比較し、これらの炭素原子が SEK4 の構造を形成していることを確認した (Fu *et al.*, 1994a, Table 3-2, Figure 3-8)。

7.28 ppm に存在する  $^1\text{H}$  シグナルは、HMQC の結果 128.4 ppm の  $^{13}\text{C}$  シグナルと相関を示した。これらのシグナルは他のシグナルとは相関を見せなかったことから、NMR 分析のためにサンプルを脱水する際、共沸により脱水の効率を上げる目的で加えたベンゼンのものであることが判明した。

以上により化合物 6 の構造が同定された (Figure 3-7)。

Table 3-1. 化合物 6 の NMR 分析で得られたシグナル

position	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
1		164.0
2	5.13 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	88.4
3		170.7
4	5.58 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H)	99.8
5		165.5
6	4.01 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 4.13 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H)	37.7
7		138.7
8	6.30 (d, <i>J</i> = 2.5 Hz, 1H)	113.3
9		163.1
10	6.23 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	103.0
11		161.7
12		111.4
13		191.1
14	2.41 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 2.76 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H)	47.1
15		103.0
16	2.44 (d, <i>J</i> = 14.0 Hz, 1H), 2.63 (d, <i>J</i> = 14.0 Hz, 1H)	41.8
17		130.8
18	5.36 (q, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H)	123.6
19	1.50 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H)	14.0
20	1.74 (s, 3H)	25.2

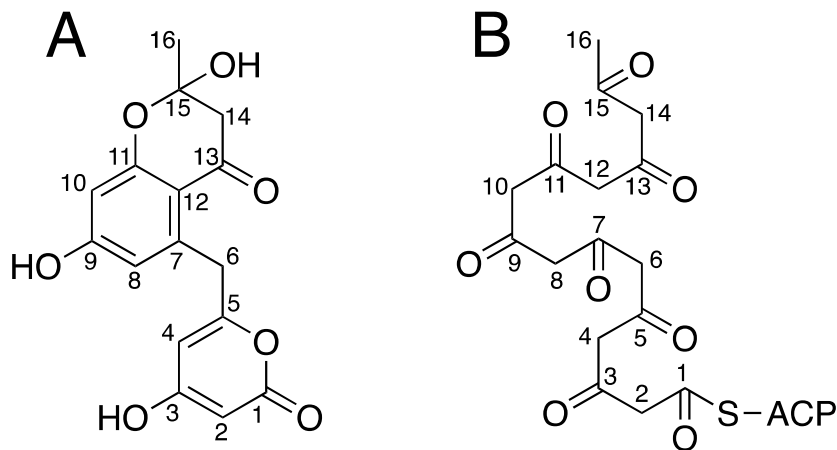


**Figure 3-7. NMR の結果から同定された化合物 6 の構造**

A,各番号に対応する水素原子及び炭素原子の位置と二次元 NMR で検出された原子同士の相関;  
B, 化合物 6 の構造

**Table 3-2. SEK4 の NMR データ (Fu *et al.*, 1994a より引用)**

position	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
1	11.6 (s, 1OH)	165.4
2	5.19 (d, <i>J</i> = 2.28 Hz, 1H)	88.2
3		170.5
4	5.66 (d, <i>J</i> = 2.24 Hz, 1H)	102.9
5		163.8
6	4.07 (d, <i>J</i> = 15.7 Hz, 1H), 4.16 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H)	37.6
7		138.6
8	6.33 (d, <i>J</i> = 1.6 Hz, 1H)	112.9
9	10.5 (s, 1OH)	161.9
10	6.26 (d, <i>J</i> = 1.96 Hz, 1H)	100.6
11		162.9
12		111.3
13		191.1
14	2.54 (d, <i>J</i> = 15.9 Hz, 1H), 2.92 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H)	49.3
15	6.90 (s, 1H)	99.6
16	1.56 (s, 3H)	27.5



**Figure 3-8. SEK4 の構造とオクタケタイド鎖の環化様式**

A, SEK4 の構造; B, オクタケタイド鎖が SEK4 に変換される際の炭素骨格の様式







Figure 3-10. 化合物 6 の COSY で得られたシグナル





**Figure 3-12.** 化合物 6 の HMQC で得られたシグナル



### 3.2.2.2 化合物 7 の構造決定

HR-MS 分析による化合物 7 の測定の結果、 $m/z$  373.1286 が観測された (Figure 3-14)。このことから、7 は 6 と同様に組成式は  $C_{20}H_{20}O_7$  であると判明した。

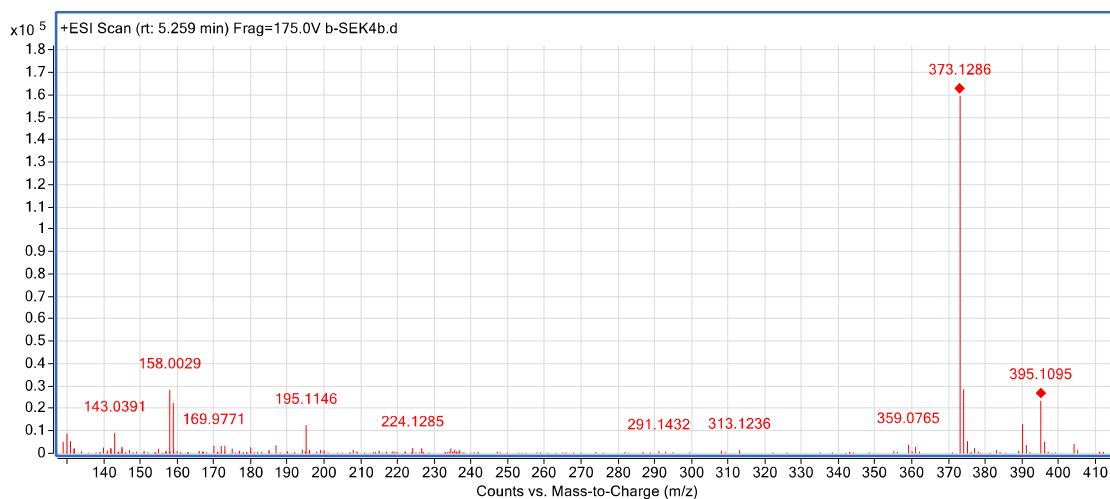


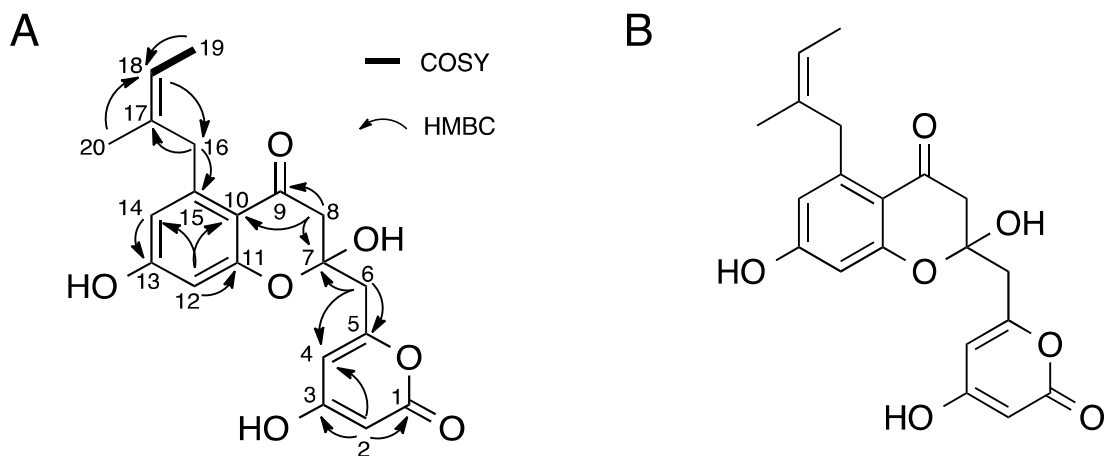
Figure 3-14. 化合物 7 の HR-MS 分析で得られた MS スペクトル

続いて化合物 7 の NMR 分析の結果を述べる。 $^1H$ 、 $^{13}C$  NMR、HMQC の結果から methyl 基 C-19、C-20 の存在が判明した (Figure 3-17, 3-19, 3-20)。COSY、HMBC の結果から、化合物 6 の場合と同様に C-19、C-20 は C-18、C-17、C-16 と methylbutene 様の分枝構造を形成していることが判明した (Figure 3-6, 3-18, 3-21)。NMR 分析によって得られた C-1 ~ C-15 のスペクトルを SEK4b の文献値と比較しながら構造を決定した (Fu *et al.*, 1994b, Table 3-4, Figure 3-16)。

以上により化合物 7 の構造が同定された (Figure 3-15)。

Table 3-3. 化合物 7 の NMR 分析で得られたシグナル

position	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
1		164.0
2	5.22 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	89.0
3		170.8
4	6.21 (d, <i>J</i> = 1.0 Hz, 1H)	103.7
5		160.4
6	2.97 (d, <i>J</i> = 14.5 Hz, 1H), 3.04 (d, <i>J</i> = 14.5 Hz, 1H)	44.2
7		100.2
8	2.55 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H), 3.02 (d, <i>J</i> = 16.0 Hz, 1H)	47.7
9		190.6
10		111.8
11		161.2
12	6.30 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H)	101.7
13		163.1
14	6.36 (d, <i>J</i> = 1.5 Hz, 1H)	109.8
15		144.0
16	3.72 (dd, <i>J</i> = 16.5, 21.0 Hz, 2H)	35.0
17		133.7
18	5.42 (q, <i>J</i> = 6.5 Hz, 1H)	121.2
19	1.53 (d, <i>J</i> = 7.0 Hz, 3H)	13.3
20	1.55 (s, 3H)	23.6



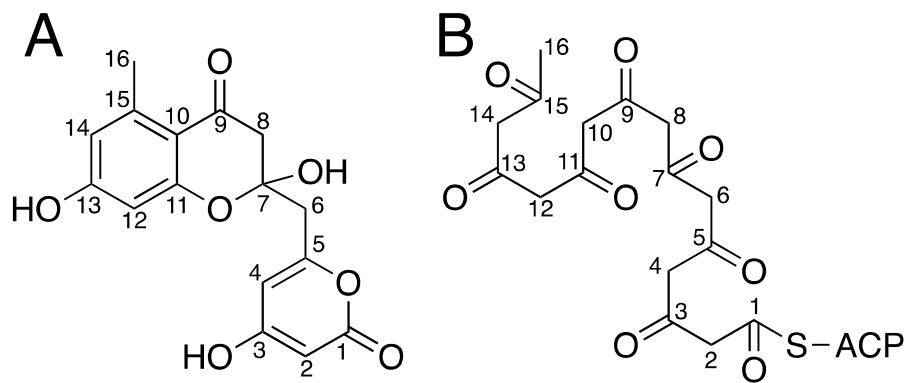
**Figure 3-15. NMR の結果から同定された化合物 7 の構造**

A, 各番号に対応する水素原子及び炭素原子の位置と二次元 NMR で検出された原子同士の相関;  
 B, 化合物 7 の構造

**Table 3-4. SEK4b の NMR データ (Fu *et al.*, 1994b より引用)**

position	<sup>1</sup> H NMR	<sup>13</sup> C NMR
1	11.76 (s, 1OH)	164.0
2	5.32 (d, $J = 2.04$ Hz, 1H)	88.9
3		172.2
4	6.18 (d, $J = 1.88$ Hz, 1H)	104.6
5		160.4
6	3.08 (d, $J = 14.2$ Hz, 1H), 3.15 (d, $J = 14.4$ Hz, 1H)	44.2
7	7.20 (s, 1OH)	100.2
8	2.64 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H), 3.10 (d, $J = 16.2$ Hz, 1H)	47.5
9		190.3
10		111.9
11		161.4
12	6.26 (d, $J = 1.96$ Hz, 1H)	101.6
13	10.40 (s, 1OH)	162.8
14	6.36 (d, $J = 2.04$ Hz, 1H)	112.7
15		142.5
16	2.55 (s, 3H)	22.6





**Figure 3-16. SEK4b の構造とオクタケタイド鎖の環化様式**

A, SEK4b の構造; B, オクタケタイド鎖が SEK4b に変換される際の炭素骨格の様式





Figure 3-18. 化合物 7 の COSY で得られたシグナル

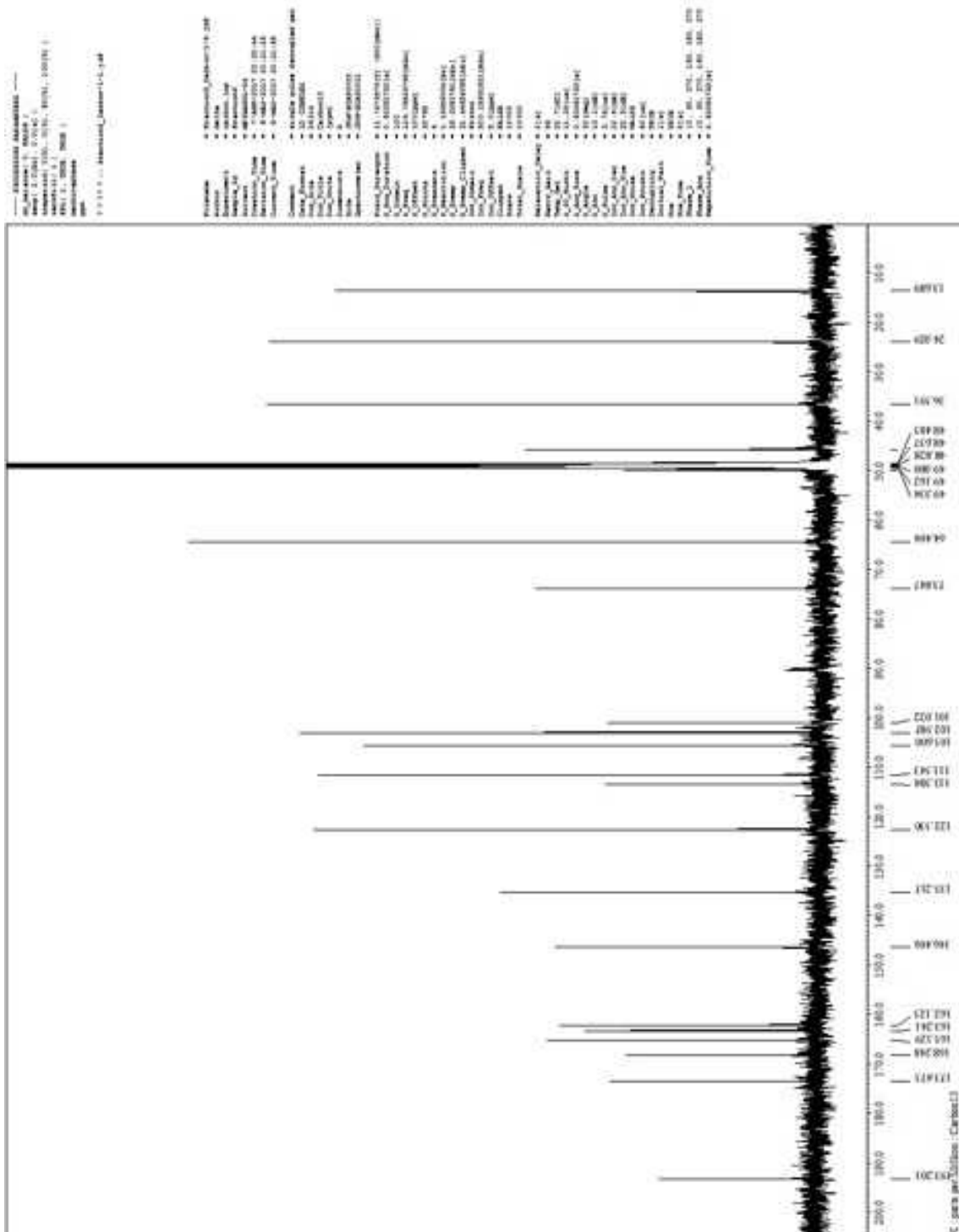


Figure 3-19. 化合物 7 の  $^{13}\text{C}$  NMR で得られたシグナル



Figure 3-20. 化合物 7 の HMQC で得られたシグナル

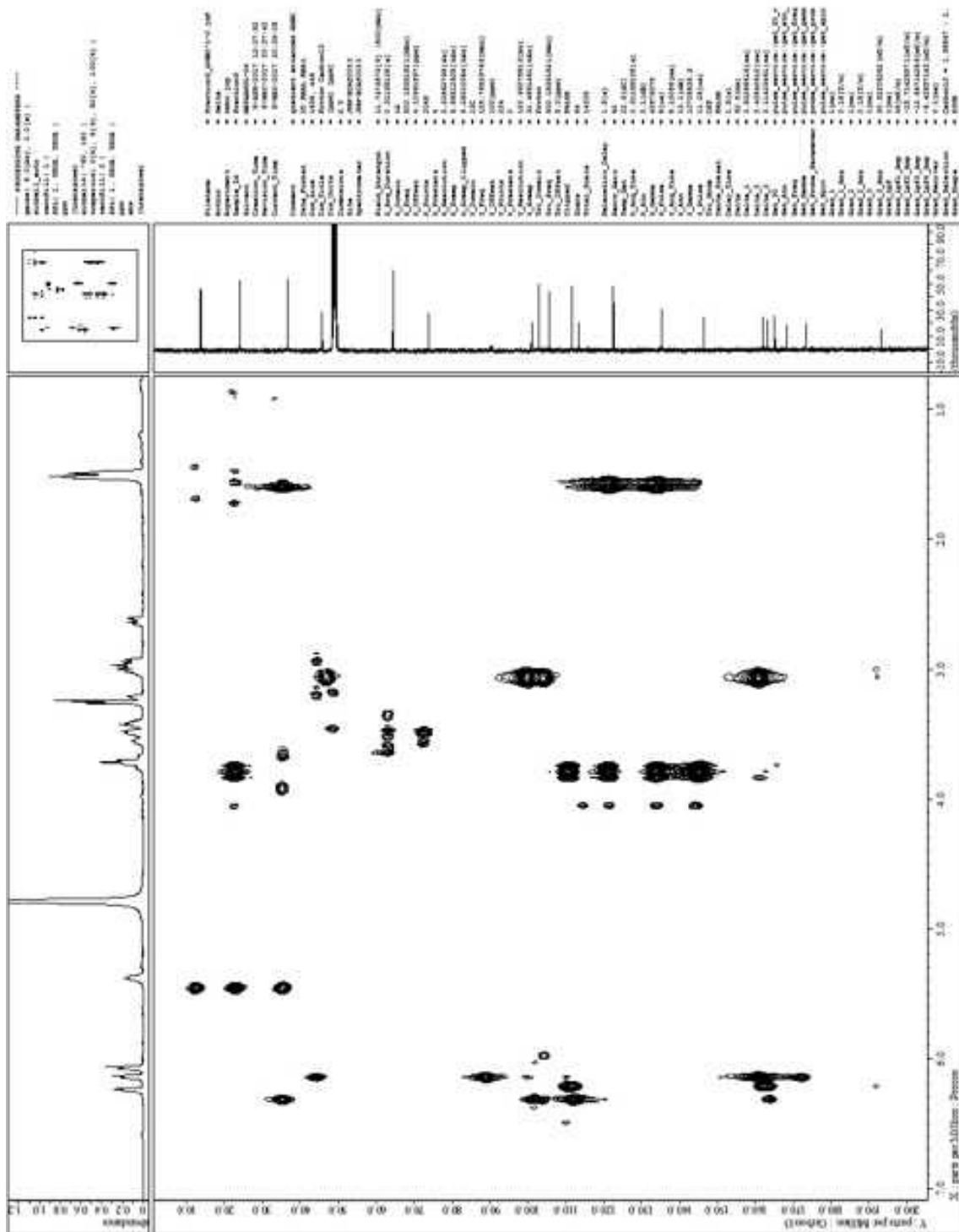


Figure 3-21. 化合物 7 の HMBC で得られたシグナル



### 3.2.2.3 改良した分析系での異種発現実験

すでに行った異種発現実験の分析系では化合物 **6**、**7** の溶出時間が重複していた (**Figure 3-3, 3-4**)。そこで、**6** と **7** のピークが分離することで、それぞれの化合物をより明瞭に解析出来る条件を検討した。まず、化合物の生産量を上げるため培地を YEME から化合物 **6**、**7** の精製に使用した R5MS に変更した。次に、**6** と **7** のピークが分離する条件を検討し、LC-MS 分析で使用するカラムを nacalai tesque 社製の COSMOSIL 5PYE Packed Column 2.0 mm × 150 mm に変更した。*S. albus* J1074 pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12 発現株を R5MS 培地で培養し、培地抽出物を LC-MS 分析に供した (**Figure 3-22**)。また、SEK4、SEK4b、そして精製した **6**、**7** を標品として分析に供した。SEK4、SEK4b は武蔵野大学の市瀬浩志教授に分与していただいたものを使用した。

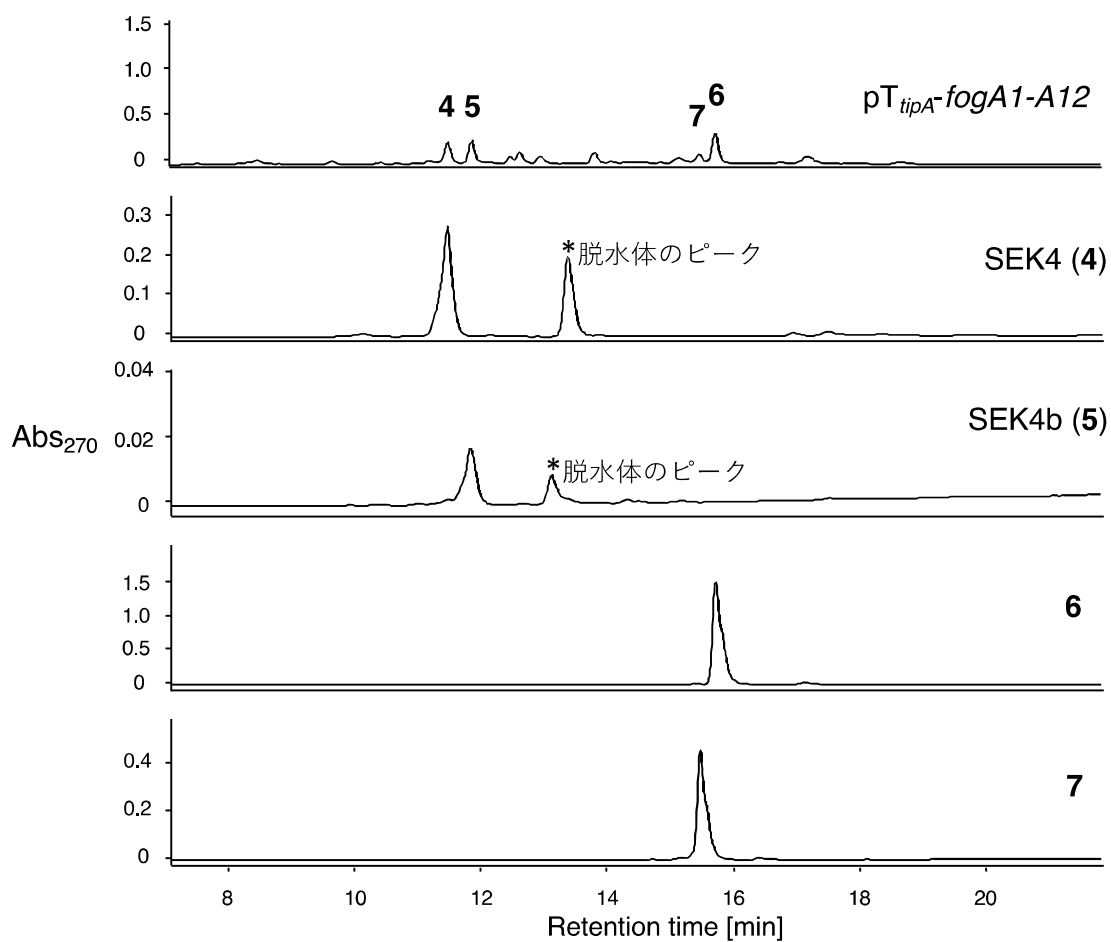


Figure 3-22.  $pT_{tipA-fogA1-A12}$  発現株と各化合物の溶出時間の比較

結果として  $pT_{tipA-fogA1-A12}$  発現株の培地抽出物中の各化合物の溶出時間は全て標品と一致し、 $fogA1-fogA12$  の強制発現によって生産される各化合物の構造が確認された。

さらに  $pT_{tipA-fogA9-A11}$ 、 $pT_{tipA-fogA1-A12}$ 、 $pT_{tipA-fogA1-A12}[fogA10A9::fogNO]$  で形質転換した *S. albus* J1074 株による生産物の比較を行った (Figure 3-23)。

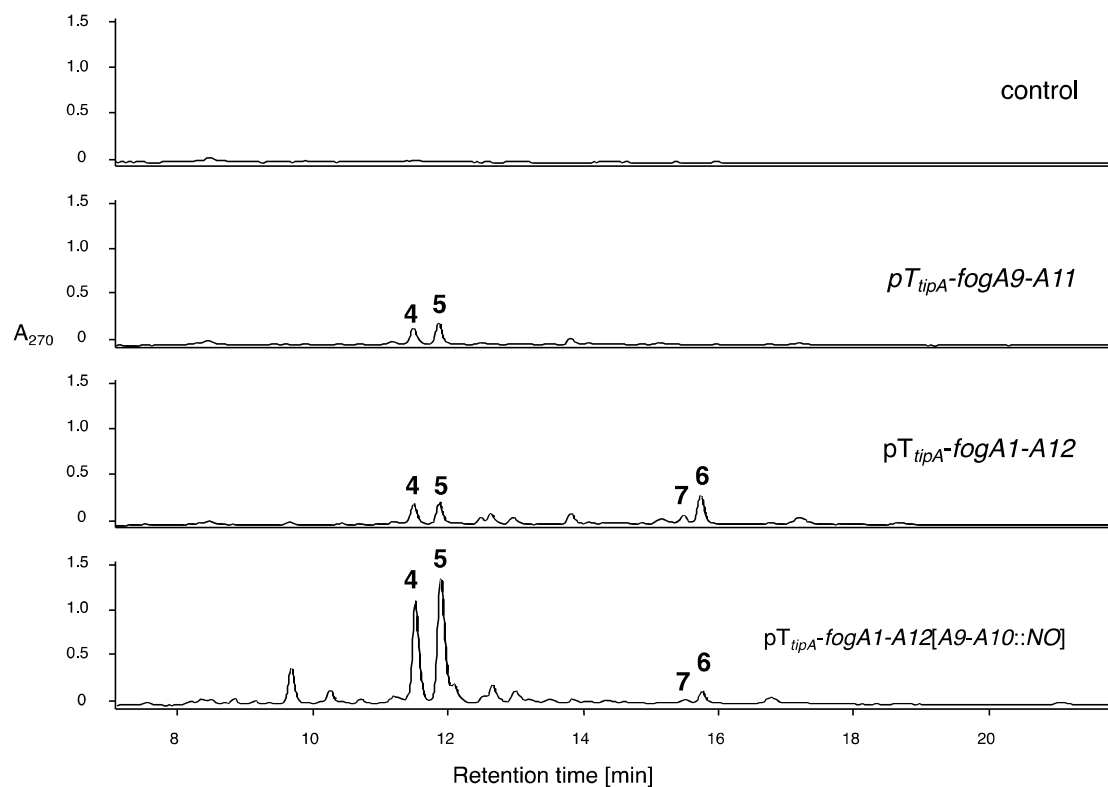


Figure 3-23. 各異種発現株の生産物の LC-MS 分析結果

結果を説明する。*fogA9-A11* 発現株は SEK4 (4)、SEK4b (5)のみを生産した。*fogA1-A12* 発現株と *fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]*発現株は 4、5、6、7 全てを生産した。*fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]*発現株は 4、5 を最も多く生産した。一方で、6、7 は *fogA1-A12* 発現株が最も多く生産した。

### 3.3 考察

本実験の結果、先行研究から予想されていた化合物 **6** の構造が同定された (**Figure 3-7**)。予想された通り、**6** は SEK4 (**4**) の C-16 位に (*E*)-2-butene が付加した分枝構造を有していた。また、同様の分枝構造と SEK4b (**5**) 骨格を有する化合物 **7** が新たに単離、同定された (**Figure 3-15**)。 *fogA9-A11* 発現株が **4**、**5** のみを生産したこと、および *fogA1-A12* 発現株と *fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株が **6**、**7** を生産したことから (**Figure 3-3, 3-4, 3-23**)、**6**、**7** に特有の分枝構造は HCS cassette にコードされた酵素群によって形成されることが改めて示唆された。 fogacin C (**3**) もまた **6**、**7** と共通する分枝構造を有している。本実験の結果から、fogacin C (**3**) の分枝構造も HCS cassette 酵素群により形成されることが考えられた。

*S. albus*、*S. lividans* のいずれの場合も *fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株は SEK4 (**4**)、SEK4b (**5**) を生合成した (**Figure 3-3, 3-4, 3-23**)。これにより、*fogNO* にコードされた KS-CLF (FogNO) は酢酸を開始基質とするオクタケタイドを合成することが明らかになった。また、*fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株は化合物 **6**、**7** も生産した。しかし、その生産量は *fogA1-A12* 発現株と比較すると少量であった。このことから、FogNO は HCS cassette にコードされた酵素群の合成する (*Z*)-3-methylpent-3-enoyl 基 (MP 基) に対する基質認識が FogA10A9 よりも

弱いことが示唆された。一方で、**4**と**5**の生産量は *fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]* 発現株が *fogA1-A12* 発現株を上回っていた。これにより、**4**、**5**合成の開始基質に当たる acetyl 基に対する基質認識では FogNO の方が FogA10A9 よりも強いことが示唆された。

*pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]*は、HCS cassette に *fogNO* を隣接させ、上流の *tipA* プロモーターによりまとめて発現するように作製したベクターである。しかしながら、*A. missouriensis* が持つ *fog* クラスター上では、HCS cassette と *fogNO* の間には II 型 PKS の修飾酵素遺伝子や糖の合成、転移を触媒する酵素の遺伝子などが多く存在している。このため、互いの遺伝子座には約 20 kb の距離がある。従って、今回 *fogNO* が HCS cassette と協働して **6**、**7**を生産したことは、ベクター上で無理矢理オペロンを形成させたために生じた人為的なものである可能性が考えられる。

以上の考察から、FogA10A9 と FogNO の 2 組の KS-CLF は *A. missouriensis* 菌体内でそれぞれ異なる開始基質を用いて構造の異なるオクタケタイド鎖を合成することが予想された。予想では FogA10A9 は HCS cassette 酵素群によって合成された MP 基を選択的に使用してオクタケタイド鎖を合成する。一方で、FogNO は *A. missouriensis* 菌体内において acetyl 基をオクタケタイド鎖合成の開

始基質として選択すると考えられた。これらを基に、*A. missouriensis* の fog ク

ラスターによる fogacin 類の生合成機構を予想した (Figure 3-24)。

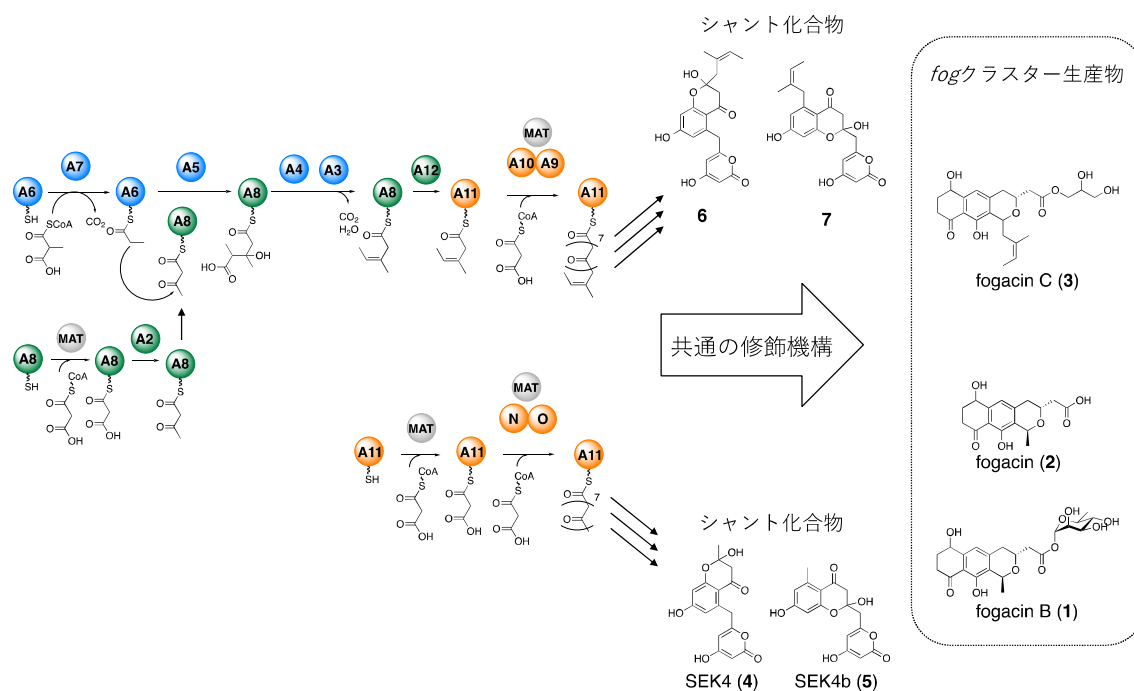


Figure 3-24. 予想された fogacin 類の生合成機構

まず、HCS cassette 酵素群による開始基質合成についての予想を述べる。

HCS cassette を構成する *fogA2-A8* にはそれぞれ KS (*fogA2*)、ECH ホモログ (*fogA3*、*fogA4*)、HCS ホモログ (*fogA5*)、ACP (*fogA6*、*fogA8*)、AT/DC ホモログ (*fogA7*) がコードされている。最初に FogA2 (KS) が malonyl-ACP<sub>FogA8</sub> を縮合し acetoacetyl-ACP<sub>FogA8</sub> が合成される。この時基質として利用される malonyl-

ACP<sub>FogA8</sub> は、MAT が malonyl-CoA の malonyl 基を FogA8 に転移することで生産される。次に FogA7 (AT/DC) が methylmalonyl-CoA の methylmalonyl 基を FogA6 に転移し、methylmalonyl-ACP<sub>FogA6</sub> が形成される。FogA7 はさらに methylmalonyl-ACP<sub>FogA6</sub> を脱炭酸し propionyl-ACP<sub>FogA6</sub> が合成される。propionyl-ACP<sub>FogA6</sub> の propionyl 基は FogA5 (HCS) によって acetoacetyl-ACP<sub>FogA8</sub> の β 位に転移し (β-アルキル化)、2,3-dimethyl-3-hydroxygluraryl-ACP<sub>FogA8</sub> (DMHG-ACP<sub>FogA8</sub>) が合成される。その後、2つの ECH ホモログ FogA3、FogA4 が DMHG-ACP<sub>FogA8</sub> を脱水、脱炭酸し(Z)-3-methylpent-3-enoyl-ACP<sub>FogA8</sub> (MP-ACP<sub>FogA8</sub>) が合成される。その後、KSIII ホモログである FogA12 によって MP-ACP<sub>FogA8</sub> の MP 基は min PKS の ACP である FogA11 へと転移し、KS-CLF によるポリケタイド鎖伸長反応の開始基質として利用される。Fogacin C (**3**)、化合物 **6**、**7** に共通する分枝構造はこの MP 基に由来すると予想した。

次に KS-CLF によるポリケタイド鎖合成についての予想を述べる。*fog* クラスターにコードされた2組の KS-CLF、FogA10A9、FogNO はともにオクタケタイド鎖を合成するが (**Figure 3-22, 3-23**)、これらの KS-CLF は開始基質に対する選択性が異なっている。FogNO は一般的な II 型 PKS と同様に、malonyl-ACP が脱炭酸して生じる acetyl 基を開始基質としてオクタケタイド鎖を合成する。このオクタケタイド鎖が *fog* クラスターにコードされた ketoreductase、cyclase

などの修飾酵素による反応を受けることにより fogacin (2) が合成される。さらに、rhamnose が fogacin に結合すると fogacin B (1) が形成される。オクタケタイド鎖がこれらの修飾反応を受けず非酵素的に環化した場合、SEK4 (4)、SEK4b (5) が形成される。一方で、FogA10A9 は HCS cassette 酵素群によって形成された MP 基に対する選択性が強く、これを開始基質として分枝構造を有するオクタケタイド鎖を合成する。このオクタケタイド鎖は非酵素的な環化により化合物 6、7 へと変換される。また、この分枝構造を有するオクタケタイド鎖が、fogacin 生合成経路上で FogNO の合成するオクタケタイド鎖と共通の機構による修飾反応を受けることによって分枝構造を有する fogacin 骨格が構築される。これに glycerol が結合することで、fogacin C (3) が生産されると予想した。

以上から、*A. missouriensis* が持つ fog クラスターは、基質選択性の異なる 2 組の KS-CLF と、一方の KS-CLF とのみ協働する HCS cassette 酵素群を用いて  $\beta$ -アルキル化されたポリケタイドを含む多様な構造の化合物を生産する可能性が示唆された。





### 3.4 実験項

#### 使用した菌株、プラスミド、培地、プライマー、化合物

##### ・菌株

異種発現の宿主に用いた *S. albus* J1074 株は東京大学の葛山智久准教授から分与していただいた。*S. lividans* TK21 株は The John Inne Centre より分与していただいた。クローニングに使用した大腸菌 JM109 株は Takara biochemical 社より購入した。また、pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12*[*fogA10A9::fogNO*]の作製に使用した大腸菌 GB2005-red 株は醗酵学研究室に保管してあった株を使用した。

##### ・プラスミド

異種発現用のプラスミドには前任者が作製した pT<sub>tipA</sub>-*fogA9-A11*、pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12* を使用した。コントロールとして用いた pTONA5(a) は東京大学の尾仲宏康教授から分与していただいた。

##### ・培地

*S. lividans* TK21 株と *S. albus* J1074 株の植え継ぎには Mannitol soya flour (MS) 寒天培地を用いた。

また、異種発現実験には YEME 培地または R5MS 培地を用いた。

### MS 寒天培地

2% agarose

2% mannitol

2% soya flour

オートクレーブ滅菌後、MS 培地 100 ml あたり 0.4 ml の 2.5 M

MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 水溶液を添加。

### YEME 培地

0.3% Bacto yeast extract (BD 社)

0.5% Bacto pepton

0.3% malt extract (BD 社)

1% glucose

pH 7 ~ 7.2

オートクレーブ滅菌後、YEME 培地 100 ml あたり 2.5 ml の 20 %

glycin と 200 μl の 2.5 M MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O の水溶液をそれぞれ加えた。

### R5MS 培地

1% glucose

0.5% Bacto yeast extract (BD 社)

0.01% casamino acid (BD 社)

0.573% TES

1.012% MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

0.025% K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

0.1% \*trace element solution

pH 7.2

\*trace element solution

50 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O

20 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

10 mM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O

10 mM ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

2 mM CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

2 mM CuCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O

2 mM NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O

2 mM NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O

2 mM Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>

2 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

・プライマー

本実験において設計、使用したプライマーは以下の通りである。

Table 3-5. 本実験で用いたプライマー

No.	配列 (5'→3')	備考
3-1	CACCAGGCGTTTAAGGGCAC	
3-2	TCGGCACGTAAGAGGTTCCA	
3-3	TCCGCTCGAAGGTGTCCGCTCGAAGCGGTCCGGGA TCGAAGTCGTTTAAACACCAGGCGTTTAAGGGCAC	<i>Dra</i> I サイトを下 線で示した。
3-4	ACTCCGCGCATGATGCTCGAGACCGTTCACCTGGC GGCCTGACCTTAAATCGGCACGTAAGAGGTTCCA	<i>Dra</i> I サイトを下 線で示した。
3-5	CGGGATCGAAGTCGTTTCATGCTCGGTACGTACGGA	
3-6	CCTGGCGGCCTGACCGTGTCCCGTCGTGTCGTGCT	

・化合物

異種発現株の生産物との比較の際、標品として用いた SEK4、SEK4b は武蔵野大学薬学研究所の市瀬浩志教授に分与していただいた。

pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12[fogA10A9::fogNO]の作製

醗酵学研究室に保管されていたプラスミド pACYC を鋳型にプライマー3-1、3-2 を用いて PCR を行い、クロラムフェニコール耐性遺伝子 (*Cm*) を増幅した。pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12 の fogA10 の 5'側の外側配列 44 bp と *Dra*I サイトを含むプライマー3-3、および fogA9 の 3'側の外側配列 44 bp と *Dra*I サイトを含むプライマー3-4 を用い、増幅した *Cm* を鋳型として PCR を行い、遺伝子組換え用配列 *Cm* rec を得た。pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12 と *Cm* rec をエタノール沈殿で脱塩し、エレクトロポレーションによって大腸菌 GB2005-red 株に導入した。この GB2005-red 株を LB 寒天培地 (34 mg/L クロラムフェニコール添加) で培養した。生育したコロニーを LB 培地 (34 mg/L クロラムフェニコール添加) で 37°C、終夜培養し、培養液から pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12[A10A9::*Cm*]を抽出した。

*A. missouriensis* のクロモソームを鋳型としプライマー3-5、3-6 を用いた PCR により fogNO 配列を増幅した。この断片は fogNO 配列の両端が pT<sub>tipA</sub>-fogA1-A12[A10A9::*Cm*]の *Cm* を欠失させた部位の両端の配列と 15 bp ほど相同配列を

もつ。この断片と *DraI* で処理した pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12*[*A10A9::Cm*] を Gibson Assembly Master Mix (NEW ENGLAND BioLabs 社) を用いて結合し、大腸菌 JM109 株を形質転換後、菌株を 50 mg/L カナマイシンを含む LB 寒天培地に植菌した。生育したコロニーをカナマイシンを含む LB 培地に植菌し 37°C で一晩培養した。培養液からプラスミドを抽出し pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12*[*fogA10A9::fogNO*] を取得した。

#### 異種発現株の生産物比較

pT<sub>tipA</sub>-*fogA9-A11*、pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12*、pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12*[*fogA10A9::fogNO*]、pTONA5(a) をそれぞれ *S. albus* J1074 株、*S. lividans* TK21 株に導入し MS 寒天培地で生育させた。この MS 寒天培地を 1 cm 四方切り出し 100 ml YEME 培地に植菌、3 日間、30°C、120 rpm で前培養した。前培養液を 100 ml YEME 培地に 5% 植菌し 30°C、120 rpm で培養した。48 時間後、終濃度 5 µg/ml の thiostrepton を添加しさらに 30°C、120 rpm で 4 日間培養した。培養液に塩酸を加え pH を 2.0 から 3.0 に調整し、酢酸エチルで液々分離にかけ (3 回)、回収した有機層を減圧濃縮した。得られた抽出物を 2 ml のメタノールに溶かし切り、LC-MS 分析に供した。LC-MS 分析には Agilent 1100 series (Agilent Technologies 社) 及び high-capacity trap plus system (Bruker Daltonics 社) を用いた。カラムには、

nacalai tesque 製 COSMOCORE 2.6C<sub>18</sub> 2.1 mm×150 mm を用いた。溶媒としてギ酸を終濃度 0.1%となるようにそれぞれ加えた水とアセトニトリル (ACN) を用意し、**Table.3-4** のグラジエントで濃度を変えながら流速 0.3 ml/min で分析した。

**Table 3-6. LC-MS 溶媒のグラジエント**

Time [min]	ACN の割合 [%]
0.0	5.0
2.0	5.0
30.0	100
32.0	100

#### 化合物の単離・精製のための大量培養

pT<sub>tipA</sub>-*fogA1-A12* を形質転換した *S. albus* J1074 株を、プラスミドの安定な保持を目的として終濃度 50 mg/L のカナマイシンを添加した MS 寒天培地上で 3 日間、30°C で生育させた。*S. albus* を生育させた MS 寒天培地を 1 cm 四方切り出し、100 ml の R5MS 培地 (50 mg/L カナマイシン添加) に植菌、2 日間、150 rpm、30°C で前培養した。前培養液を 4 L の R5MS 培地に 2% 植菌し、150 rpm、30°C で 48 時間培養した。培養液にチオストレプトンを終濃度 5 µg/ml となるよう添加し *fogA1-A12* の発現を誘導した後、さらに 4 日間培養した。

### 培養液中からの化合物 6、7 の粗抽出

培養液を回収し、合成吸着剤を 2% 加え、2 時間攪拌した。合成吸着剤にはアンバーライト™ FPX66 (オルガノ社) を用いた。遠心により菌体及び合成吸着剤と培養上清を分離した。回収した菌体と合成吸着剤にメタノールを加えた後ソニケーションによって菌体内と合成吸着剤表面の化合物を溶媒中に溶出させた。溶媒を濾過し、減圧濃縮した後、残留物に 80 ml の脱イオン水を加え、塩酸で pH 2.0~3.0 程度に調整した。この水溶液に等量の酢酸エチルを加え、液液分離した (3 回)。回収した有機層を減圧濃縮した。

### MPLC による粗精製

粗抽出後の残渣をメタノールに溶解させ、シリカゲル 60 (Merck Millipore) を 8 g 加え 1 時間攪拌した後減圧濃縮でメタノールを除いた。化合物が吸着したシリカゲルをベンゼンに懸濁し減圧濃縮にかける操作を 3 回行い、水、メタノールを除いた。ヘキサンに懸濁したシリカゲルをカラムに充填し、Purif-Compact A (昭光サイエンス) による順相 MPLC に供した。分離用のカラムには Purif-Pack®-EX SI-25 µm SIZE: 60 (昭光サイエンス) を使用した。溶媒としてヘキサンと酢酸エチル (EtOAc) を用意し、濃度を変えながら (Table 3-5) 流速 20 ml/min で 40 分間流した。



**Table 3-7. MPLC 溶媒のグラジエント**

Time [min]	EtOAc の割合 [%]
0.0	75
2.0	75
22.0	100
40.0	100

#### HPLC による精製

MPLC 後、化合物 **6**、**7** を含む画分を合わせて濃縮し、メタノールに溶かし切った。これを LC-20AT HPLC system (島津製作所) による逆相 HPLC に供し、化合物 **6**、**7** を精製した。まず COSMOSIL C<sub>18</sub>-AR-II Packed Column 10 mm × 250 mm (nacalai tesque) で一度精製し、さらに COSMOSIL πNAP Packed Column 10 mm × 250 mm (nacalai tesque) を用いて各化合物を精製した。溶媒にはいずれも脱イオン水 (0.1%ギ酸) とメタノール (0.1%ギ酸) を使い、リニアグラジエントで濃度を変えながら溶出させた。結果として 13.7 mg の化合物 **6** と 4.3 mg の化合物 **7** を得た。

#### 化合物 **6**、**7** の構造決定

精製した化合物 **6**、**7** を JMS-T100LC (JEOL 社) による HR-MS 分析と JNM-A500 NMR system (JEOL 社) を用いた NMR 分析に供し構造を同定した。

## 各異種発現株の生産物および標品との比較

$pT_{tipA-fogA9-A11}$ 、 $pT_{tipA-fogA1-A12}$ 、 $pT_{tipA-fogA1-A12\Delta fogA10A9::fogNO}$  をそれぞれ導入した *S. albus* J1074 株を MS 寒天培地 (50 mg/L カナマイシン添加) 上で生育させた。各株の寒天培地を 1 cm 四方切り出し、50 ml の R5MS 培地 (50 mg/L カナマイシン添加) に植菌、150 rpm、30°C で 2 日間培養した。前培養液を 100 ml の R5MS 培地に 2% 植菌し、150 rpm、30°C で 48 時間培養した。培養液に終濃度 5  $\mu\text{g/ml}$  のチオストレプトンを添加し、さらに 4 日間培養を行った。

各株の培養液を塩酸で pH 2.0~3.0 に調整し、100 ml の酢酸エチルで 3 回抽出を行った。回収した有機層を減圧濃縮し、残渣を 1 ml のメタノールに溶解させ LC-MS 分析に供した。LC-MS 分析には Agilent 1100 series (Agilent Technologies 社) 及び high-capacity trap plus system (Bruker Daltonics 社) を用いた。カラムには COSMOSIL 5PYE Packed Column 2.0 mm  $\times$  150 mm (nacalai tesque) を用いた。溶媒は脱イオン水 (0.1 %ギ酸) とアセトニトリル (ACN) (0.1 %ギ酸) を用い、**Table 3-8** のグラジエントで濃度を変えながら流速 0.3 ml/min で分析した。

**Table 3-8. LC-MS 溶媒のグラジエント**

Time [min]	ACN の割合 [%]
0.0	5.0

---

2.0	5.0
30.0	100
32.0	100

---

## 第4章 遺伝子破壊による2組のKS-CLFの機能解析

### 4.1 目的

*A. missouriensis* の培養液から単離された3つの芳香族ポリケタイドの内、 $\beta$ -アルキル化された構造を持つ化合物 **3** は(Z)-3-methylpent-3-enoate を開始基質として生合成されることが予想された。また、 $\beta$ -アルキル化を受けていなかった化合物 **1**、**2** は一般的なII型PKSの生産物と同様に酢酸を開始基質として生合成されることが予想された。異種発現実験から、 $\beta$ -アルキル化された(Z)-3-methylpent-3-enoyl基を有する開始基質の生合成にはFogA2~FogA8が寄与すること、及びFogA10A9、FogNOは共にオクタケタイド鎖を合成するが、FogA2~FogA8の生産する開始基質に対する選択性が異なることが明らかになった。

以上の結果から、*A. missouriensis* の菌体内において化合物 **1**、**2** の生合成は *fogNO* が、化合物 **3** の生合成は *fogA10A9* がそれぞれ担っていることが予想された。また、2組のKS-CLFが双方ともに失活化した場合、*A. missouriensis* のゲノム中には他にII型PKSのKS-CLFをコードする遺伝子が存在しない為 *fogacin* 類の生産は消失すると考えられた。これらの仮説を検証するため、*A. missouriensis* のクロモソーム上でそれぞれ *fogA10*、*fogN* を破壊した株と両KS遺

伝子を同時に破壊した株を構築し、野生株との生産物の比較を試みた。

また、異種発現実験の結果は FogA10A9、FogNO のいずれも FogA11 を共通の ACP として利用することを示唆していた。*A. missouriensis* 菌体内でも両 KS-CLF が FogA11 を共用することを確認する為、並行して  $\Delta fogA11$  株を作製を試みた。

## 4.2 実験と結果

### 4.2.1 *A. missouriensis* $\Delta fogA10$ 株の作製

遺伝子の破壊は in frame deletion 方式で行った。*fogA10* の catalytic triad のシステインをコードする領域を含む 252 bp の配列を欠失した  $\Delta fogA10$  配列を pK19mobsacB-AprA (Mouri *et al.*, 2017) に挿入し、pK19mobsacB-AprA- $\Delta fogA10$  を構築した。

大腸菌 ET12567/pUZ8002 株を介した接合伝達によって *A. missouriensis* 野生株の菌体内にベクターを導入した。相同組換えによりクロモソームにベクターが組み込まれた一次組換え体を、アプラマイシン耐性遺伝子 *aac(3)IV* をマーカーとしてスクリーニングした。アプラマイシン非存在下で液体培養した一次組換え体を滅菌した 0.75% NaCl 水溶液で洗浄し、Czapek2S 寒天培地上に植菌した。pK19mobsacB-AprA 上に存在する *sacB* はスクロースを基質とするレバンスクララーゼをコードしており、スクロース存在下において宿主の細菌に対し毒性を発揮する (Schäfer *et al.*, 1994)。従って、二度目の相同組換えによってクロモソームから pK19mobsacB-AprA が抜けた二次組換え体、または野生株のみが Czapek2S 寒天培地上で生育する。生育したコロニーをピックアップ後、コロニーPCR によって二次組換え体をスクリーニングし、 $\Delta fogA10$  株を取得した。

#### 4.2.2 *A. missouriensis* $\Delta fogN$ 株、 $\Delta fogA10fogN$ 株の作製

pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogA10$  と同様に、*fogN* の catalytic triad のシステインを含む 180 bp の配列が欠失した  $\Delta fogN$  配列を pK19mobsacB-Apra に挿入し、pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogN$  を構築した。これを破壊用ベクターとして  $\Delta fogA10$  株の作製と同じ手法により  $\Delta fogN$  株を取得した。

また、pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogA10$  を使用して  $\Delta fogN$  株を基に  $\Delta fogA10fogN$  株を作製した。

#### 4.2.3 *A. missouriensis* $\Delta fogA11$ 株の作製

他の破壊用ベクターと同様、*fogA11* を含む 239 bp の配列を欠失した  $\Delta fogA11$  配列を pK19mobsacB-Apra に挿入し、*fogA11* が完全に欠落した pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogA11$  を構築した。

上述の操作によって *A. missouriensis* 野生株に pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogA11$  を導入し、 $\Delta fogA11$  株を作製した。

取得した全ての破壊株は野生株とともにコロニーPCR に供し、各遺伝子に欠失が入っていることを確認した (Figure 4-1)。

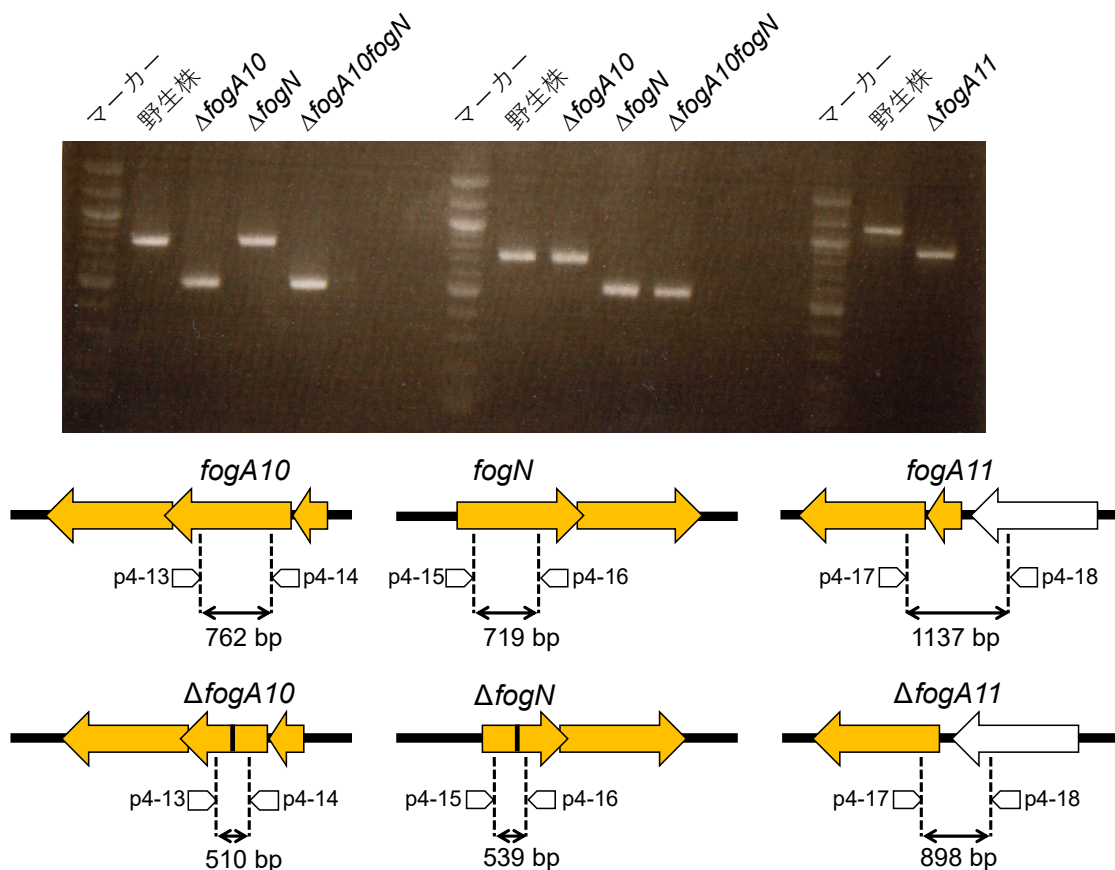


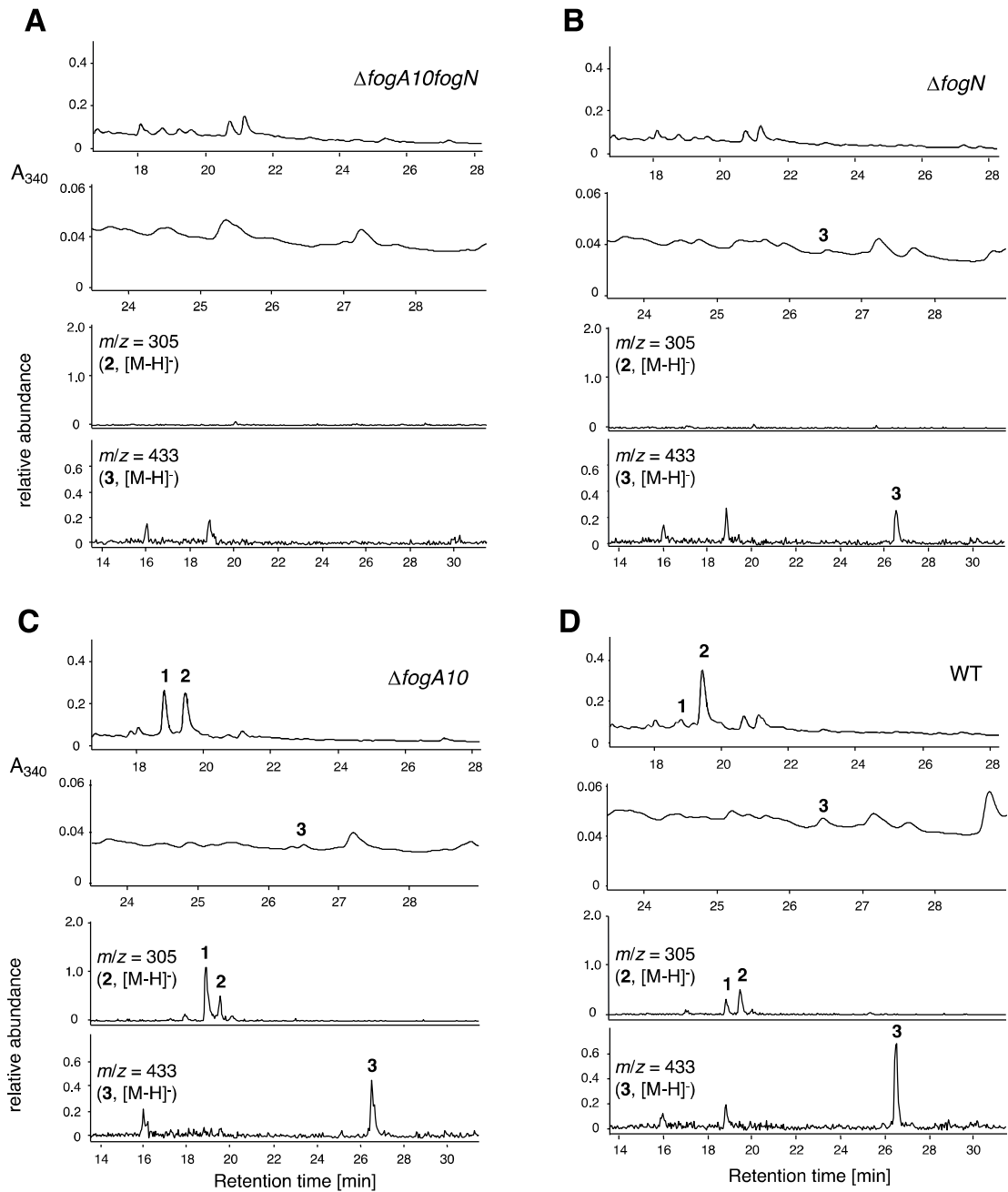
Figure 4-1. コロニーPCR による破壊株の確認

マーカーは 100 bp DNA Ladder (NEW ENGLAND BioLabs) を使用した。

#### 4.2.4 野生株と各破壊株の生産物比較

*A. missouriensis* 野生株と作製した  $\Delta fogA10$  株、 $\Delta fogN$  株、 $\Delta fogA10fogN$  株を用いて 2 組の KS-CLF の失活化が fogacin 類の生産に与える影響を検証した。各株をそれぞれ 100 ml の Q 培地で 4 日間培養し、生産物を酸性条件下で酢酸エチルにより抽出した。減圧濃縮後、残渣をメタノールに溶解し LC-MS 分析に供した (Figure 4-2)。





**Figure 4-2. LC-MS による野生株と各破壊株の生産物比較**

**A**,  $\Delta fogA10fogN$  株の LC-MS 分析の結果; **B**,  $fogN$  株の結果; **C**,  $\Delta fogA10$  株の結果; **D**,  $\Delta fogA10fogN$  株の結果。上から 340 nm の UV クロマトグラム、化合物 **3** のピークの拡大図、 $m/z = 305$  ( $fogacin$  (**2**),  $[M-H]^-$ ) の MS クロマトグラム、 $m/z = 433$  (**3**,  $[M-H]^-$ ) のクロマトグラム。

まず、 $\Delta fogA10fogN$  株について説明する。 $\Delta fogA10fogN$  株の生産物の LC-MS 分

析では 340 nm の UV クロマトグラムから全ての fogacin 類のピークが消失した (Figure 4-2A)。fogacin (2) から 1 つのプロトンが脱離した  $m/z = 305$  ( $[M-H]^-$ )、化合物 3 から 1 つのプロトンが脱離した  $m/z = 433$  ( $[M-H]^-$ ) の MS クロマトグラムを観察してもピークは検出されていなかった。また、化合物 1 は fogacin に rhamnose がエステル結合した構造である。故に MS 分析で化合物がイオン化される際にエステル結合が開裂し fogacin 骨格が放出されるため、 $m/z = 305$  ( $[M-H]^-$ ) の MS クロマトグラムにも検出されるが、 $\Delta fogA10fogN$  株の生産物からは見つからなかった。これは、予想通り  $\Delta fogA10fogN$  株が fogacin 類生産能を失ったことを意味する。

$\Delta fogN$  株でも 1、2 のピークは消失していた (Figure 4-2B)。拡大した UV クロマトグラムと  $m/z = 433$  ( $[M-H]^-$ ) の MS クロマトグラムから 3 の生産は確認された。しかしながら、3 の生産量は野生株に比べ低下した (Figure 4-2D)。

$\Delta fogA10$  株は UV クロマトグラム、 $m/z = 305$  ( $[M-H]^-$ )、 $m/z = 433$  ( $[M-H]^-$ ) の MS クロマトグラムから全ての fogacin 類の生産が確認された (Figure 4-2C)。 $\Delta fogA10$  株の結果では化合物 1 の UV、MS ピークが野生株に比べ増大していた (Figure 4-2C, D)。一方で、化合物 3 の生産は野生株よりも低下した。

#### 4.2.4 野生株と $\Delta fogA11$ 株の生産物比較

4.2.3 での他の破壊株を使用した実験と同様の操作を行い、野生株と  $\Delta fogA11$  株の生産物を比較した (Figure 4-4)。その結果、 $\Delta fogA11$  株の UV クロマトグラムから全ての fogacin 類のピークが消失した。

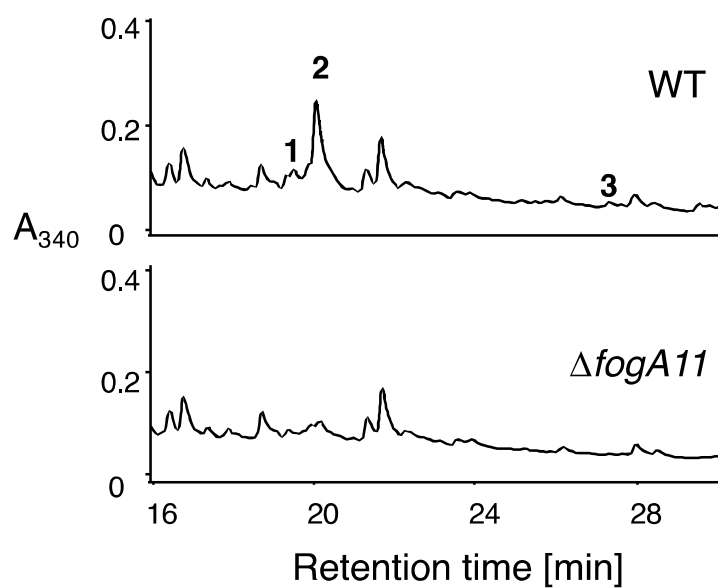


Figure 4-3. 野生株と  $\Delta fogA11$  株の生産物比較

### 4.3 考察

本実験で作製した  $\Delta fogA10$  株、 $\Delta fogN$  株、 $\Delta fogA10fogN$  株は、該当する KS サブユニットに保存された catalytic triad のシステインを欠失している。この為、ポリケタイド鎖を活性中心に繫留することが不可能となり、伸長反応に対する活性を失っている。

$\Delta fogA10fogN$  株は全ての fogacin 類の生産能を失っていた (Figure 4-3A)。これにより、*fog* クラスターが fogacin 類の生合成を担っていることが確認された。

$\Delta fogN$  株は化合物 **3** のみを生産し、**1**、**2** の生産は消失していた (Figure 4-3B)。これは *A. missouriensis* 菌体内において *fogA10A9* が **1**、**2** の生合成を担っていないことを意味する。この結果は FogA10A9 が酢酸より (Z)-3-methylpent-3-enoate を基質として選択的に利用するという仮説を支持している。一方で、*S. albus* を用いた異種発現実験において、*fogA10A9* を発現させた株は SEK4 (**4**)、SEK4b (**5**) を生産した。従って、FogA10A9 は酢酸を開始基質として認識するが、本実験において FogA10A9 は *A. missouriensis* 菌体内で酢酸を開始基質に用いたオクタケタイド鎖の生合成は行わなかった。この理由として、本実験の培養条件下では異種発現実験の場合に比べ *A. missouriensis* 菌体内における *fogA10A9* の発現量が乏しい可能性が考えられる。*S. albus* を宿主として HCS cassette と KS-CLF 遺伝子を強制発現する際、*tipA* プロモーターを利用した。これにより *S. albus* 菌体内では

FogA10A9 が過剰に発現し、同程度発現した HCS cassette 酵素群が供給する (Z)-3-methylpent-3-enoate だけでなく、酢酸も開始基質に利用できるだけの量が存在したと考えられる。即ち、異種発現実験では FogA10A9 にとって副次的な生産物である SEK4、SEK4b が生産されるほど FogA10A9 が発現していたが、本実験において *A. missouriensis* 菌体内では副次的な生産物が検出されるに十分な FogA10A9 の発現がなかったと考えられる。仮に *A. missouriensis* のクロモソーム中、*fogA10A9* を含む *fogA* オペロンの上流に *tipA*、*ermE\**等の強力なプロモーターを挿入し強制的に発現した場合、 $\Delta fogN$  株も化合物 1、2 を多少なりとも生産することが予想される。

$\Delta fogA10$  株は化合物 1、2、3 全てを生産した (Figure 4-3C)。この点では野生株と同様である。しかし、野生株と比較して 1 の生産量が上昇した (Figure 4-3C, D)。この理由として、基質である malonyl-CoA や ACP<sub>FogA11</sub> を共用する FogA10A9 が失活化した為、FogNO の利用可能な基質の量が増加したことが考えられる。また、化合物 3 の生産量は野生株よりも低下した。この結果は FogNO が (Z)-3-methylpent-3-enoate よりも酢酸を選択的に開始基質とする予想と一致する。3 の生産量は野生株より低い一方、 $\Delta fogN$  株とは同程度であった (Figure 4-3B, C)。異種発現実験において *fogA10A9* を *fogNO* に置き換え HCS cassette と共に発現させた場合、化合物 6、7 の生産量は低くなり SEK4、SEK4b の生産量は高くなっ

た。これは FogNO が(Z)-3-methylpent-3-enoate よりも酢酸を開始基質として好むことを示しているが、本実験においては  $\Delta fogA10$  株と  $\Delta fogN$  株の化合物 **3** の生産能に顕著な差異は存在しなかった。この理由として、*A. missouriensis* 菌体内において *fogNO* が *fogA10A9* よりも高発現である可能性が考えられる。*fogA10A9* は HCS cassette と共通する 1 つのオペロン上に存在する。一方、*fogNO* は *fogA* から約 20 kb 離れたところに位置しており、明らかに転写単位が異なる。仮に *fogNO* が *fogA10A9* よりも大量に発現していたとする。この場合、共通の基質を利用している為必然的に FogNO が反応を触媒する回数は FogA10A9 よりも多くなる。FogNO は酢酸に対して高い選択性を示し、化合物 **3** よりも化合物 **1**、**2** の生産を優先すると考えられるが、異種発現実験で示されたように(Z)-3-methylpent-3-enoate も酢酸より低い割合で開始基質として利用する。従って、この両 KS-CLF の発現量の差が大きくなる程、FogA10A9 の主産物であり、FogNO にとっては副産物に当たる(Z)-3-methylpent-3-enoate 由来のオクタケタイド鎖も FogNO によって生合成される割合が高くなる。*tipA* プロモーターにより両 KS-CLF 共に同程度の発現量が担保された異種発現実験において、*fogA1-A12* 発現株と *fogA1-A12 [fogA10A9::fogNO]*株では前者が化合物 **6**、**7** の生産量で優り、後者が SEK4、SEK4b の生産量で優っていた結果もこの仮説を支持している。

$\Delta fogA11$  株は  $\Delta fogA10fogN$  株と同様に全ての fogacin 類の生産が消失した。こ

の結果から、FogA10A9、FogNO はいずれも FogA11 を共通の ACP としてポリケタイド鎖の合成に利用し、*A. missouriensis* のゲノム内にコードされた他の ACP は伸長反応に関与しないことが明らかになった。

以上の考察をまとめる。本実験の結果は *A. missouriensis* の有する 2 組の KS-CLF の開始基質に対する選択性について、FogA10A9 は(Z)-3-methylpent-3-enoate に対する選択性が強く、FogNO は酢酸に対する選択性が強いとする予想を支持している。また *A. missouriensis* 菌体内においては FogNO の方が高発現である可能性が示唆された。さらに、両 KS-CLF は FogA11 のみを共通の ACP として伸長反応を触媒することが確認された。

## 4.4 実験項

### 使用した菌株、ベクター、培地、プライマー

#### ・菌株

*A. missouriensis* NBRC13243 株は第 2 章に記した。接合伝達に用いた大腸菌 ET12567/pUZ8002 株は The John Innes Centre より購入した。クローニングに用いた大腸菌 JM109 株は第 3 章に記した。

#### ・ベクター、酵素

クローニングに用いた pJET1.2 は Thermo Scientific 社より購入した。また、遺伝子破壊用のベクターとして pK19mobsacB (Schäfer *et al.*, 1994) のカナマイシン耐性遺伝子をアプラマイシン耐性遺伝子 *aac(3)IV* に置き換えた pK19mobsacB-Apra (Mouri *et al.*, 2017) を醗酵学研究室の木村知宏博士より分与していただいた。

各種制限酵素、PCR に用いた Prime star GXL DNA polymerase、コロニーPCR に用いた SapphireAmp Fast PCR Master Mix、そしてベクター構築に用いた In-Fusion HD Cloning Kit は Takara biochemical 社より購入した。

#### ・培地



大腸菌の培養は LB 培地 (Difco™ LB Broth Muller、BD 社) で行った。

*A. missouriensis* の植継ぎには Bennette-Maltose (BM) 寒天培地を用いた。

BM 寒天培地

2% agarose

0.1% Bacto yeast extract (BD 社)

1% maltose

0.2% NZ amine typeA (和光純薬工業社)

0.07% エルリッヒカツオエキス (キョクトー社)

0.0376% 粉末肉エキス (キョクトー社)

pH 7.3

*A. missouriensis* を大腸菌との遺伝子接合伝達に供する際には MS 寒天培地 (第 3 章実験項参照) を用いた。接合伝達後の一時組み換え体のスクリーニングには yeast-starch (YS) 寒天培地を用いた。また、一時組み換え体の液体培養には PYM 培地 (第 2 章実験項参照) を用い、二次組み換え体のスクリーニングには Czapek2S 寒天培地を用いた。

YS 寒天培地

2% agarose

0.2% Bacto yeast extract (BD 社)

1% soluble starch (国産化学社)

10 mM MgCl<sub>2</sub>

pH 7.2

Czapek2S 寒天培地

2% agarose

3.5% Czapek-Dox Broth (BD 社)

2% sucrose

*A. missouriensis* の野生株および遺伝子破壊株の代謝産物比較実験では、前培養には PYM 培地 (第 2 章実験項参照) を、本培養には第 2 章で用いた Q 培地の molasses を EM 研究所製のものに代えた培地を用いた。

本実験で設計・使用したプライマーは以下の通りである。

Table 4-1. 本実験で使用したプライマー

pK19-mobsacB-Apra との相同配列を下線で示した。

No.	配列 (5'→3')
4-1	<u>GCAGGTCGACTCTAGT</u> GTTGATCAGCGCGATGAG
4-2	TGCTGTCGGATTTCGACGCGATCAAGGCCACCA
4-3	TGATCGCGTCGAAATCCGACAGCACCAGGTATT
4-4	<u>CGGTACCCGGGGATCA</u> AGAGGATCCGGTTACGAG
4-5	<u>GCAGGTCGACTCTAGAC</u> CTGCTCTTCGTCGACG
4-6	AGCTGGCCACCATCATGTGGTTCGAACATGTGCG
4-7	TCGACCACATGATGGTGGCCAGCTTCGACGCTA
4-8	<u>CGGTACCCGGGGATC</u> AGATCTGGAAGCGCTCGG
4-9	<u>GCAGGTCGACTCTAGAC</u> CCGAAAACGGCGGTGAT
4-10	AGTTTCCCCCGTGACCCGGC
4-11	GGTCACGGGGGAAACTCCTC
4-12	<u>CGGTACCCGGGGATC</u> ATCGGGGTGAAGAAGTCG
4-13	TCATGTGGTACGCGTTGCAG
4-14	AGTTCTGGGATCTCATCACC
4-15	TATCAGCTTCTTCGACCCCG
4-16	TCATGTGGTACGCGTTCGAC
4-17	AGTGTGGTCGGGGTGAGG
4-18	TGGTACGGATGGCCGAAC

#### $\Delta fogA10$ 株、 $\Delta fogN$ 株の遺伝子破壊用ベクターの作製

破壊株の作製用のベクターには pK19mobsacB-Apra (Mouri *et al.*, 2017) を使用した。*A. missouriensis* のクロモソームを鋳型としプライマー4-1、4-2 を用いて

PCR 法により *fogA10* の下流側の約 2.1 kb の領域を増幅した (fragment A)。また、プライマー 4-3、4-4 で PCR を行い *fogA10* の上流側約 2.1 kb の領域を増幅した (fragment B)。プライマー 4-1 とプライマー 4-4 はそれぞれ *Xba*I、*Bam*HI で処理し切断した pK19mobsacB-Apra の末端と 15 bp の相同配列を有している (Table 5-2, 下線)。また、プライマー 4-2 と 4-3 は互いに相補的な配列を有するよう設計した。従って、PCR で増幅した 2 断片の末端には pK19mobsacB-Apra および互い同士との相同配列が付加している。*Xba*I と *Bam*HI で制限酵素処理した pK19mobsacB-Apra に fragment A、B を In-Fusion HD cloning Kit (Takara 社) で挿入し pK19mobsacB-Apra- $\Delta$ *fogA10* を作製した (Figure 4-4)。

pK19mobsacB-Apra- $\Delta$ *fogN* は同様にプライマー 4-5、4-6 で *fogN* の上流側約 2.2 kb を、プライマー 4-7、4-8 で下流側約 2.1 kb を増幅し、*Xba*I と *Bam*HI で制限酵素処理した pK19mobsacB-Apra に挿入し作製した。

pK19mobsacB-Apra- $\Delta$ *fogA11* についても同様にプライマー 4-9、4-10 で *fogA11* の下流側約 2.2 kb を、プライマー 4-11、4-12 で上流側約 2.1 kb を増幅し、*Xba*I と *Bam*HI で制限酵素処理した pK19mobsacB-Apra に挿入し作製した。

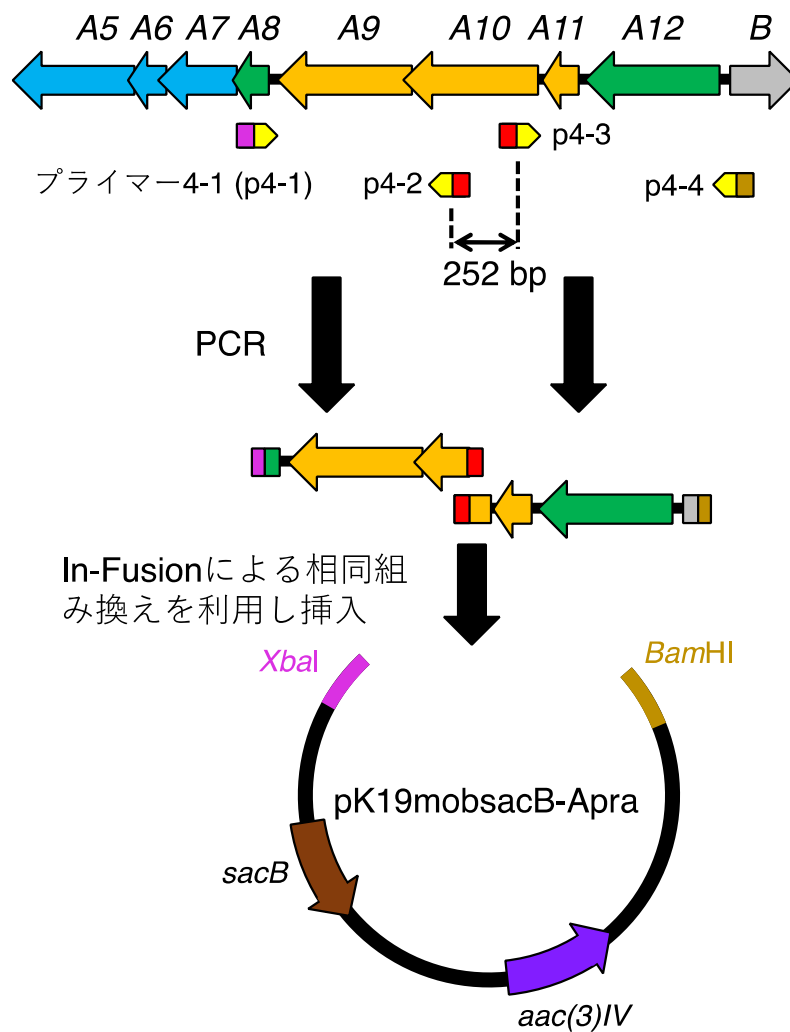


Figure 4-4. 破壊用ベクターの構築スキーム

#### *A. missouriensis* $\Delta fogA10$ 株の作製

エレクトロポレーションによって pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogA10$  を大腸菌 ET12567/pUZ8002 株に導入し、2 ml LB 培地 (50 mg/L カナマイシン、50 mg/L アプラマイシン、34 mg/L クロラムフェニコール添加) に植菌、37°C、300 rpm で

一晚培養した。培養液を 100 ml LB 培地 (50 mg/L カナマイシン、50 mg/L アプラマイシン、34 mg/L クロラムフェニコール添加) に 0.5~1.0% 植菌し、37°C、120 rpm で OD<sub>600</sub> が 0.4~0.6 になるまで培養した。遠心により菌体を回収し、抗生物質無添加の LB 培地 50 ml で菌体を洗浄した (2 回)。再度遠心で菌体を回収し 0.5 ml の LB 培地に懸濁した。

*A. missouriensis* 野生株を 30°C で 6 日間培養した 10 枚の MS 寒天培地の表面に、プレート 1 枚あたり 2.5 ml の LB 培地を加えたのち滅菌した綿棒で丁寧に擦り、ピペットを使って菌体懸濁液を回収した。*A. missouriensis* 菌体の懸濁液を上述の大腸菌懸濁液と 2 : 1 (*A. missouriensis* : 大腸菌) の割合で混合した。菌体混合液を遠心し、若干の上清を捨てピペッティングで再懸濁し YS 寒天培地上に塗布した。16~20 時間、30°C で培養後、1 mg アプラマイシンと 1 mg スペクチノマイシンを溶かした脱イオン水 1 ml を YS 寒天培地に塗布し、さらに 1 週間から 10 日程度 30°C で培養した。

YS 寒天培地上に生育した *A. missouriensis* 一次組換え体をピックアップし、BM 寒天培地 (50 mg/L アプラマイシン添加) に植菌した。30°C で培養した一次組換え体の寒天培地から 1 cm 四方切り出し、100 ml PYM 培地に植菌、2 日間、120 rpm、30°C で培養した。遠心し回収した菌体を 50 ml の 0.75% NaCl 水溶液に懸濁し洗浄した。この懸濁液を 1 ml を Czapek2S 寒天培地に塗布した。Czapek2S

寒天培地上に生育した *A. missouriensis*  $\Delta fogA10$  株をピックアップし、アプラマイシン存在下で生育しないことを確認した。さらに、プライマー4-13、4-14 を用いたコロニーPCR により *fogA10* の破壊を確認した。

#### *A. missouriensis* $\Delta fogN$ 株の作製

pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogN$  を ET12567/pUZ8002 株に導入し、 $\Delta fogA10$  株と同様の手法で  $\Delta fogN$  株を作製した。プライマー4-15、4-16 を用いたコロニーPCR により破壊を確認した。

#### *A. missouriensis* $\Delta fogA10\Delta fogN$ 二重破壊株の作製

同様の手法で  $\Delta fogA10\Delta fogN$  二重破壊株を作製した。遺伝子破壊用ベクターには pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogA10$  を、*A. missouriensis* は  $\Delta fogN$  株を用いた。作製後プライマー4-13、4-14、4-15、4-16 を使用したコロニーPCR により破壊を確認した。

#### *A. missouriensis* $\Delta fogA11$ 株の作製

他の株と同様、pK19mobsacB-Apra- $\Delta fogA11$  で形質転換した ET12567/pUZ8002 株と *A. missouriensis* の野生株を用いて  $\Delta fogA11$  株を作製した。プライマー4-17、4-18 を用いたコロニーPCR により破壊を確認した。

#### A. missouriensis 野生株と各破壊株の代謝産物の比較

*A. missouriensis* 野生株、 $\Delta fogA10$  株、 $\Delta fogN$  株、 $\Delta fogA10\Delta fogN$  二重破壊株、そして  $\Delta fogA11$  株を BM 寒天培地上で生育させ、それぞれのプレートから 1 cm 四方の断片を切り出し、100 ml PYM 培地に植菌、30°C、120 rpm で 2 日間前培養した。各菌株の前培養液を 100 ml の Q 培地に 2% 植菌し 30°C、120 rpm で 4 日間培養した。

各菌株の培養液を塩酸で pH 2.0~3.0 に調整後、等量の酢酸エチルで代謝産物を抽出し (3 回)、回収した有機層を減圧濃縮した。残渣を 1 ml のメタノールに溶かし切り、Agilent 1100 series (Agilent Technologies 社) 及び high-capacity trap plus system (Bruker Daltonics 社) を用いた LC-MS 分析に供した。LC-MS のカラムには、COSMOCORE 2.6C<sub>18</sub> 2.1 mm×150 mm (nacalai tesque)を用いた。溶媒としてギ酸を終濃度 0.1 %となるようにそれぞれ加えた水とアセトニトリル (ACN) を用意し、濃度を変えながら (Table.4-2) 流速 0.3 ml/min で 40 分間流した。

**Table 4-2. LC-MS 溶媒のグラジエント**

Time [min]	ACN の割合 [%]
0.0	5.0
2.0	5.0
30.0	50
34.0	100
34.5	5.0



40.0

5.0

---

## 第5章 *fog* クラスターの *in vitro* 機能解析

本章の内容は、学術雑誌論文として出版する計画があるため公表できない。4年以内に出版予定。

## 第 6 章 総合討論

本研究について総合討論を行う。始めに本研究の結果と考察をまとめる。

本研究では *A. missouriensis* が持つ II 型 PKS 遺伝子クラスターの機能解析を行った。先行研究から、この遺伝子クラスターは 2 つの特徴を持つことが明らかになっていた。1 つはそれまで II 型 PKS 遺伝子クラスターでは報告例のなかった HCS cassette が存在すること。もう 1 つは通常の II 型 PKS 遺伝子クラスターには 1 組しか存在しない KS-CLF をコードする遺伝子が 2 組存在することである。これらの特徴から、このクラスターが未知の機構により化合物を生合成している可能性が高いと考え、生産物の同定と *in vivo*、*in vitro* での機能解析を試みた。

培養条件を検討し、このクラスターが生産物と予想された fogacin 類 (fogacin B (1)、fogacin (2)、fogacin C (3)) を単離・構造決定した。この内 fogacin B、fogacin C は新規化合物であった。遺伝子破壊実験により fogacin 類が当クラスター (*fog* クラスター) の生産物であることが確認された。fogacin C (3) は HCS cassette 酵素群により  $\beta$ -アルキル化された開始基質(Z)-3-methylpent-3-enoyl-ACP (MP-ACP) から MP 基が導入されたと考えられる分枝構造を有していた。一方で、fogacin B (1)、fogacin (2) は一般的な II 型 PKS 産物と同様に酢酸を開始基質として合成さ

れたと思われる構造だった。

異種発現実験において、HCS cassette (*fogA2-fogA8*) を min PKS と共発現した時のみ生産される化合物 **6**、**7** を単離・構造決定した。**6**、**7** は fogacin C (**3**) と共通の分枝構造を有していた。これにより、fogacin C (**3**) の分枝構造が HCS cassette 酵素群による  $\beta$ -アルキル化によるものであることが裏付けられた。*fog* クラスタにコードされた 2 組の KS-CLF 遺伝子の内、先行研究で未検証であった *fogNO* を HCS cassette とともに強制発現したところ、オクタケタイトのシャント産物を生産した。HCS cassette とともに *fogNO* を発現した株は、HCS cassette と *fogA10A9* を発現した株よりも SEK4 (**4**)、SEK4b (**5**) の生産量が高い一方で、**6**、**7** の生産量は低かった。これにより、FogA10A9 と FogNO の開始基質に対する選択性が異なることが示唆された。

2 組の KS-CLF、FogA10A9、FogNO が MP 基と acetyl 基という異なる開始基質を利用し、構造の異なる fogacin 類の生合成を担うという予想を遺伝子破壊実験で検証した。その結果、FogA10A9 は fogacin C (**3**) のみの生産を担うことが判明した。一方で、FogNO は全ての fogacin 類を生産した。FogA10A9、FogNO それぞれが異種発現実験と遺伝子破壊実験で示した MP 基に対する選択性を比較した結果、*A. missouriensis* 菌体内では FogA10A9 の発現量は低く、FogNO の発現量は高い可能性が示された。

*In vitro* 解析により HCS cassette にコードされた酵素の全てが予想通りの活性を持つことを明らかにした。並行して *fog* クラスタにコードされた KSIII ホモログ FogA12 の *in vitro* 解析を行った結果、HCS cassette の合成する (Z)-3-methylpent-3-enoate は FogA12 によってポリケタイド鎖の伸長反応に導入されることが強く示唆された。

*In vitro* 解析により FogA10A9 と FogNO の基質選択性を検証した結果、FogNO は分枝炭素鎖や芳香環を持つ acyl 基よりも acetyl 基を開始基質として好むことが判った。一方で、FogA10A9 は acetyl 基よりも分枝炭素鎖や芳香環を持つ acyl 基に対する選択性が強く、他の FogA 酵素により合成される (Z)-3-methylpent-3-enoate に対しても高い選択性を示した。また、特殊な acyl 基が存在しない場合、FogNO がほぼオクタケタイド鎖のみを合成した一方で、FogA10A9 はオクタケタイド鎖だけでなくノナケタイド鎖を合成した。これらの結果により、FogA10A9 の活性部位にあるキャビティの空間は FogNO よりも広く、それが特殊な開始基質に対する選択性を高める一因となっている可能性が示された。また、*in vitro* 解析において FogA10A9 と FogNO のオクタケタイド鎖の生産量に大きな差はなく、遺伝子破壊実験で示された FogA10A9 と FogNO の発現量の差が化合物の生産量に影響している可能性が支持された。

以上をまとめる。*A. missouriensis* の *fog* クラスタは 2 組の異なる KS-CLF に

よって fogacin 類を生合成する。FogNO は主に酢酸を開始基質としてオクタケタイド鎖を合成する。このオクタケタイド鎖は fogacin 生合成経路上で修飾を受け、fogacin (2) となる。fogacin にはさらに  $\alpha$ -rhamnose が結合し、fogacin B (1) が生産される。FogA10A9 は *A. missouriensis* の菌体内において、HCS cassette 酵素群が合成し FogA12 により導入される (Z)-3-methylpent-3-enoate からオクタケタイド鎖を生合成する。このオクタケタイド鎖は共通の fogacin 生合成経路で修飾を受け fogacin 骨格を形成し、最終的に fogacin C (3) が合成される。FogNO も (Z)-3-methylpent-3-enoate を開始基質とすることは可能だがその選択性は FogA10A9 に比べ低い。しかし、fogacin 生産条件下の *A. missouriensis* の菌体内において FogNO は FogA10A9 よりも高発現であると考えられ、実際に FogA10 を破壊しても fogacin C (3) は生産される。また、FogNO が酢酸を開始基質として好むのに対し、FogA10A9 は分枝炭素鎖をはじめとするかさの大きな開始基質に対する選択性が高い。FogA10A9 のキャビティが FogNO のそれより広いことがその一因と考えられる。

次に本研究から得られた知見を述べる。

まず、本研究によって初めて HCS cassette を利用する II 型 PKS による天然物

の生合成機構が明らかになった。HCS cassette はこれまで I 型 PKS の機構においてのみ報告されていたが、本研究により II 型 PKS 系においても作用することが実証された。加えて、HCS cassette 酵素群は I 型 PKS では伸長中のポリケタイド鎖を  $\beta$ -アルキル化するが、本研究で解析した *fog* クラスターではポリケタイド鎖伸長反応における開始基質の合成を担うことが判明した。合成された開始基質は KSIII ホモログによって伸長反応に導入されることが強く示唆されている。HCS cassette 酵素群と KSIII によるこのような開始基質導入機構は過去に例がない。本研究により、II 型 PKS システムにおける特殊な開始基質の新たな導入機構が示された。

*fog* クラスターにおいて、FogA10A9 と FogNO という基質選択性の異なる 2 組の KS-CLF が異なる開始基質を利用しつつ、共通の修飾機構により fogacin 類の構造を多様化させることが明らかになった。このような生合成機構を持つ II 型 PKS 遺伝子クラスターは過去に報告例がない。*fog* クラスターがこのような機構を獲得した理由として、HCS cassette およびそれと協働する KS-CLF の転移により、一般的な II 型 PKS 遺伝子クラスターが進化した可能性が考えられる。即ち、*fog* クラスターは元々 *fogNO* のみを有していたが、後から HCS cassette および *fogA10A9* が水平伝播により転移してきた可能性が考えられる。*fogA10A9* が HCS cassette と *fogA* オペロンを組んでいること、FogNO の方が *A. missouriensis*

の菌体内での発現量が高いと示唆されたこと、fogacin 生合成経路上の修飾酵素が酢酸を開始基質とする actinorhodin 生合成経路上の修飾酵素と相同性を示すこと、fogacin 骨格が actinorhodin 中間体とよく似ていること、これらの事実は全てこの可能性を支持している。元々 fogNO は fog クラスタに唯一コードされていた KS-CLF であり、min PKS をともに構成する本来の ACP もコードされていたと予想される。その本来の ACP は、外部から fogA オペロンが fog クラスタ内に転移し、FogNO が fogacin 生合成に FogA11 を利用するようになったために不要となり、やがて *A. missouriensis* のゲノムから欠落したと考えられる。

*In silico* 解析から fog クラスタと同様に HCS cassette を持つ II 型 PKS 遺伝子クラスターが他にも存在することが明らかになった (**Figure 6-1**)。これは水平伝播によって HCS cassette と II 型 PKS の min PKS が移動する可能性を支持している。本研究の結果を踏まえると、これらの II 型 PKS 遺伝子クラスターは  $\beta$ -アルキル化された芳香族ポリケタイドの生合成を担っている可能性が高い。 $\beta$ -アルキル化された芳香族ポリケタイドは現在 fogacin C 以外の例がなく、これらのクラスターを解析することは新規化合物の発見に繋がると考えられる。



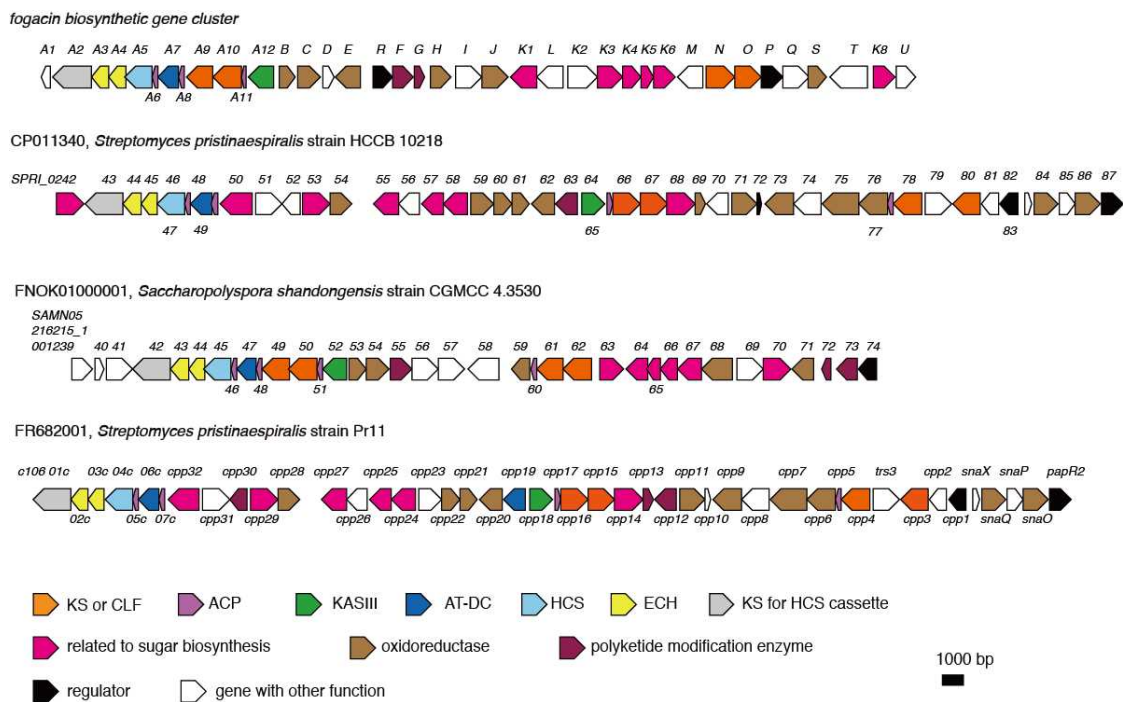


Figure 6-1. HCS cassette を有する II 型 PKS 遺伝子クラスター

II 型 PKS の KS または CLF を橙色で、HCS cassette の内 AT/DC ホモログを青で、HCS ホモログを水色で、ECH ホモログを黄色で、HCS cassette に基質となるポリケタイド鎖を供給する KS を灰色でそれぞれ示した。

最後に本研究で得られた成果から導かれる今後の展望を述べる。

まず、応用として *fogA* オペロンを他の II 型 PKS と協働させることで、生産される化合物を多様化出来る可能性が考えられる。II 型 PKS 遺伝子クラスターを持つ菌株に *fogA* オペロンを導入し発現すると、FogA2-FogA12 の合成する MP 基を開始基質とするオクタケタイド鎖がその II 型 PKS の生合成機構に供給される。修飾酵素の選択性にもよるが、その生合成機構が FogA2-FogA12 の供給する

オクタケタイド鎖を基質として認識した場合、*fog* クラスタによる *fogacin* 類生合成と同様に生産物の構造が多様化すると考えられる。

FogA10A9 は *in vitro* 実験において butyryl 基、isovaleryl 基、benzoyl 基を開始基質として受け入れた。また、FogA12 も同じく *in vitro* 実験において緩やかな基質認識を示した。このことから、MP 基以外の構造を導入したオクタケタイド鎖を供給できる可能性も考えられる。この場合、要点となるのは FogA 酵素群内での ACP 認識機構である。FogA 酵素群には FogA6、FogA8、FogA11 の 3 種類の ACP が属している。これらの ACP はその他の FogA 酵素の基質としてそれぞれ  $\beta$ -アルキル化のためのアルキル基の運搬、HCS cassette 酵素群と KSIII の基質の運搬、KS-CLF の伸長基質の運搬を担っている。本研究において明確にはないが、他の FogA 酵素はそれぞれの ACP を用途に応じて認識し、使い分けられていると予想される。例えば、FogA12 が FogA8 (MP 基ドナー) と FogA11 (MP 基レセプター) を別個に認識する機構を解明することで、他の PKS が有する複数の FogA8 ホモログを用いて FogA10A9 による伸長反応に多様な開始基質を導入出来る可能性が考えられる。従って、FogA 酵素群内での ACP 認識機構を解析することは、このようなコンビナトリアル生合成の手法に基づいた物質生産に応用できる可能性も秘めており、有用であると考えられる。

FogA10A9 は特殊な開始基質に対して選択性を示した。FogNO との比較から、

これは FogA10A9 の活性部位にあるキャビティが広いことが一因であると示唆された。しかし、これは特殊な開始基質から合成されるポリケタイド鎖を排除せずに伸長し得る理由としては合理的であるが、それらの特殊な基質を積極的に活性部位に取り込む制御機構は未だ不明である。もし FogA10A9 の開始基質制御メカニズムを解明することが出来れば、上述したコンビナトリアル生合成を活用した物質生産に有用な知見が得られると考えられる。

近年、医学・薬学的に有用な生理活性を持つ新規化合物が自然界から単離される数は減っている。一方で、多剤耐性菌の出現に伴い、臨床の現場では新たな生理活性を有する化合物の需要は高まっている。コンビナトリアル生合成等の手法により多様な新規化合物を生産し得る可能性を秘めた *fogA* オペロンについてさらに詳細な解析を進めていくことは、微生物学、生化学的な知見を得るだけでなく、より幅広い分野において有意義であると考えられる。

## 参考文献

- Awakawa, T., Fujita, N., Hayakawa, M., Ohnishi, Y., & Horinouchi, S. (2011). Characterization of the biosynthesis gene cluster for alkyl-O-dihydrogeranyl-methoxyhydroquinones in *Actinoplanes missouriensis*. *ChemBioChem*, *12*(3), 439-448.
- Bililign, T., Hyun, C. G., Williams, J. S., Czisny, A. M., & Thorson, J. S. (2004). The hedamycin locus implicates a novel aromatic PKS priming mechanism. *Chemistry & biology*, *11*(7), 959-969.
- Bisang, C., Long, P. F., Corte, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, A. L., Cox, R., Simpson, T. J., Staunton, J. & Leadlay, P. F. (1999). A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases. *Nature*, *401*(6752), 502-505.
- Bretschneider, T., Heim, J. B., Heine, D., Winkler, R., Busch, B., Kusebauch, B., Stehle, T., & Hertweck, C. (2013). Vinylogous chain branching catalysed by a dedicated polyketide synthase module. *Nature*, *502*(7469), 124-128.
- Cheng, Q., Xiang, L., Izumikawa, M., Meluzzi, D., & Moore, B. S. (2007). Enzymatic total synthesis of enterocin polyketides. *Nature chemical biology*, *3*(9), 557-558.
- Calderone, C. T. (2008). Isoprenoid-like alkylations in polyketide biosynthesis. *Natural product reports*, *25*(5), 845-853.
- Cichewicz, R. H., & Kouzi, S. A. (2002). Resveratrol oligomers: structure, chemistry, and biological activity. In *Studies in natural products chemistry* (Vol. 26, pp. 507-579). Elsevier.
- Das, A., & Khosla, C. (2009). In vivo and in vitro analysis of the hedamycin polyketide synthase. *Chemistry & biology*, *16*(11), 1197-1207.
- Das, A., Szu, P. H., Fitzgerald, J. T., & Khosla, C. (2010). Mechanism and engineering of polyketide chain initiation in fredericamycin biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, *132*(26), 8831-8833.

Debono, M., Merkel, K. E., Molloy, R. M., Barnhart, M., Presti, E., Hunt, A. H. & Hamill, R. L. (1984). Actaplanin, new glycopeptide antibiotics produced by *Actinoplanes missouriensis*. The isolation and preliminary chemical characterization of actaplanin. *The Journal of antibiotics*, 37(2), 85-95.

Dreier, J., & Khosla, C. (2000). Mechanistic Analysis of a Type II Polyketide Synthase. Role of Conserved Residues in the  $\beta$ -Ketoacyl Synthase– Chain Length Factor Heterodimer. *Biochemistry*, 39(8), 2088-2095.

Du, D., Katsuyama, Y., Onaka, H., Fujie, M., Satoh, N., Shin-ya, K., & Ohnishi, Y. (2016). Production of a novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *ChemBioChem*, 17(15), 1464-1471.

Du, D., Katsuyama, Y., Shin-ya, K., & Ohnishi, Y. (2018). Reconstitution of a type II polyketide synthase that catalyzes polyene formation. *Angewandte Chemie*, 130(7), 1972-1975.

Finking, R., Solsbacher, J., Konz, D., Schobert, M., Schäfer, A., Jahn, D., & Marahiel, M. A. (2002). Characterization of a new type of phosphopantetheinyl transferase for fatty acid and siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50293-50302.

Fu, H., Ebert-Khosla, S., Hopwood, D. A., & Khosla, C. (1994). Engineered biosynthesis of novel polyketides: dissection of the catalytic specificity of the act ketoreductase. *Journal of the American Chemical Society*, 116(10), 4166-4170.

Fu, H., Hopwood, D. A., & Khosla, C. (1994). Engineered biosynthesis of novel polyketides: evidence for temporal, but not regiospecific, control of cyclization of an aromatic polyketide precursor. *Chemistry & biology*, 1(4), 205-210.

Fujimoto, K., & Morimoto, M. (1983). Antitumor activity of trioxacarcin C. *The Journal of antibiotics*, 36(9), 1216-1221.

Geders, T. W., Gu, L., Mowers, J. C., Liu, H., Gerwick, W. H., Håkansson, K., Sherman, D. H. & Smith, J. L. (2007). Crystal Structure of the ECH2 Catalytic Domain of CurF from *Lyngbya majuscula* INSIGHTS INTO A DECARBOXYLASE INVOLVED IN POLYKETIDE CHAIN  $\beta$ -BRANCHING. *Journal of Biological Chemistry*, 282(49), 35954-35963.

Gehring, A. M., Lambalot, R. H., Vogel, K. W., Drucekhammer, D. G., & Walsh, C. T. (1997). Ability of *Streptomyces* spp. aryl carrier proteins and coenzyme A analogs to serve as substrates in vitro for E. coli holo-ACP synthase. *Chemistry & biology*, 4(1), 17-24.

Goto, T., Kino, T., Hatanaka, H., Nishiyama, M., Okumura, M., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. (1987). Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc*, 19, 4-8.

Grimm, A., Madduri, K., Ali, A., & Hutchinson, C. R. (1994). Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene*, 151(1-2), 1-10.

Hashimoto, M., Taguchi, T., Ishikawa, K., Mori, R., Hotta, A., Watari, S., ... & Ichinose, K. (2019). Unveiling Two Consecutive Hydroxylations: Mechanisms of Aromatic Hydroxylations Catalyzed by Flavin-Dependent Monooxygenases for the Biosynthesis of Actinorhodin and Related Antibiotics. *Chembiochem*, 20, 1-6

Hatanaka, T., Onaka, H., Arima, J., Uraji, M., Uesugi, Y., Usuki, H., Nishimoto, Y., & Iwabuchi, M. (2008). pTONA5: a hyperexpression vector in Streptomyces. *Protein expression and purification*, 62(2), 244-248.

Hertweck, C. (2009). The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(26), 4688-4716.

Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., & Bechthold, A. (2007). Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Natural product reports*, 24(1), 162-190.

- Heine, D., Bretschneider, T., Sundaram, S., & Hertweck, C. (2014). Enzymatic polyketide chain branching to give substituted lactone, lactam, and glutarimide heterocycles. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(43), 11645-11649.
- Hitchman, T. S., Crosby, J., Byrom, K. J., Cox, R. J., & Simpson, T. J. (1998). Catalytic self-acylation of type II polyketide synthase acyl carrier proteins. *Chemistry & biology*, 5(1), 35-47.
- Ichinose, K., Bedford, D. J., Tornus, D., Bechthold, A., Bibb, M. J., Reville, W. P., Floss, H. G., & Hopwood, D. A. (1998). The granaticin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces violaceoruber* Tü22: sequence analysis and expression in a heterologous host. *Chemistry & biology*, 5(11), 647-659.
- Ikeda, H., & Ōmura, S. (1997). Avermectin biosynthesis. *Chemical reviews*, 97(7), 2591-2610.
- Iwasaki, S., Kobayashi, H., Furukawa, J., Namikoshi, M., Okuda, S., Sato, Z., Matuda, I. & Noda, T. (1984). Studies on macrocyclic lactone antibiotics. VII. Structure of a phytotoxin" rhizoxin" produced by *Rhizopus chinensis*. *The Journal of antibiotics*, 37(4), 354-362.
- Jones, R. N. (1943). The Ultraviolet Absorption Spectra of Aromatic Hydrocarbons. *Chemical Reviews*, 32(1), 1-46.
- Kalaitzis, J. A., Cheng, Q., Meluzzi, D., Xiang, L., Izumikawa, M., Dorrestein, P. C., & Moore, B. S. (2011). Policing starter unit selection of the enterocin type II polyketide synthase by the type II thioesterase EncL. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(22), 6633-6638.
- Keatinge-Clay, A. T., Maltby, D. A., Medzihradzky, K. F., Khosla, C., & Stroud, R. M. (2004). An antibiotic factory caught in action. *Nature structural & molecular biology*, 11(9), 888-893.
- Kopp, M., Irschik, H., Pradella, S., & Müller, R. (2005). Production of the tubulin destabilizer disorazol in *Sorangium cellulosum*: biosynthetic machinery and regulatory genes. *ChemBioChem*, 6(7), 1277-1286.

Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., & Walsh, C. T. (1996). A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinyl transferases. *Chemistry & biology*, 3(11), 923-936.

Lešnik, U., Lukežič, T., Podgoršek, A., Horvat, J., Polak, T., Šala, M., Jenko, B., Harmrolfs, K., Ocampo-Sosa, A., Martínez-Martínez, L., Herron, P. R., Fujs, A., Kosec, G., Hunter, I. S., Müller, R., & Petković, H. (2015). Construction of a new class of tetracycline lead structures with potent antibacterial activity through biosynthetic engineering. *Angewandte Chemie*, 127(13), 4009-4012.

Marti, T., Hu, Z., Pohl, N. L., Shah, A. N., & Khosla, C. (2000). Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of the biosynthetic gene cluster for R1128, a non-steroidal estrogen receptor antagonist insights into an unusual priming mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 275(43), 33443-33448.

Matharu, A. L., Cox, R. J., Crosby, J., Byrom, K. J., & Simpson, T. J. (1998). MCAT is not required for in vitro polyketide synthesis in a minimal actinorhodin polyketide synthase from *Streptomyces coelicolor*. *Chemistry & biology*, 5(12), 699-711.

Meadows, E. S., & Khosla, C. (2001). In vitro reconstitution and analysis of the chain initiating enzymes of the R1128 polyketide synthase. *Biochemistry*, 40(49), 14855-14861.

Misra, A., Sharma, S. K., Surolia, N., & Surolia, A. (2007). Self-acylation properties of type II fatty acid biosynthesis acyl carrier protein. *Chemistry & biology*, 14(7), 775-783.

Mouri, Y., Konishi, K., Fujita, A., Tezuka, T., & Ohnishi, Y. (2017). Regulation of sporangium formation by BldD in the rare actinomycete *Actinoplanes missouriensis*. *Journal of bacteriology*, 199(12), e00840-16.

Myronovskyi, M., Welle, E., Fedorenko, V., & Luzhetskyy, A. (2011).  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(15), 5370-5383.



Oja, T., Palmu, K., Lehmußola, H., Leppäranta, O., Hännikäinen, K., Niemi, J., Mäntsäla, P. & Metsä-Ketelä, M. (2008). Characterization of the alnumycin gene cluster reveals unusual gene products for pyran ring formation and dioxan biosynthesis. *Chemistry & biology*, 15(10), 1046-1057.

Partida-Martinez, L. P., & Hertweck, C. (2007). A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in “*Burkholderia rhizoxina*”, the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microsporus*. *ChemBioChem*, 8(1), 41-45.

Pereda, A., Summers, R. G., Stassi, D. L., Ruan, X., & Katz, L. (1998). The loading domain of the erythromycin polyketide synthase is not essential for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiology*, 144(2), 543-553.

Perlova, O., Gerth, K., Kaiser, O., Hans, A., & Müller, R. (2006). Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* So ce56. *Journal of biotechnology*, 121(2), 174-191.

Quadri, L. E., Weinreb, P. H., Lei, M., Nakano, M. M., Zuber, P., & Walsh, C. T. (1998). Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, 37(6), 1585-1595.

Radzom, M., Zeeck, A., Antal, N., & Fiedler, H. P. (2006). Fogacin, a novel cyclic octaketide produced by *Streptomyces* strain Tü 6319. *The Journal of antibiotics*, 59(5), 315-317.

Rajgarhia, V. B., Priestley, N. D., & Strohl, W. R. (2001). The product of dpsC confers starter unit fidelity upon the daunorubicin polyketide synthase of *Streptomyces* sp. strain C5. *Metabolic engineering*, 3(1), 49-63.

Russo, G. L., Spagnuolo, C., Russo, M., Tedesco, I., Moccia, S., & Cervellera, C. (2019). Mechanisms of aging and potential role of selected polyphenols in extending healthspan. *Biochemical Pharmacology*, 113719.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145(1), 69-73.

- Scherlach, K., Partida-Martinez, L. P., Dahse, H. M., & Hertweck, C. (2006). Antimitotic Rhizoxin Derivatives from a Cultured Bacterial Endosymbiont of the Rice Pathogenic Fungus *Rhizopus microsporus*. *Journal of the American Chemical Society*, 128(35), 11529-11536.
- Staunton, J., & Weissman, K. J. (2001). Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Natural product reports*, 18(4), 380-416.
- Staunton, J., & Wilkinson, B. (1997). Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. *Chemical reviews*, 97(7), 2611-2630.
- Taguchi, T., Awakawa, T., Nishihara, Y., Kawamura, M., Ohnishi, Y., & Ichinose, K. (2017). Bifunctionality of ActIV as a Cyclase-Thioesterase Revealed by in Vitro Reconstitution of Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *ChemBioChem*, 18(3), 316-323.
- Taguchi, T., Ebihara, T., Furukawa, A., Hidaka, Y., Ariga, R., Okamoto, S., & Ichinose, K. (2012). Identification of the actinorhodin monomer and its related compound from a deletion mutant of the actVA-ORF4 gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 22(15), 5041-5045.
- Taguchi, T., Okamoto, S., Itoh, T., Ebizuka, Y., Ochi, K., & Ichinose, K. (2008). Actinoperyllone, a novel perylenequinone-type shunt product, from a deletion mutant of the actVA-ORF5 and ORF6 genes for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Tetrahedron Letters*, 49(7), 1208-1211.
- Taguchi, T., Yabe, M., Odaki, H., Shinozaki, M., Metsä-Ketelä, M., Arai, T., Okamoto, S., & Ichinose, K. (2013). Biosynthetic conclusions from the functional dissection of oxygenases for biosynthesis of actinorhodin and related *Streptomyces antibiotics*. *Chemistry & biology*, 20(4), 510-520.
- Tang, Y., Lee, T. S., Kobayashi, S., & Khosla, C. (2003). Ketosynthases in the initiation and elongation modules of aromatic polyketide synthases have orthogonal acyl carrier protein specificity. *Biochemistry*, 42(21), 6588-6595.

- Tang, Y., Koppisch, A. T., & Khosla, C. (2004). The acyltransferase homologue from the initiation module of the R1128 polyketide synthase is an acyl-ACP thioesterase that edits acetyl primer units. *Biochemistry*, *43*(29), 9546-9555.
- Teufel, R., Stull, F., Meehan, M. J., Michaudel, Q., Dorrestein, P. C., Palfey, B., & Moore, B. S. (2015). Biochemical establishment and characterization of EncM's flavin-N5-oxide cofactor. *Journal of the American Chemical Society*, *137*(25), 8078-8085.
- Toyo Brewing K. K. (1978). Japanese Patent No. 15 3104-795
- van Keulen, G., & Dyson, P. J. (2014). Production of specialized metabolites by *Streptomyces coelicolor* A3(2). In *Advances in applied microbiology* (Vol. 89, pp. 217-266). Academic Press.
- Wang, P., Gao, X., Chooi, Y. H., Deng, Z., & Tang, Y. (2011). Genetic characterization of enzymes involved in the priming steps of oxytetracycline biosynthesis in *Streptomyces rimosus*. *Microbiology*, *157*(8), 2401-2409.
- Weissman, K. J., Bycroft, M., Staunton, J., & Leadlay, P. F. (1998). Origin of starter units for erythromycin biosynthesis. *Biochemistry*, *37*(31), 11012-11017.
- Wright, L. F., & Hopwood, D. A. (1976). Actinorhodin is a Chromosomally-determined Antibiotic in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, *96*(2), 289-297.
- Xiang, L., Kalaitzis, J. A., & Moore, B. S. (2004). EncM, a versatile enterocin biosynthetic enzyme involved in Favorskii oxidative rearrangement, aldol condensation, and heterocycle-forming reactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(44), 15609-15614.
- Xu, Z., Metsä-Ketelä, M., & Hertweck, C. (2009). Ketosynthase III as a gateway to engineering the biosynthesis of antitumoral benastatin derivatives. *Journal of biotechnology*, *140*(1-2), 107-113.
- Zhang, M., Hou, X. F., Qi, L. H., Yin, Y., Li, Q., Pan, H. X., Chen, X. Y. & Tang, G. L. (2015). Biosynthesis of trioxacarcin revealing a different starter unit and complex tailoring steps for type II polyketide synthase. *Chemical science*, *6*(6), 3440-3447.

Zhang, W., Ames, B. D., Tsai, S. C., & Tang, Y. (2006). Engineered biosynthesis of a novel amidated polyketide, using the malonamyl-specific initiation module from the oxytetracycline polyketide synthase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(4), 2573-2580.

## 謝辞

本研究をこうして博士論文にまとめるに至るまで、醗酵学研究室をはじめとする多くの方々のお力添えを頂いて参りました。

醗酵学研究室教授、大西康夫先生からは、真摯に学問と向き合おうとする姿勢、学術を探究する人間としての誠実な態度から研究者としての心構え、覚悟を学ばせていただきました。私の研究についても鋭い指摘や助言を頂いた事はとても励みになりました。他の学生の方々よりも研究に随分と時間のかかってしまった私ですが、今日に至るまで醗酵学研究室の教授として御心を砕いて頂いた事、申し訳なく思うとともに心より感謝を申し上げます。

同研究室准教授、勝山陽平先生からは私が同研究室に所属してから今日に至るまでの8年間にわたり直接の御指導を頂きました。生化学、微生物学に関する知識に始まり、分析機材の使用法、データの解析方法、果ては研究内容の発表の手法に至るまで、実に多くのことを御指導いただきました。至らない所ばかりの学生で、勝山先生には随分ご迷惑をおかけした事と存じます。先生を困惑させてしまうこともあったことでしょう。で、ありながらも今日に至るまで御指導下さり、本当にありがとうございました。こうしてこれまでの研究を形にすることが出来たことも先生のお力添えを頂いたお陰です。本当にお世話になりました。

同研究室助教授、手塚武揚先生からは、実験のことに関してとても多くのご助言を頂きました。特に放線菌の取り扱い等に関して大変お世話になりました。相談に行く度にご多忙であるにも関わらず快く指導して下さいましたこと、本当にありがとうございました。

生物生産工学研究センターの川崎寿特任教授からは、研究室始めの時、あるいはゼミの後に貴重なお話を聞かせていただきました。民間企業での研究経験をお持ちでいらっしゃる川崎先生のお言葉は大変貴重なものでした。また、研究生活に関する相談を聞いて頂いたこともありました。心より御礼申し上げます。

微生物潜在酵素寄付講座の尾仲宏康教授からは、研究会等での御助言だけでなく、暖かい励ましの言葉を頂きました。また、輪読会を介してより多くの知識に触れる機会を設けて下さいました。暑気払いの席を設けられた際等には私共醗酵学研究室の学生にもお声掛けくださり、学識だけでなく交流の場を頻繁に設けてくださったことも度々ありました。心より御礼申し上げます。

同研究室の浅水俊平先生からは、輪読会やゼミの後の飲み会の席などで大変参考になる話を聞かせて頂きました。また、分析機器についてご指導頂いたこともありました心より御礼申し上げます。

私は人に比べるとだいぶ長いこと醗酵学研究室の学生でいたため、先輩、同期や後輩が多くいます。醗酵学研究室二階の部屋だけでも野本竜平博士、牧野拓也博士、菅井佳宣博士、佐藤龍太郎先輩、林貴之先輩、キムヒョウキョン先輩、アデリンムリアンディ先輩、胡韋先輩、大野翔登先輩、高橋里菜さん、曾根薫君、池田かすみさん、角田毅君、室井太樹君、堤隼馬君、太島有香さん、牡丹瑤さん、富田宏矢博士、浅野麻衣さん、萩原亮太君、東山洋輔君、小川友希さん、山田研人君、藤田夏澄さん、桜雅也君、上野堅登君、菅英一郎さん、浦野直樹君、堀内真展、川合誠司君、とても沢山います。そんな先輩、後輩、同期の方々との研究室での生活はとても実りあるものでした。ある人は昼夜を問わず実験を行い、その姿に感嘆することもありました。またある人とは趣味の話や四方山話に花を咲かせることもありました。ある人からは励ましの言葉を貰い、またある人は実験のことでよく相談に乗っていただきました。

醗酵学研究室にやって来てから8年間、研究に行き詰まり視野狭窄に陥ること、自身の至らなさに遣る瀬ない想いを抱くことも度々ありました。それでも、多くの方々の助力をいただいて今日まで研究に励んで来ることが出来ました。心より御礼申し上げます。私がこれまで研究に打ち込んでこられたのは、私の周りにいる方々の暖かい助力があったからこそその話です。最後に、これまで私に力を貸してくれた醗酵学研究室、微生物潜在酵素寄付講座関係者の方々

に改めて感謝の想いを伝えたいと思います。本当に、ありがとうございました。