

平成 20 年度 博士論文

放線菌の生産するジテルペン化合物
サイクロオクタチンの生合成に関する研究

東京大学

大学院農学生命科学研究科

応用生命工学専攻

金 承榮

放線菌の生産するジテルペン化合物
サイクロオクタチンの生合成に関する研究

応用生命工学専攻

平成 18 年度博士課程入学

氏名 金 承榮

指導教員 西山 真

目次

略語一覧	4
序論	7
第一章 <i>S. melanosporofaciens</i> MI614-43F2 が生産するサイクロオクタチンの 生合成遺伝子クラスターの同定	19
第一節 <i>S. melanosporofaciens</i> MI614-43F2 ゲノムライブラリーの作製	20
第二節 サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターを含むコスミド ライブラリーのスクリーニング、および異種発現	27
第三節 サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの解析	33
第四節 サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの最小単位の決定	40
第五節 考察	45
第二章 サイクロオクタチンの骨格形成に関わる酵素の機能解析	48
第一節 GGDP 合成酵素 (CotB1) の機能解析	49
第二節 テルペン環化酵素 (CotB2) の機能解析	53
第三節 CotB2 反応産物の構造解析	59
第四節 考察	65
第三章 テルペン骨格の修飾に関わる酵素の機能解析	67
第一節 チトクローム P450 遺伝子 CotB3 の機能解析	68
第二節 CotB3 反応産物の構造解析	77
第三節 チトクローム P450 遺伝子 CotB4 の解析	82
第四節 考察	90

第四章 テルペン環化酵素 (CotB2) の結晶構造解析	92
第一節 CotB2 組換えタンパク質の調製	96
第二節 CotB2 の結晶構造解析	99
第三節 考察	107
総括	114
実験の部	122
引用文献	141
謝辞	146

略語一覽

試薬名

Amp	ampicillin
Kan	kanamycin
Tsr	thiostrepton
Apr	apramycin
Acetyl CoA	Acetyl coenzyme A
Acetoacetyl CoA	Acetoacetyl coenzyme A
CDP-ME	4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol
CDP-ME2P	2-Phospho-4-(cytidine 5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol
DMAPP	Dimethylallyl diphosphate
DPMVA	Diphosphomevalonate
DTT	DL-Dithiothreitol
DXP	1-Deoxy-D-xylulose 5-phosphate
FPP	Farnesyl diphosphate
GAP	D-Glyceraldehyde-3-phosphate
GGPP	Geranylgeranyl diphosphate
GPP	Geranyl diphosphate
HMBDP	(<i>E</i>)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A
IPP	Isopentenyl diphosphate
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
MECDP	2-C-Methyl-D-erythritol 2,4-cyclodiphosphate
MeOH	Methanol
MEP	2-C-Methyl-D-erythritol 4-phosphate
MVA	mevalonate
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethane

菌属名略称

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

その他

ESI	Electro spray ionization
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometer
HPLC	High performance liquid chromatography
LC-MS	liquid chromatography -Mass Spectrometer
MS	Mass spectrometry
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOE	Nuclear Overhauser Effect
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
COSY	Correlate Spectroscopy
HMBC	¹ H-Detected Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	¹ H-Detected Heteronuclear Single Quantum Coherence
HR-EIMS	High Resolution Electron-Impact Mass Spectrum
TLC	Thin-Layer Chromatography
OD	Optical density
ORF	Open reading frame
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
UV	Ultra Violet

序論

テルペノイド(イソプレノイド)は、ステロイドやカロテノイドなどに代表される天然に24,000種以上の報告があるほど多様な構造を持つ化合物群で、その構造の多様性ゆえに様々な生理活性を持つ化合物が存在する。我々の生活における身近な例では、軽度の抗炎症薬であるメントール、化粧品やサプリメントの成分として用いられているスクアレン、植物ホルモンであるジベレリン、抗がん活性を有するタキソール、ほかにも各種カロテノイド、天然ゴムなどが挙げられる(図) [1]。

これらのテルペノイド化合物の多くは、酵母やカビ、植物などにより生産されるため、真核生物を対象とした研究が広く行われてきた。しかしながら最近では、細菌がメバロン酸経路とは異なるテルペノイド生合成経路(MEP経路)を持つことや、細菌のなかでも放線菌においては、ごく稀に、メバロン酸経路とMEP経路の2つの生合成経路を同時に利用するものが存在することなど、微生物においてテルペノイド生合成研究は新たな展開を見せている[2]。特に放線菌は二次代謝の多様性を持つため、生合成遺伝子・酵素に関する有用な情報源、また研究材料として今後のテルペノイド生合成研究に新しい知見を与えることが期待されている。

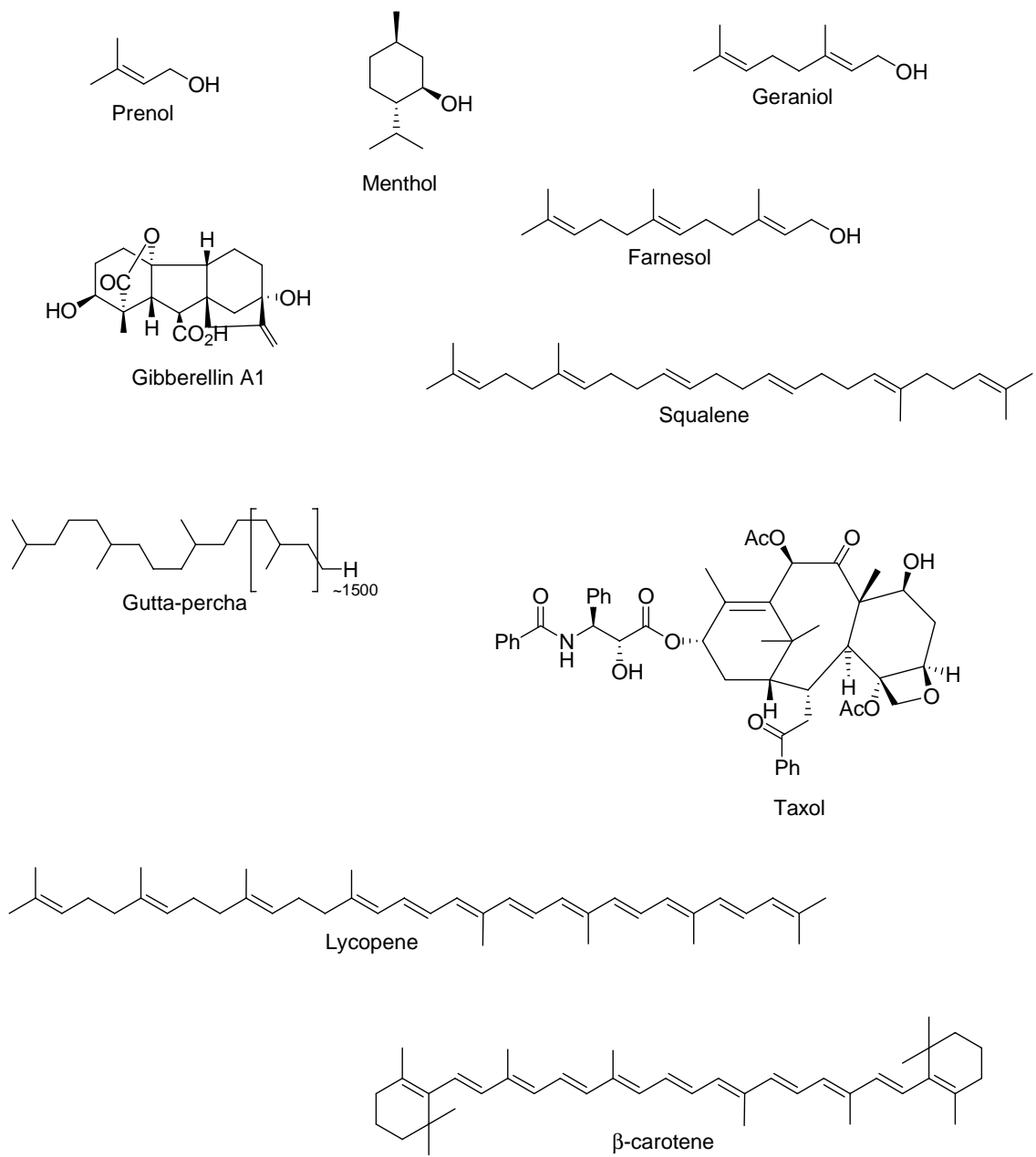


図 . 代表的なテルペノイド

これらすべてのテルペノイドは、炭素5個からなる isopentenyl diphosphate (IPP) と、その異性体である dimethylallyl diphosphate (DMAPP) を基本単位とした縮合反応により生成される。IPP の生合成経路として、メバロン酸経路(図)が古くから知られている[3] [4]。メバロン酸経路では、まず3分子の acetyl-CoA が縮合して 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) となり、次いで、HMG-CoA reductase によって環元されてメバロン酸 (MVA) が生成する。さらに、MVA は2度のリン酸化と脱炭酸を経て IPP となり、IPP isomerase (IDI) により DMAPP が生合成される。

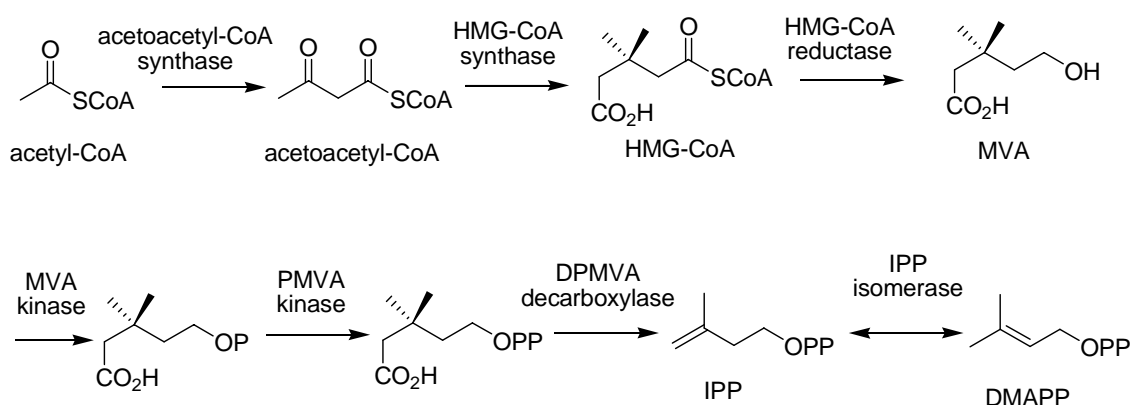


図 . メバロン酸経路

1950年代から酵母や動物で詳細に研究されたこのメバロン酸経路が、微生物、古細菌、動物、高等植物などのすべての生物に共通して存在する唯一のIPPの生合成経路であると長い間考えられてきた。しかしながら、古くは1960年代から、メバロン酸経路の普遍性に対して矛盾を示す現象が報告されていた。すなわち、ある種の微生物や植物においては標識した酢酸やメバロン酸などのメバロン酸経路の前駆体や中間体がテルペノイドに取り込まれにくいことや、標識したグルコースの取り込み実験においてメバロン酸経路では説明ができない標識パターンを示すことなどの報告がなされていた[5] [6] [7]。

1980年代後半から検証を行っていたRohmerらは、メバロン酸経路とは全く異なる新しいIPP生合成経路の存在を提唱し、しかもこの経路が広い範囲の生物に

分布しているという驚くべき報告を行った[8][9]。この新しい経路は、提唱者の名前をとった「Rohmer's pathway」、メバロン酸を経由しないことから「非メバロン酸経路(nonmevalonate pathway)」、また、やがて報告された中間体より「1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate(DXP)経路」や「2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP)経路」などと、さまざまな名称で呼ばれてきたが、最近では、広くMEP経路と記載されている(図)。

現在までに、多くの真正細菌や高等植物の色素[10]、緑藻[9]、マラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) [11]がMEP経路のみを利用する一方、高等植物の細胞質、哺乳動物、酵母、カビ、古細菌にはMEP経路は存在せず、メバロン酸経路のみを利用することが判明してきている(図)。

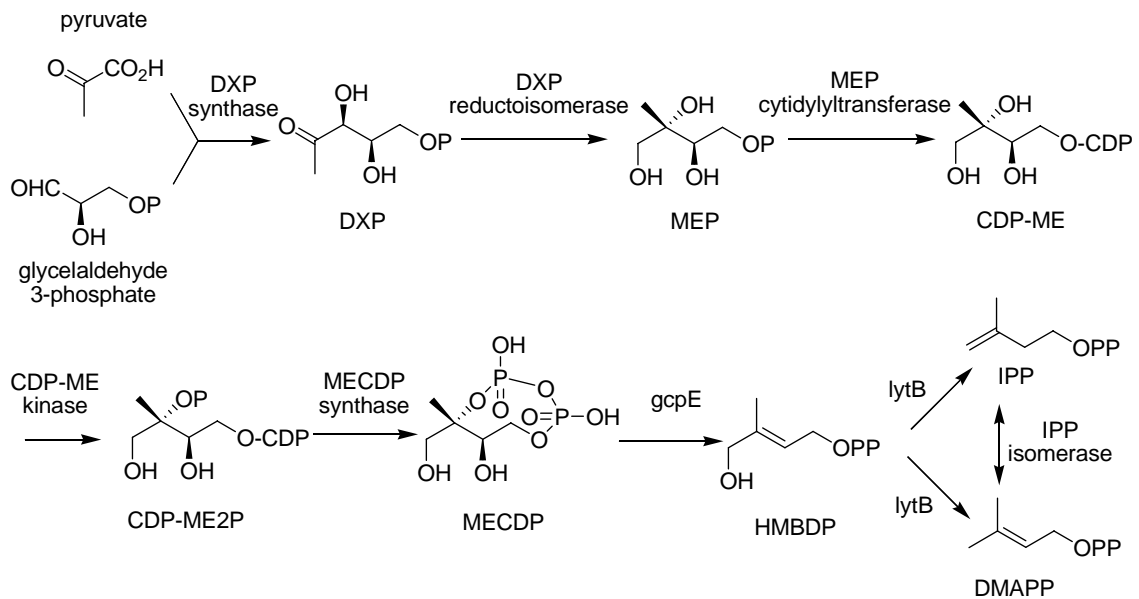


図 . MEP経路

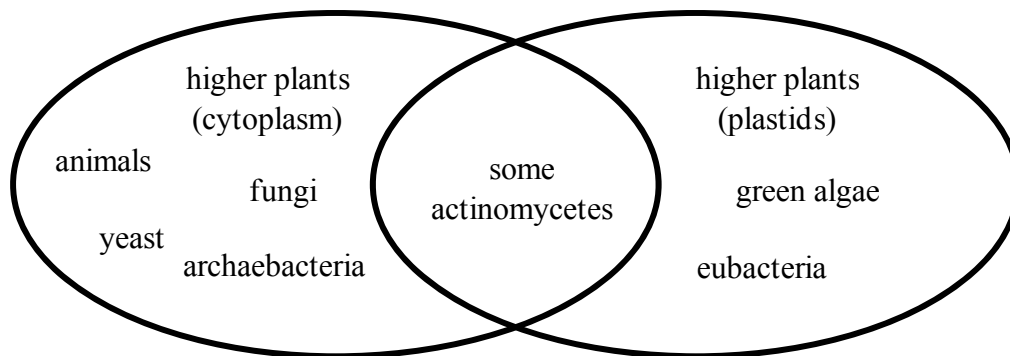


図 . メバロン酸経路と MEP 経路

メバロン酸経路あるいは非メバロン酸経路により生合成されるIPPが、その異性体DMAPPにhead to tailで順次縮合することで、5の倍数の炭素数の鎖長のプレニル基質が合成される。たとえば、geranyl diphosphate (GDP; 炭素数10個)、farnesyl diphosphate (FDP; 炭素数15個)、geranylgeranyl diphosphate (GGDP; 炭素数20個)より生合成されるものを、それぞれモノテルペン、セスキテルペン、ジテルペンと呼ぶ。さらに、環状テルペン類は、それぞれに特異的なテルペン環化酵素により環化反応、場合によっては炭素転移反応を介して環状炭化水素となり、基本炭素骨格が形成される。その後、P450などにより化学修飾を受け、様々なテルペン類が生合成される。数万種類存在するといわれるテルペン類は、このような単純な仕組みにより、多様性が生み出されて生合成される(図V)[1]。

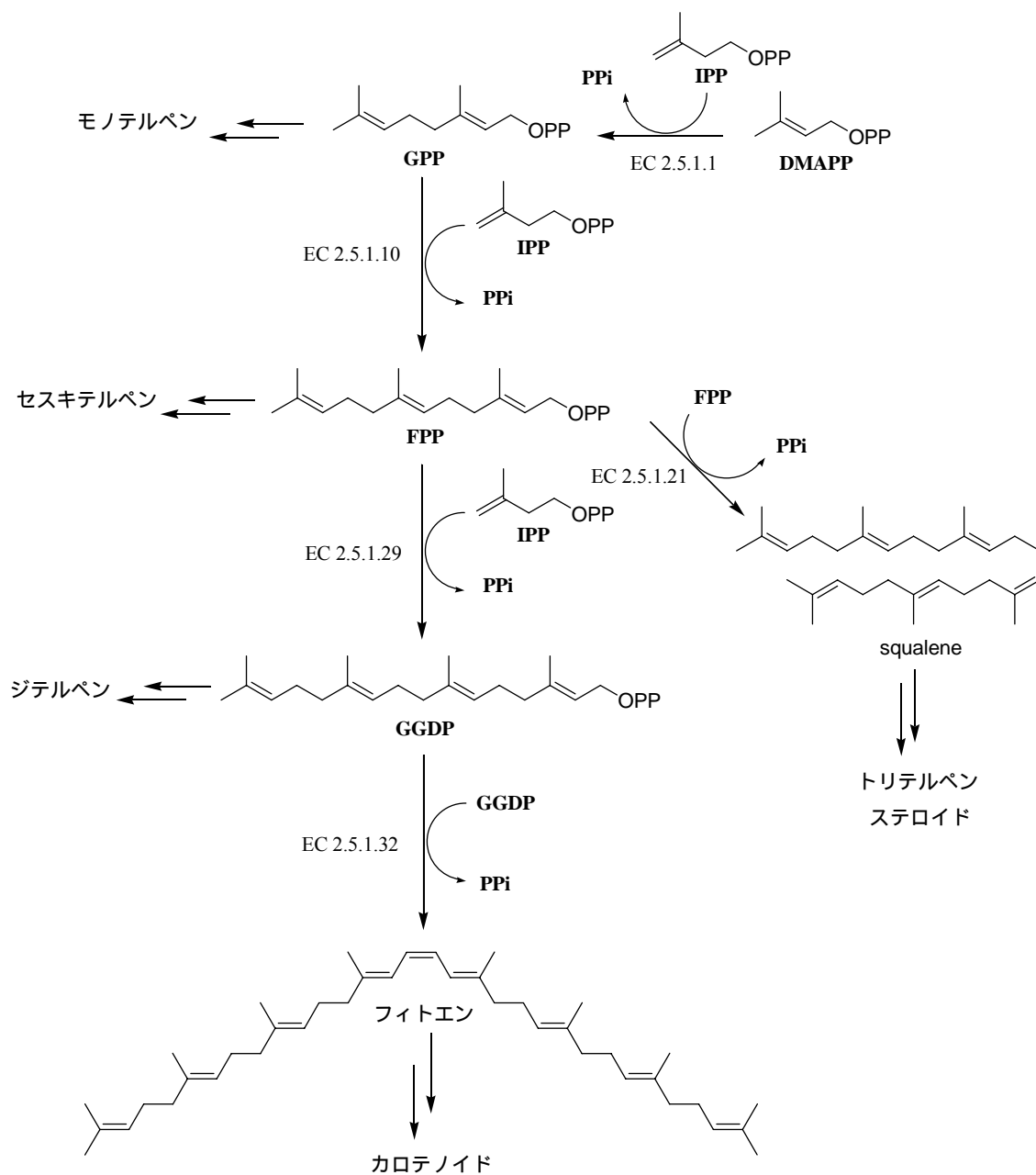


図 . テルペノイドの生合成経路

EC 2.5.1.1 ; dimethylallyltransferase、 EC 2.5.1.10 ; geranyltransferase、
 EC 2.5.1.29 ; farnesyltransferase、 EC 2.5.1.32 ; phytoene synthase、 EC
 2.5.1.21 ; squalene synthase

本論文の主課題であるジテルペン環化酵素とは、ジテルペン共有の前駆プレニル基質GGDP、あるいはピロリン酸を残したその部分環化物の環化反応を触媒する酵素である。ジテルペン環化酵素に限らず、テルペン環化酵素はアスパラギン酸/グルタミン酸リッチなモチーフを有し、2価金属イオン、特にMg²⁺を要求する可溶性酵素である。反応機構も各テルペン類に共通で、プレニル基質のジリン酸アニオン脱離によるオレフィンのprotonation化を引き金として、炭素-炭素結合形成ばかりではなく、場合によってはhydride shift転移、炭素骨格転移なども介して環化する[12]。

本研究では、放線菌の生産するジテルペン化合物サイクロオクタチンの生合成に関する研究を行った (図)。サイクロオクタチン(cyclooctatin)は、lysophospholipidの脂肪酸エステル結合を加水分解するlysophospholipaseの阻害剤である[13]。この阻害剤は、lysophospholipaseを標的とした抗炎症剤のリード化合物の開発を目的としたスクリーニングの過程で、*Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2から単離された原核生物由来で初めての5-8-5員環構造を有するジテルペン化合物である[14]。

サイクロオクタチンのような環状テルペノイドも、プレニル鎖長を決定するポリプレニルジリン酸合成酵素により生成した直鎖状ポリプレニルジリン酸がテルペン環化酵素によって環化されて炭素骨格が形成された後、酸化や還元等の化学修飾を受けて生合成される。このような生合成過程において、geranylgeranyl diphosphate (GGDP) cyclase のような環化酵素は、直鎖ポリプレニルジリン酸を構造多様な環状テルペノイド化合物へと変換するための鍵酵素である。

これまで、GGDP cyclase (ジテルペン環化酵素)のほとんどが高等植物と真菌から単離され、解析されている[15]。この酵素群の環化様式は、1) A型、2) B型、3) A-B型、そして4) B-A型に分類される。A型反応はGGDPのジリン酸のionizationにより、B型反応はGGDPの末端二重結合のprotonationによってそれぞれ環状化合物を生成する。A型反応とB型反応が複合して起こるのがA-B型とB-A型の反応であり、ionizationとprotonationの順番により、これら二つに分類される。これまでに原核生物由来のGGDP cyclaseについては、terpentecinを生産する*Kitasatospora griseola*由来のterpentedinol diphosphate synthase[16]、viguiepinolを生産する*Streptomyces* sp. KO-3988由来のent-copalyl diphosphate

synthase[17]、そして *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv3377c 由来の 5,13-halimadiene diphosphate synthase[18]についてのみ報告されている。これら三つの GGDP cyclase はいずれも B 型の様式で環化反応を触媒する(図)。

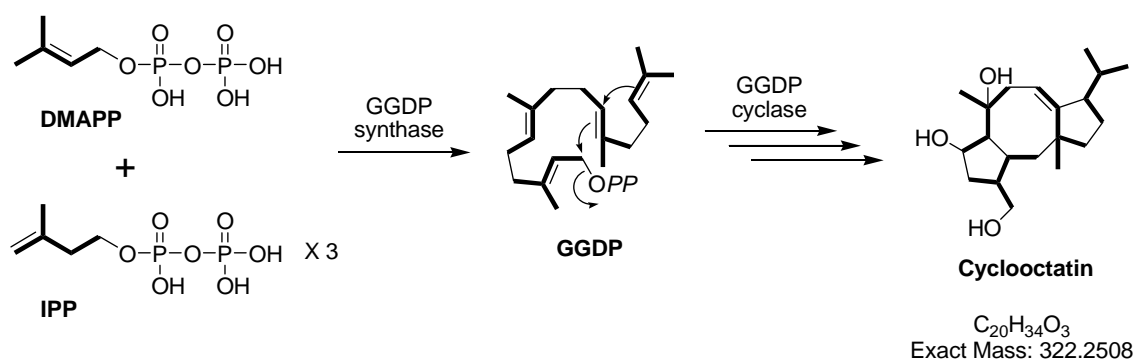
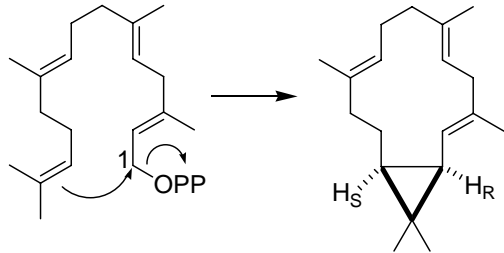
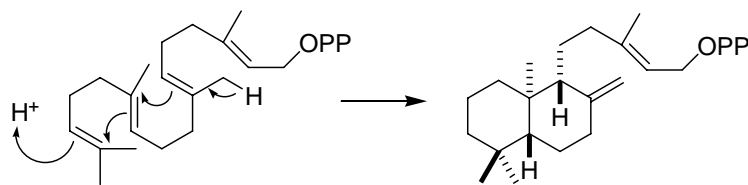


図 . サイクロオクタチンの推定生合成経路

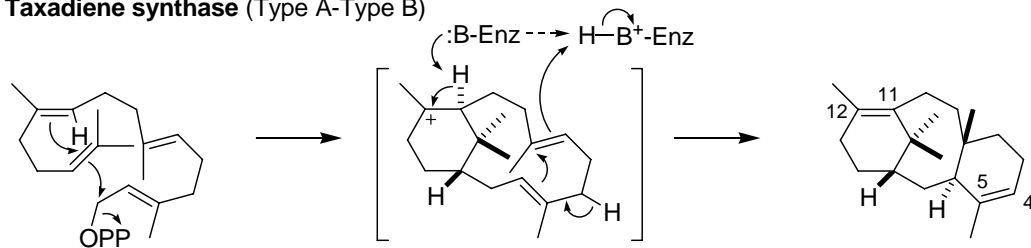
Casbene synthase (Type A)



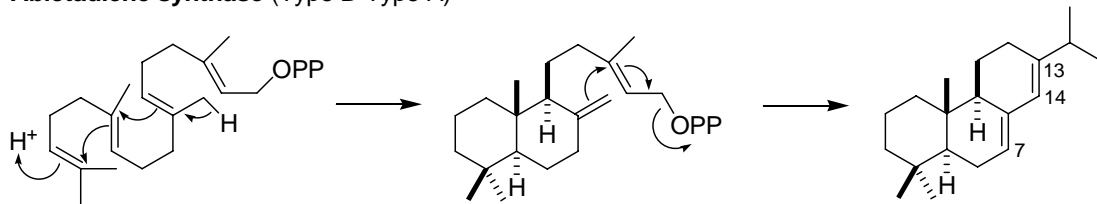
ent-Copalyl diphosphate synthase (Type B)



Taxadiene synthase (Type A-Type B)



Abietadiene synthase (Type B-Type A)



ent-Kaurene synthase from *Phaeosphaeria* sp. L487 (Type B-Type A)

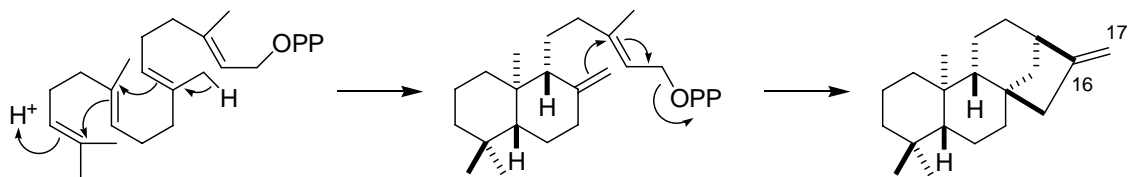
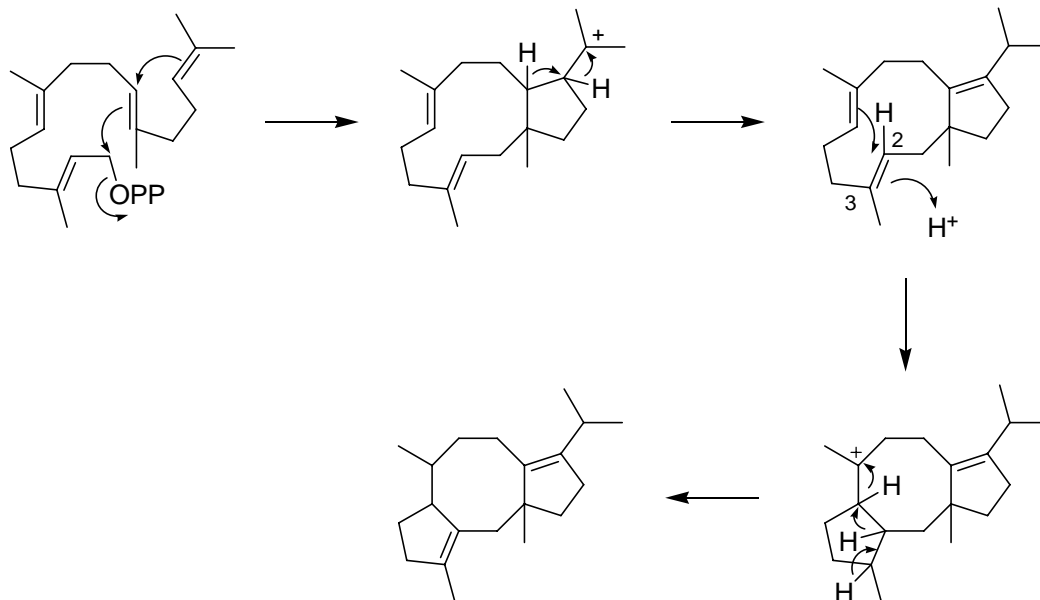
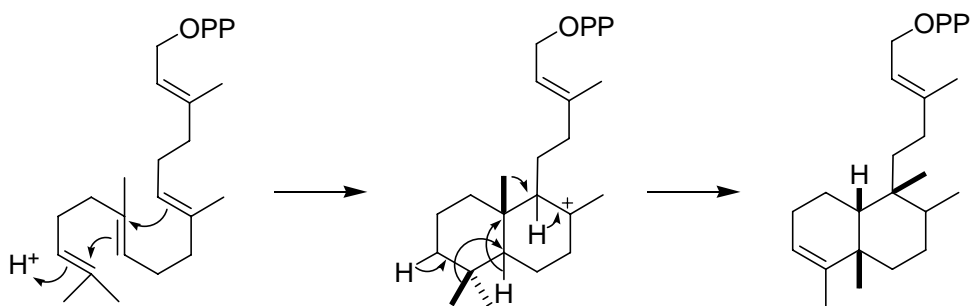


図 . ジテルペン環化酵素の反応

Fusicocca-2,10(14)-diene synthase (Type A-Type B)



Terpentedienol diphosphate synthase (Type B)



Halima-5(6),13-diene diphosphate synthase (Type B)



図 . ジテルペン環化酵素の反応

最近、植物病原性真菌である *Phomopsis amygdali* から A-B 型の fusicocca-2,10(14)-diene synthase (PaFS) が同定された (図) [19]。この PaFS は多機能酵素であり、N-末側の GGDP cyclase に続いて、C-末側に GGDP synthase が融合している。fusicocca-2,10(14)-diene とサイクロオクタチンの構造類似性から、fusicocca-2,10(14)-diene がサイクロオクタチンの重要な中間体であり、PaFS のような多機能酵素がサイクロオクタチン生合成経路に関与すると予想されたが、サイクロオクタチンの生合成経路に関する情報はまったくなかった。

本研究の目的は、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 が生産する lysophospholipase 阻害剤、サイクロオクタチンの生合成遺伝子クラスターのクローニング、および生合成遺伝子クラスターの機能解析 (第一章)、特に環化酵素の同定と環化反応機構の解明を中心としたサイクロオクタチン生合成経路の全容解明である (第二章と第三章)。また、ジテルペン環化酵素としては初めての結晶構造解明も目的としている (第四章)。

第一章

S. melanosporofaciens MI614-43F2 が生産する サイクロオクタチンの生合成遺伝子 クラスターの同定

第一節 *S. melanosporofaciens* MI614-43F2 のゲノムライブラリーの作製

第一項 GGDP 合成酵素遺伝子の部分配列取得のための PCR プライマーの設計

実験方法

サイクロオクタチンはその構造から、炭素 20 個からなるジテルペンであるため、その生合成遺伝子クラスターは GGDP 合成酵素遺伝子とクラスターを形成していることが予想される。そこで、まずは、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 のゲノム DNA から GGDP 合成酵素遺伝子をクローニングすることを試みた。

GGDP 合成酵素遺伝子をクローニングするための縮重プライマーは、既知の放線菌由来の GGDP 合成酵素の塩基配列を利用した。他の放線菌が生産するジテルペン化合物の例としては、terpentecin 生産菌である *S. griseolosporeus* MF730-N6 (Accession number, BAB07816) と、copalyl diphosphate 生産菌である *Streptomyces* sp. KO-3988 (Accession number, BAD86799) の 2 つの例が報告されており、その GGDP 合成酵素の機能が解析されている。

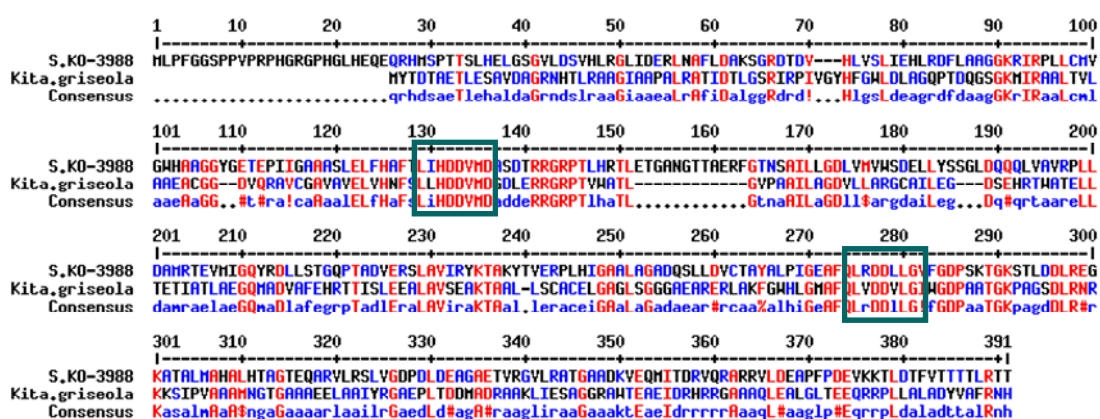


図 1-1-1. 放線菌由来の GGDP 合成酵素の
アミノ酸配列のアラインメント

結果

S. griseolosporeus MF730-N6 と *Streptomyces* sp. KO-3988 を含めた 2 種類の GGDP 合成酵素のアミノ酸配列を用いてアラインメントを取り、図 1-1-1 のように高度に保存された配列を選び、この部分配列を利用して表 1-1-1 に示した縮重プライマーを設計した。

表 1-1-1. GGDP 合成酵素遺伝子のクローニングに用いたプライマー

Forward: 5'-CTS MTS CAS GAC GAC TAC ATG GA

Reverse : 5'-SAG SAG GTC GTC SCG SAK CTG GAA

第二項 GGDP 合成酵素を含む PCR 断片の精製とコスミドライブラリーの構築

実験方法

表 1-1-1 に示した縮重プライマーを用いて、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 のゲノム DNA をテンプレートにして PCR を行った。ゲノム DNA は、Practical *Streptomyces* Genetics [20]に従って、CTAB 法で精製した。プライマー配列間の塩基数は約 420 bp であり、プライマーを含めて約 465 bp 部分が増幅すると予想した。PCR の結果、予想通り約 470 bp の DNA 断片が増幅した。その PCR 断片を精製し、ライゲーションを行い、pT7Blue T-vector (TaKaRa)にクローニングして、シーケンスを解析した。

PCR 反応

Ex taq (TaKaRa)を用い、以下の反応条件で行った。

95	5 分	
98	20 秒	} 30 回
68	1 分	
72	10 分	
4	保存	

結果

得られた4種類のPCR産物の塩基配列解析の結果についてアラインメントを取ったところ、全て同一の配列であった。よってサイクロオクタチンの生合成遺伝子の中には、geranylgeranyl diphosphate synthase (GGDPs)遺伝子はサイクロオクタチン生産菌のゲノム上に1コピーのみ存在する可能性が高いと考えられる。図 1-1-2 にその部分塩基配列と推定アミノ酸配列を示す。

>f1_(1..471) 468 bp

CTGATCCACGACGACGTCATGGA CGACAGCGACACCCGCCGCGGCCGGCCGACCATCCAC
CGCACCCCTGGCCGCGCTGTGTGCCACCGACCGCAGGCCCGAGCAGATCGAGCGGTTCCGGG
GTCAGCGGGGCGGTGCTGCTCGGCGACCTCGCCCTCACCTGGTCCGACGAGCTCCTGCAC
TCCGCCGGTCTGACGCCCGTCCAGTTCGACGCCGTA CTGCCGCTGCTGTCGGAGATGCGC
ACCGAGGTGATGCTGGGCCAGTACCTCGATCTCCAGGCCACCGGGGAGCTGACGGACGAC
GTCGAGGCCACCCTCACGGTCAACCGGTACAAGACCGCCAAGTACACCATCGAGCGTCCG
CTGCACGTCCGAGCCGCCATCGCGGGCGCCGGCCCGGAGGCCATGGAGGCGTTCACCGCC
TAGGCCCTGCCGCTCGGCGAGGCGTTCAGCTCCGCGACGATCTGCTG

>f1_(1..468) 156 aa

LIHDDVMDDSDTRRRGRPTIHRTLAALCATDRRPEQIERFGVSGAVLLGDLALTWSDELLH
SAGLTPVQFDAVLPLLSEMRTEVMLGQYLDLQATGELTDDVEATLTVNRYKTAKYTIERP
LHVGAALAGAGPEAMEAFTAYALPLGEAFQLRDDLL

図 1-1-2. GGDP 合成酵素の PCR プライマーを用いた
PCR 産物の部分塩基配列（上）と推定アミノ酸配列（下）
赤字はプライマー部分の配列を示す。

得られた PCR 産物の塩基配列解析の結果に対して Blast 検索を行ったところ、図 1-1-3 に示すように *Streptomyces* sp. KO-3988 由来の GGDP 合成酵素とアミノ酸配列で 65 %の相同性を示した。よって得られた PCR 産物は GGDP 合成酵素の部分配列をコードしていると考えられた。

BAD86799 geranylgeranyl diphosphate synthase [Streptomyces sp. KO-3988]

Length=388

Score = 196 bits (497), Expect = 7e-49, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 102/156 (65%), Positives = 118/156 (75%), Gaps = 4/156 (2%)

```

Query 1  LIHDDVMDDSDTRRRGRPTIHRTLAAALCATDRRPEQIERFGVSGAVLLGDLALTWSDELLH 60
          LIHDDVMD SDTRRRGRPT+HRTL      T      ERFG + A+LLGDL + WSDLL+
Sbjct 126 LIHDDVMDASDTRRRGRPTLHRTLE----TGANGTTAERFGTNSAILLGDLVMVWSDDELY 181

Query 61  SAGLTPVQFDAVLPLLSEMRTEVMLGQYLDLQATGELTDDVEATLTVNRYKTAKYTIERP 120
          S+GL  Q  AV PLL MRTEVM+GQY DL +TG+ T DVE +L V RYKTAKYT+ERP
Sbjct 182  SSGLDQQQLVAVRPLLDAMRTEVMIGQYRDLLSTGQPTADVERSLAVIRYKTAKYTVERP 241

Query 121 LHVGAAIAGAGPEAMEAFTAYALPLGEAFQLRDDLL 156
          LH+GAA+AGA  ++ TAYALP+GEAFQLRDDLL
Sbjct 242 LHIGAALAGADQSLLDVCTAYALPIGEAFQLRDDLL 277

```

図 1-1-3. PCR 産物の推定アミノ酸配列と *Streptomyces* sp. KO-3988 由来 GGDP 合成酵素の相同性検索結果

第三項 コスミドライブラリーの作製

実験方法

まず *S. melanosporofaciens* MI614-43F2 のゲノム DNA のコスミドライブラリーの作製を行った。本研究では放線菌 - 大腸菌シャトルコスミドベクターである pOJ446 [21]を用いることとした。このコスミドは 35 ~ 45 kb ほどの DNA 断片をインサートとすることができる自律複製型のコスミドベクターで、異種発現を目的として構築されたものである。

RNase処理したサイクロオクタチン生産菌のゲノムDNAを 40 kbほどのランダムな断片に切断するために、適当量のゲノムDNAを 10^{-2} から 10^{-5} 倍まで濃度に希釈した*Sau3AI*によって部分的に切断し、サンプルの一部をアガロースゲルを用いた電気泳動に供してその消化状態を確認した後、 10^{-4} から 10^{-5} 倍希釈の*Sau3AI*で部分消化したDNA断片をエタノール沈殿して挿入断片とした。

コスミドベクター-pOJ446 は、マルチクローニングサイト内にある *Bam*HI サイトで切断して使用した。挿入するゲノム DNA およびコスミドベクターは、T4 DNA ligase (TaKaRa) を用いて 16 °C で 16 時間ライゲーション反応を行った。ライゲーション反応後、サンプルの一部を 0.8 %アガロースゲルを用いた電気泳動に供し、サイズマーカーとの DNA サイズの比較から反応の進行を確認したのちパッケージング反応を行った。パッケージング反応は Gigapack III Gold Packaging Extract または同 XL Packaging Extract(とともに STRATAGENE)を用い、宿主には *E. coli* XL1-blue MRF'株 (STRATAGENE より購入) を用いた。パッケージングの操作は付属のプロトコールに従った。ファージを感染させた XL1-blue MRF'株を pOJ446 の選択マーカーである apramycin を含む LB 寒天培地に広げ、30 °C で 2 日間 (目安 36 ~ 40 時間) 培養した。

結果

その結果、MI614-43F2 のゲノムDNAのコスミドライブラリーは、 3.8×10^3 個以上のクローンを含むことが確認され、上記のGGDP 合成酵素のPCRプライマーであるForward: 5'-CTS MTS CAS GAC GAC TAC ATG GAとReverse: 5'-SAG SAG GTC GTC SCG SAK CTG GAAを利用してGGDP 合成酵素遺伝子を含むコスミドを探索した。



図 1-1-4. ゲノム DNA の *Sau3AI* によって部分的に切断

第二節 サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターを含むコスミドライブラリーのスクリーニング、および異種発現

第一項 コスミドライブラリーのスクリーニング

実験方法

MI614-43F2のゲノムDNAのコスミドライブラリーのスクリーニングは、 3.8×10^3 個以上のコスミドクローンを含む大腸菌菌体をHybond-N⁺(GE Healthcare)に附着させ、ECL Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System (GE Healthcare)を用いて付属のプロトコールに従いコロニーハイブリダイゼーション法で行った。プローブには*S. melanosporofaciens* MI614-43F2のゲノムDNAからクローニングされたGGDP合成酵素遺伝子の部分配列(第一章第二項)を含むDNA断片を用いた。シグナルが検出されたコロニーをLB-apramycin液体培地で20時間、30°Cで培養しアルカリ法を用いてコスミドを抽出した。正しいコスミドが選択されていることを確かめるために、放線菌のスクリーニングで用いたPCR反応を使ってコスミドからGGDP合成酵素遺伝子に相当する大きさのDNAの増幅を確認した。得られたコスミドを適当な制限酵素で完全に切断し、サザンハイブリダイゼーションを行った。試薬はコロニーハイブリダイゼーションと同様のものを使い、操作も付属のプロトコールに従った。標的遺伝子も同様に*S. melanosporofaciens* MI614-43F2のゲノムDNAからクローニングされたGGDP合成酵素遺伝子を用いた。予め、適当な制限酵素を検索するべく、それぞれのゲノムDNAをいくつかの制限酵素で処理した。これを基にそれぞれのコスミドを処理し、適当な数の断片が得られる制限酵素でサザンハイブリダイゼーションを行った。*S. melanosporofaciens* MI614-43F2のコスミド、およびゲノムDNAはBamHI、SmaI、HincIIによって完全に切断した。

結果

コロニーハイブリダイゼーションの結果、複数のシグナルが得られたため（図 1-2-1）各コロニーからコスミドを抽出した。次に、PCR によって GGDP 合成酵素遺伝子に相当する大きさの DNA 断片の増幅を確認し、確認の取れたサンプルをサザンハイブリダイゼーションに供した。それぞれの電気泳動写真、および対応するサザンハイブリダイゼーションの結果を図 1-2-2 に示した。

コスミドライブラリーでは5つのコスミドについてプローブとの結合を示すシグナルが検出でき、ゲノム DNA から同じ大きさの断片でシグナルを検出できた。しかしそのうち3つは電気泳動のバンドパターンが同じであったためコスミドは2種類と判断した。

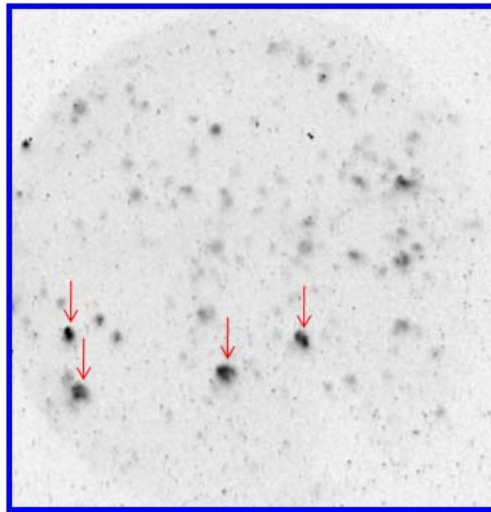
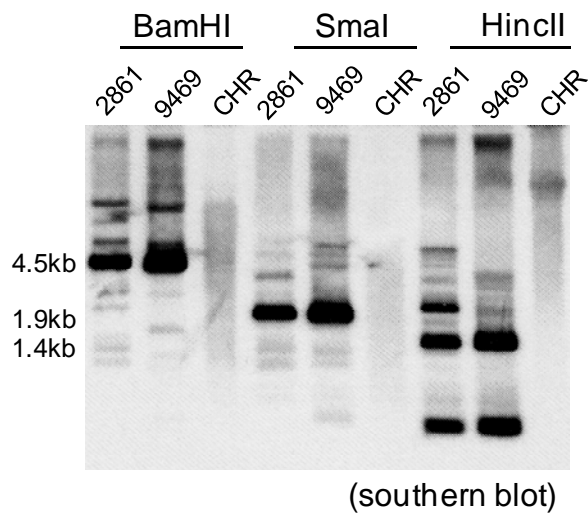
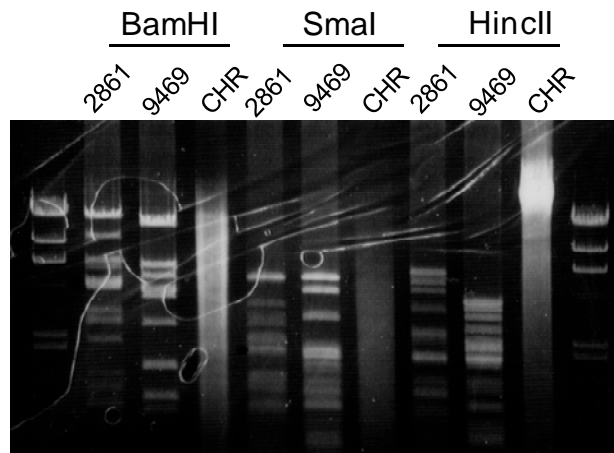


図 1-2-1. コロニーハイブリダイゼーション



(southern blot)

図 1-2-2. サザンハイブリダイゼーション

第二項 陽性コスミドクローンの異種発現

続いて、取得したコスミドを *S. albus* 株に導入して、その形質転換体においてクローニングされた遺伝子の異種発現を試みることにした。*S. albus* 株は、異種生産の宿主としてよく用いられている放線菌である[22]。*S. albus* 宿主、およびその形質転換体の培養抽出物を HPLC/LC-MS に供し、宿主との代謝プロファイルと比較することで形質転換体に特異的な化合物が得られれば、その化合物が導入した遺伝子に由来するものである可能性が極めて高く、サイクロオクタチン生合成遺伝子がクローニングされているならばサイクロオクタチンが得られることが予測される。そこで、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 から得られた2つのコスミドクローンを用いて実験を行った。

実験方法

プロトプラスト法を用いて *S. albus* に *S. melanosporofaciens* MI614-43F2 より得た2つのコスミドを導入した。*S. albus* のプロトプラストを R2YE 寒天培地に植菌し、30 °C で16時間培養したのち apramycin を終濃度 25 µg/ml となるように重層し、30 °C で3日間培養した。形成されたコロニーを一つ一つかき取り、apramycin を終濃度 50 µg/ml となるように加えた TSB 寒天培地にそれぞれ植え継いだ。この時点で2つのコスミドから形質転換体を得られたため、それぞれ1株ずつ前培養に供した。TSB 培地上で生育してきたものを 10 ml の TSB 培地 (apramycin 終濃度 25 µg/ml) に植菌し、30 °C で2日間振とう培養した。また同時に宿主である *S. albus*/pOJ446 株も TSB 培地で同様に振とう培養した。2日間の振とう培養ののち、100 ml の TSB 培地にそれぞれの培養液を 2 ml 植菌し、30 °C で5日間振とう培養した。

5日後、培養液を遠心分離機により菌体と培養上清に分画した。菌体に対してはアセトン抽出を行い、菌体を濾過で除いたのちアセトンを除去した。残った水に対して酢酸エチル抽出を行い、分画したのち Na₂SO₄ で脱水し酢酸エチル層を除去した。残渣をメタノールに溶解し、HPLC/LC-MSにより分析を行った。培養上清に対しては酢酸エチル抽出を行い、分画したのち Na₂SO₄ で脱水してエバ

ポレーターで酢酸エチルを除いた。残渣をメタノールに溶解し以下の条件で HPLC/LC-MS分析を行った。

カラム：CAPECELL PAK C18 UG120 (2.0 φ x 150 mm)

溶媒系：水/アセトニトリル(ACN)(とともにCF₃CO₂Hを終濃度 0.01 %で添加)
グラジエント分析 (0 ~ 20 min, 50 ~ 100 % ACN)

流量：0.2 ml/min

結果

S. melanosporofaciens MI614-43F2 から得た 2 つのコスミド、pCOT2861、pCOT9469 を導入した形質転換体を得られたため、これら (*S. albus*/pCOT2861、*S. albus*/pCOT9469 とする) と、宿主である*S. albus*/pOJ446 株を上述の方法で培養し、その培養抽出物をHPLC/LC-MSで分析した。結果は図 1-2-3 に示した。HPLC/LC-MSの結果を比較すると、標品であるサイクロオクタチンは、5.8 分に [M+H-H₂O]⁺ *m/z* 305.2474 (C₂₀H₃₃O₂, calcd 305.2481)が確認された。また、同じ条件で*S. albus*/pCOT9469 においても、標品と同じ[M+H-H₂O]⁺ *m/z* 305.2478 (C₂₀H₃₃O₂)が確認され、一方、negative controlである*S. albus*/pOJ446 では同様のシグナルは検出されなかった。

表 1-1-1. LC-MS 条件

Thermo Fisher Accela HPLC
Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap MS
CAPECELLPAK C18 UG120 column
(2.0 Ø ×150 mm, 5 µm, Shiseido)
Temperature at 40
Flow rate 0.2 ml/min
50-100 % ACN in water
(with 0.01 % TFA) for 20min
Positive ion mode
FTMS+ ESI

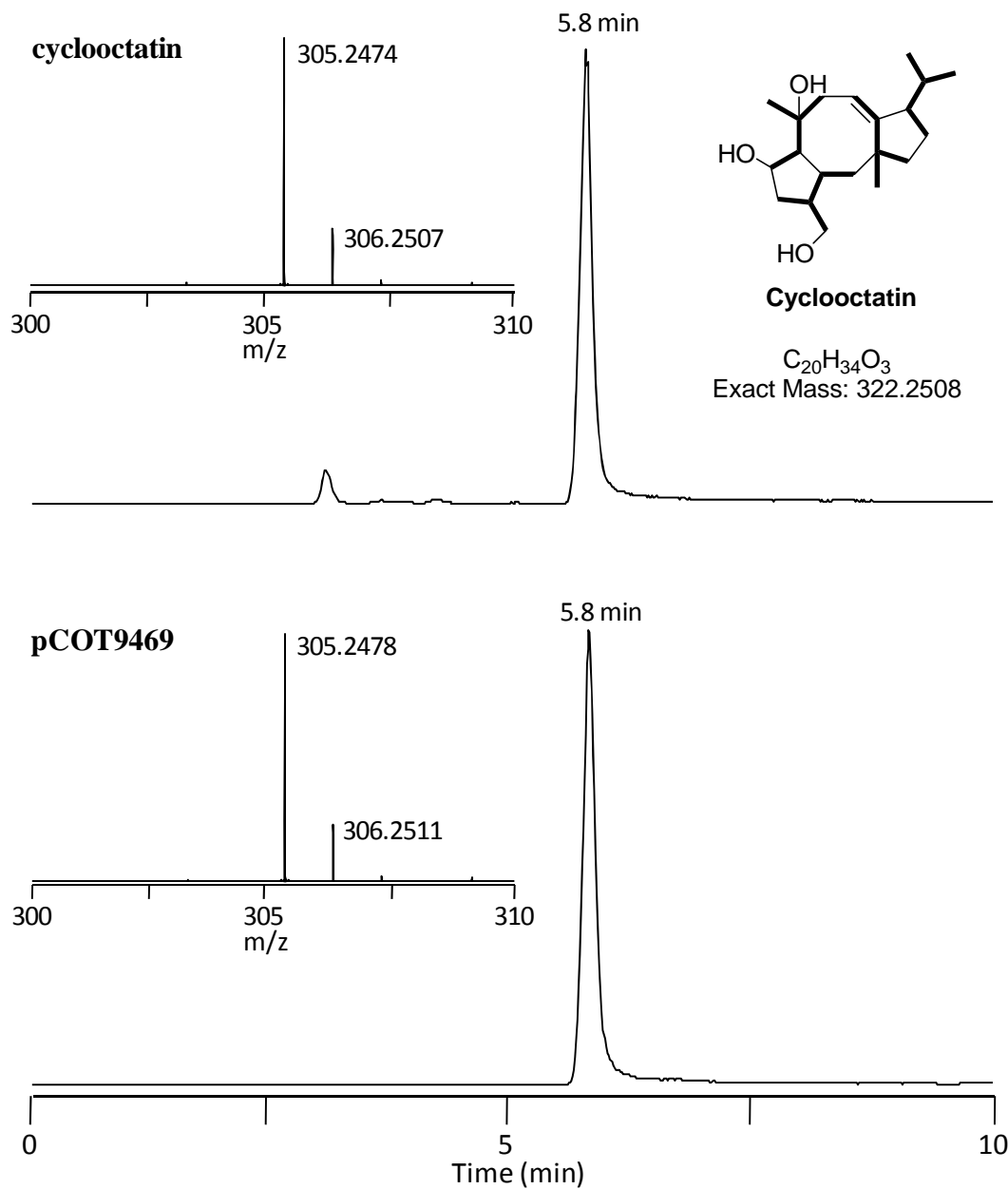


図 1-2-3. *S. albus*/pCOT9469 培養物酢酸エチル抽出物の LC-MS 分析
 $m/z=305.2444-305.2506$ の mass chromatogram と 5.8 分のピークの HR-MS (挿入図)
 を示す。

第三節 サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの解析

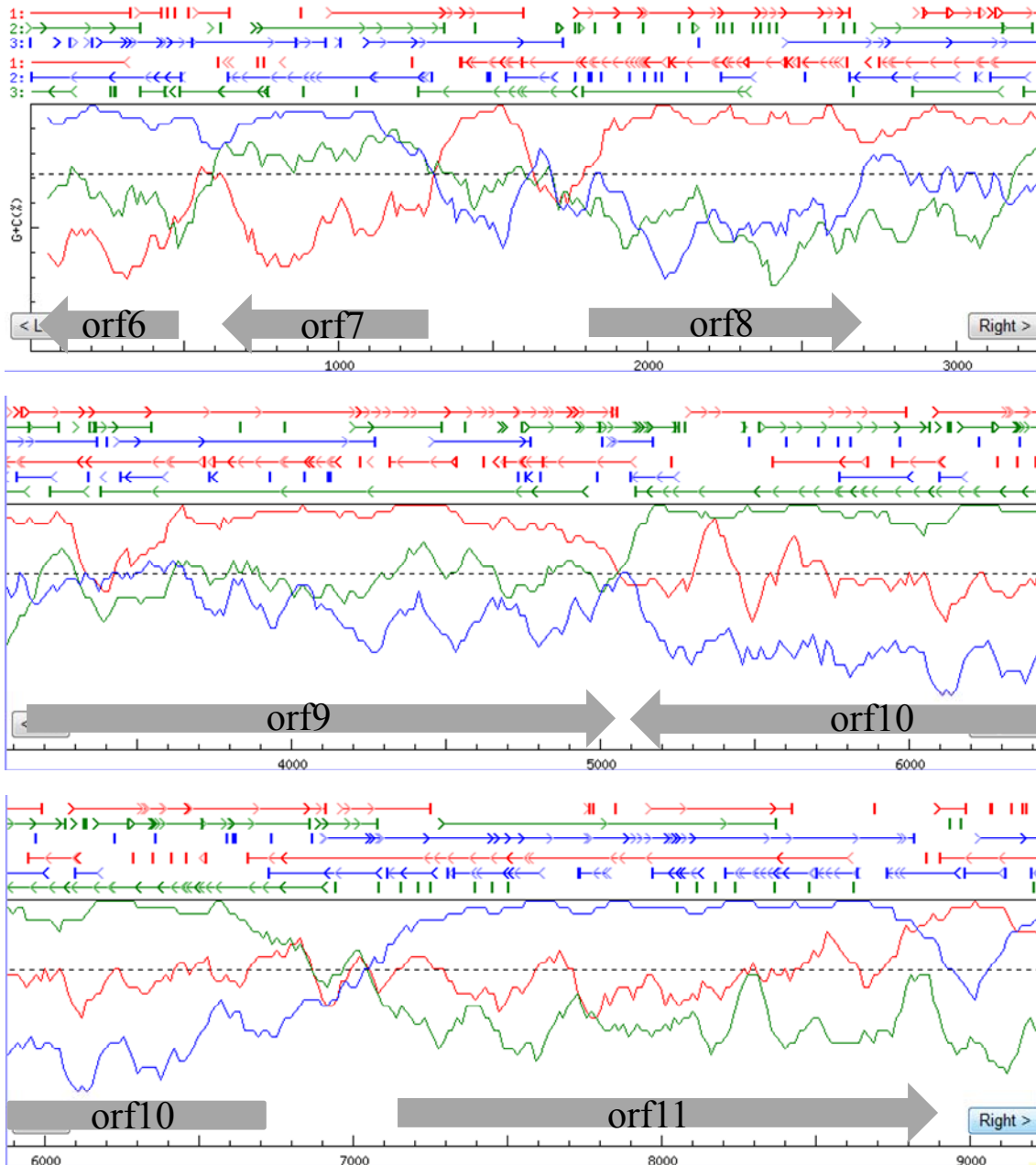
実験方法

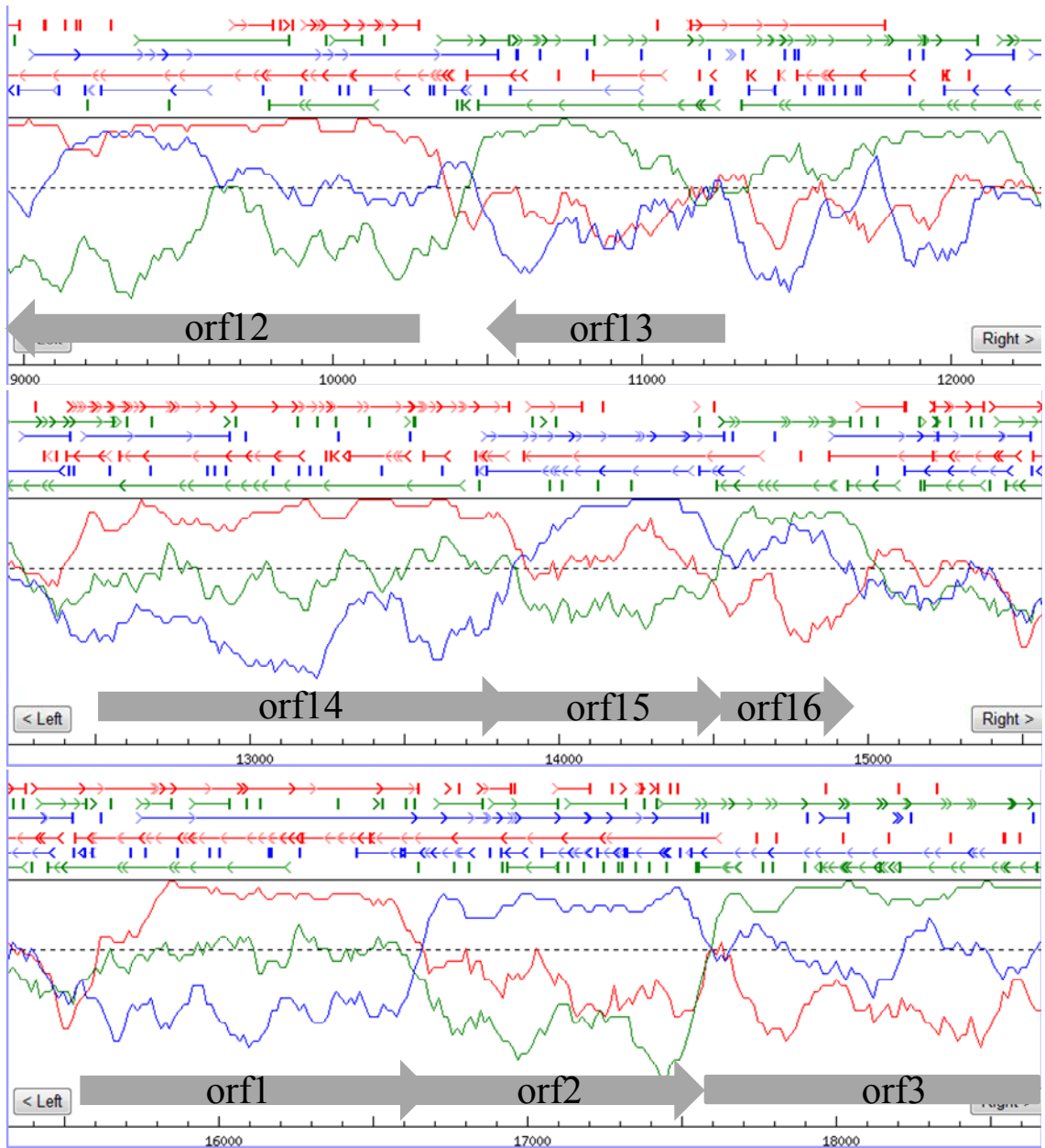
本節では、第二節でGGDP 合成酵素遺伝子含むこと、かつサイクロオクタチンの異種生産が確認できたコスミドクローンpCOT9469 の全長の塩基配列を決定し、FramePlot 4.0 beta (<http://nocardia.nih.go.jp/fp4/>) [23]を用いてフレーム解析を行うとともに、塩基配列から推定されるアミノ酸配列についてBLAST、およびPSI-BLASTを用いて相同性検索を行った。

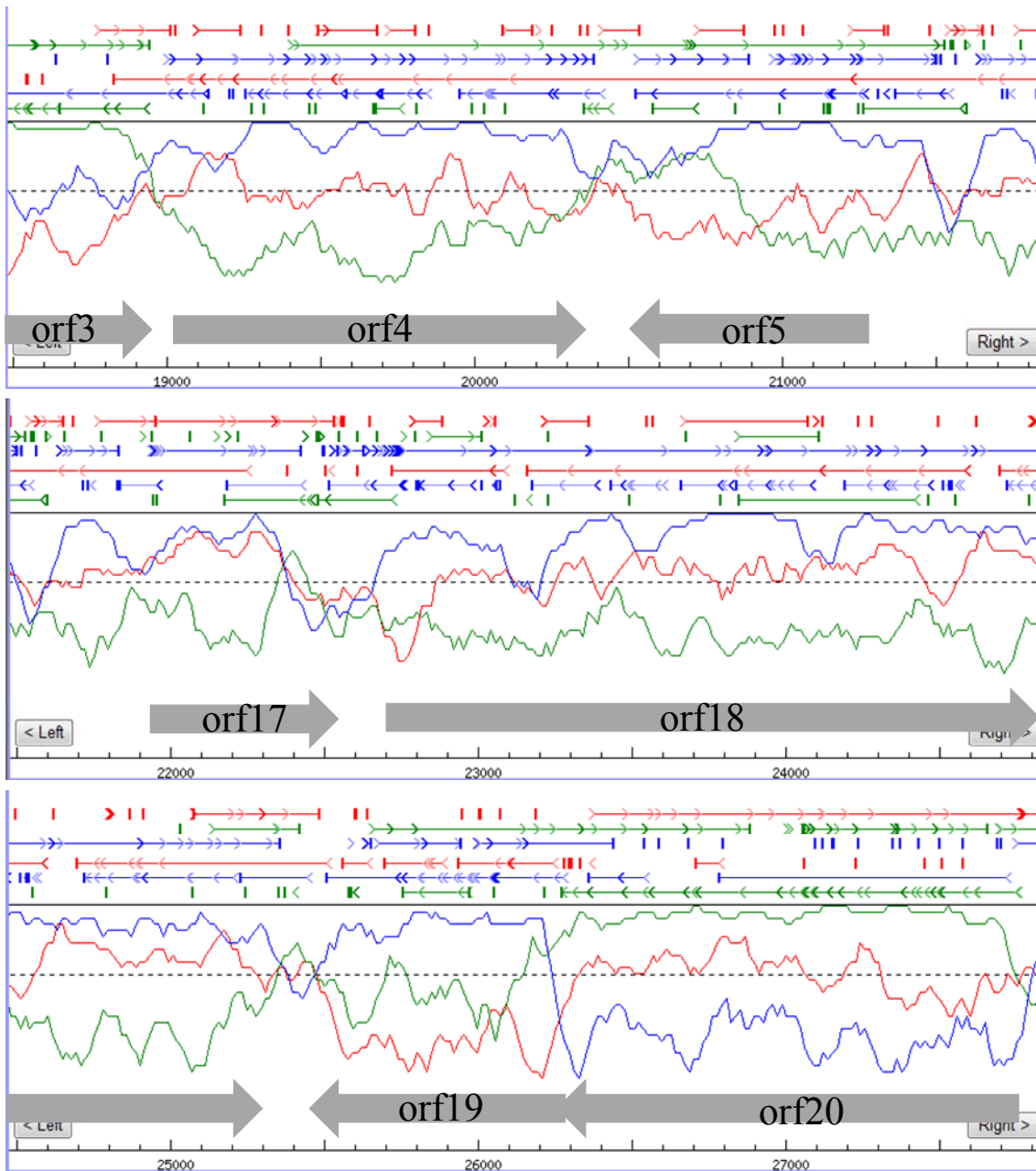
結果

放線菌はDNAのGC含量が非常に高く(68%以上)、特に遺伝子コドンの3文字目のGC含量は約90%に及び、これに対しコドンの2文字目のGC含量は比較的低いことが知られている。このような放線菌の遺伝子の特性を考慮してORF(open reading frame)を予測するFramePlot 4.0 betaを用いて、pCOT9469中のORFを推定した。その結果、このコスミドクローンの全塩基配列は34,012 bpであり、GC含量は71.3%であった。この中には24個の全長のORFの存在が認められた(表1-3-1と図1-3-1)。

続いて、推定アミノ酸配列についてBLAST、およびPSI-BLASTを用いて相同性検索を行った結果について述べる。サイクロオクタチンの生産性を確認したコスミドpCOT9469には24個のORFを含む34-kbpのDNA断片が挿入されていた。また、24個のORFの中にはGGDP合成酵素(ORF1)が確かに存在し、その近傍には機能未知タンパク質(ORF2)と2個のチトクロームP450(ORF3とORF4)遺伝子も存在した。ORF2はBLASTとFASTAによる検索ではホモログの存在が確認できないものの、PSI-BLASTを用いたドメイン検索の結果、ポリプレニルジリン酸-Mg²⁺結合配列を含む”Terpene cyclase”ドメインを持つことが判明し、ORF2がサイクロオクタチンの鍵酵素であるジテルペン環化酵素と推定した。表1-3-1にコスミドクローン中のORFの推定アミノ酸配列について行った相同性検索の結果を示す。







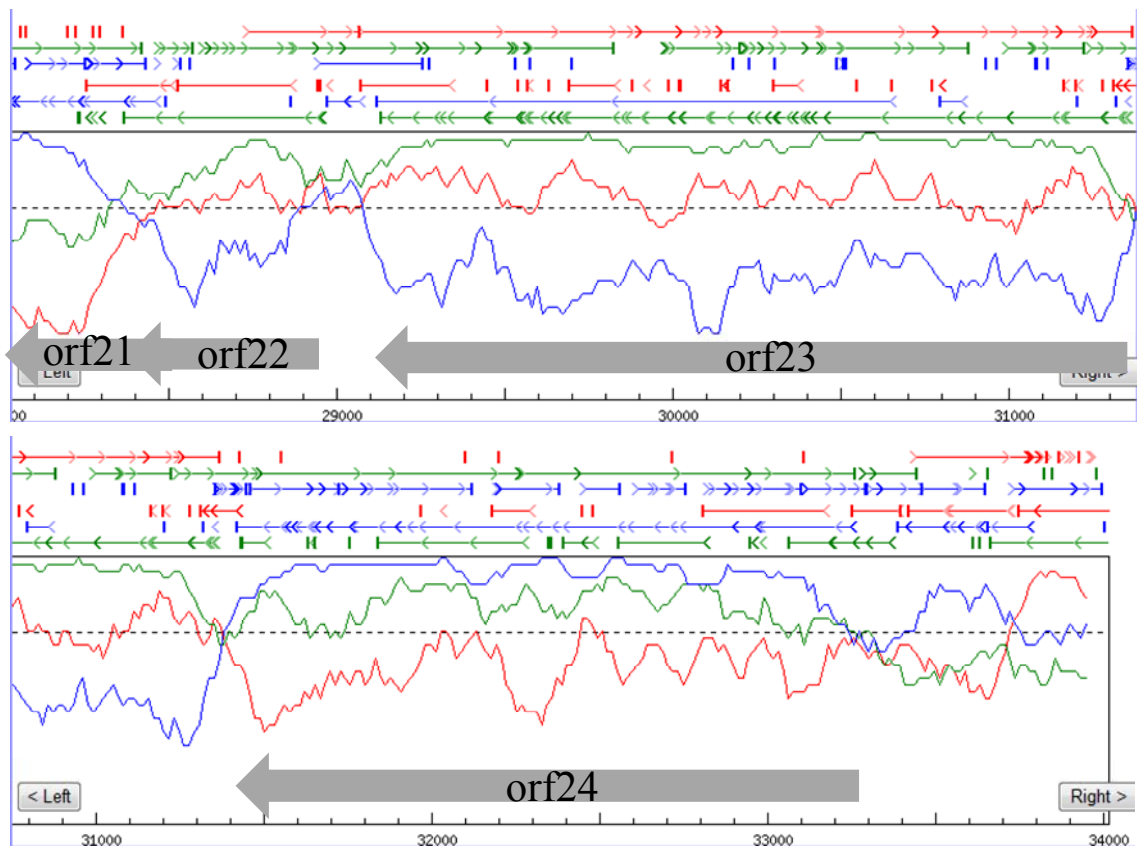


図 1-3-1. 塩基配列を決定したコスミドクローンのフレーム解析

表 1-3-1. サイクロオクタチン生合成遺伝子を含むコスミドクローン中の ORF の
推定アミノ酸配列の相同性検索結果

ORFs	Encoded Residues	Proposed Function	Sequence Similarity (protein,origin)	Identity/ Silarity	Accession Number
orf6	160	isobutyryl-CoA mutase A	<i>isobutyryl-CoA mutase A, S.coelicolor A3(2)</i>	92%/96%	NP629554
orf7	212	kinase	<i>putative fructose transport system kinase, Rhodococcus sp RHA1</i>	65%/76%	YP703843
orf8	293	carboxypeptidase	<i>D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase, S. avermitilis MA-4680</i>	83%/92%	NP825556
orf9	497	hydrolase	<i>hydrolase, S. avermitilis MA-4680</i>	61%/74%	NP822063
orf10	595	arginyl-tRNA synthetase	<i>arginyl-tRNA synthetase, S. avermitilis MA-4680</i>	80%/88%	NP825925
orf11	582	lysyl-tRNA synthetase	<i>lysyl-tRNA synthetase, S.coelicolor A3(2)</i>	77%/85%	NP733599
orf12	485	hypothetical protein	<i>hypothetical protein SAV4750, S. avermitilis MA-4680</i>	54%/64%	NP825927
orf13	254	secretion protein	<i>secreted protein, S.coelicolor A3(2)</i>	46%/56%	NP827512
orf14	332	dihydroxyacetone kinase	<i>dihydroxyacetone kinase subunit 1, S. avermitilis MA-4680</i>	81%/90%	NP822460
orf15	201	dihydroxyacetone kinase	<i>putative dihydroxyacetone kinase subunit 2, S.ambofaciens ATCC 23877</i>	73%/82%	CAJ89913
orf16	136	phosphotransfer protein	<i>putative dihydroxyacetone kinase phosphotransfer protein, S.ambofaciens ATCC 23877</i>	79%/85%	CAJ89914
orf1	359	GGDP synthase	<i>geranylgeranyl diphosphate synthase, Streptomyces sp. KO-3988</i>	56%/67%	BAD86799
orf2	307	GGDP cyclase			
orf3	459	P450	<i>putative P450, Streptomyces sp. KO-3988</i>	46%/60%	BAD86796
orf4	453	P450	<i>putative P450, Streptomyces sp. KO-3988</i>	47%/65%	BAD86796
orf5	257	P450 monooxygenase	<i>P450 monooxygenase, Streptomyces pactum</i>	62%/68%	BAF92583
orf17	160	mut-like protein	<i>mutT-like protein, S. avermitilis MA-4680</i>	71%/80%	NP824363
orf18	903	phosphatase	<i>magnesium or manganese-dependent protein phosphatase, S. avermitilis MA-4680</i>	73%/81%	NP824361
orf19	256	reductase	<i>fumarate reductase iron-sulfur subunit, S. avermitilis MA-4680</i>	87%/92%	NP824358
orf20	491	dehydrogenase	<i>succinate dehydrogenase flavoprotein subunit, S. avermitilis MA-4680</i>	81%/88%	NP824357
orf21	200	adenyllyltransferase	<i>panetheine-phosphate adenyllyltransferase, S. avermitilis MA-4680</i>	89%/95%	NP823845
orf22	195	DNA methylase	<i>DNA methylase, S.coelicolor A3(2)</i>	79%/84%	NP629702
orf23	732	DNA helicase	<i>ATP-dependent DNA helicase, S.coelicolor A3(2)</i>	79%/87%	NP629701
orf24	609	dehydroxyacetone kinase	<i>dihydroxyacetone kinase, S. avermitilis MA-4680</i>	67%/71%	NP823850

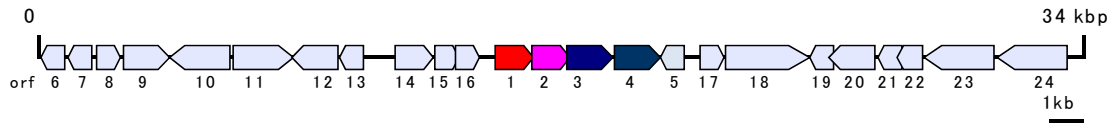


図 1-3-2. pCOT9469 の挿入断片の遺伝子地図

第四節 サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの最小単位の決定

実験方法

次に、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの最小単位を決定するために、pCOT9469 のサブクローニングを行った。

サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスタークローニングしたコスミド pCOT9469 をテンプレートにして、表 1-4-1 のプライマーを用いて ORF1 から ORF4 の遺伝子を増幅し、PCR 産物を電気泳動して精製した。これを Ligation High (Takara)を用いて pT7Blue T-vector に連結した。ライゲーション産物を DH5 α のコンピテントセルに加えてトランスフォームし、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に植菌した。37 °C で 14 時間培養し、生育してきたコロニーに対しコロニー-PCR を行った。ORF1 から ORF4 を含むコロニーを 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し、プラスミドを回収してシーケンス解析を行った。

表 1-4-1 . ORF1 から ORF4 遺伝子のクローニングに用いたプライマー

Forward: 5'-GGA TAT CTA GAT TTC GAC GTG GAG TCA GTC AG (*Xba*I)

Reverse: 5'-GCC CAA GCT TCA GCG TGG TTC CGG AAT CAT CC (*Hind*III)

PCR 反応

Prime Star GXL taq (TaKaRa)を用い、以下の反応条件で行った。

955 分	} 30 回
9820 秒	
6810 分	
7210 分	
4		

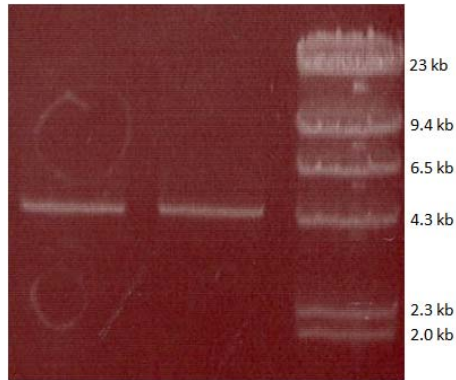


図 1-4-1. ORF1-4 を含む PCR 産物

結果

約 4.8-kb の ORF1 から ORF4 までの PCR 産物を確認した。また、シーケンス解析の結果、この PCR 産物の塩基配列は、コスミド pCOT9469 の ORF1 から ORF4 までの塩基配列と一致した。

続いて、上記の ORF1-4 を含むプラスミドと *Streptomyces-E. coli* シャトルベクター pSE101 [24] を制限酵素 *Xba*I と *Hind*III を用いて処理し、電気泳動により精製して T4 DNA ligase でライゲーションした。ライゲーション産物を DH5 α のコンピテントセルに加えてトランスフォームし、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に植菌した。37 $^{\circ}$ C で 14 時間培養しコロニー PCR を行った。ORF1-4 を含むコロニーを培養し、ORF1 から ORF4 を含む DNA 断片を挿入したプラスミド pCOT104 を構築し、*S. albus* を用いた異種発現を試みた。

S. albus に pCOT104 を導入した *S. albus*/pCOT104 を構築した。次に、この形質転換を、50 μ g/ml のチオストレプトンを含む TSB 培地で、30 $^{\circ}$ C、三日間培養した後、その培養液を EtOAc で抽出し、この抽出物を LC-MS を用いて分析した。

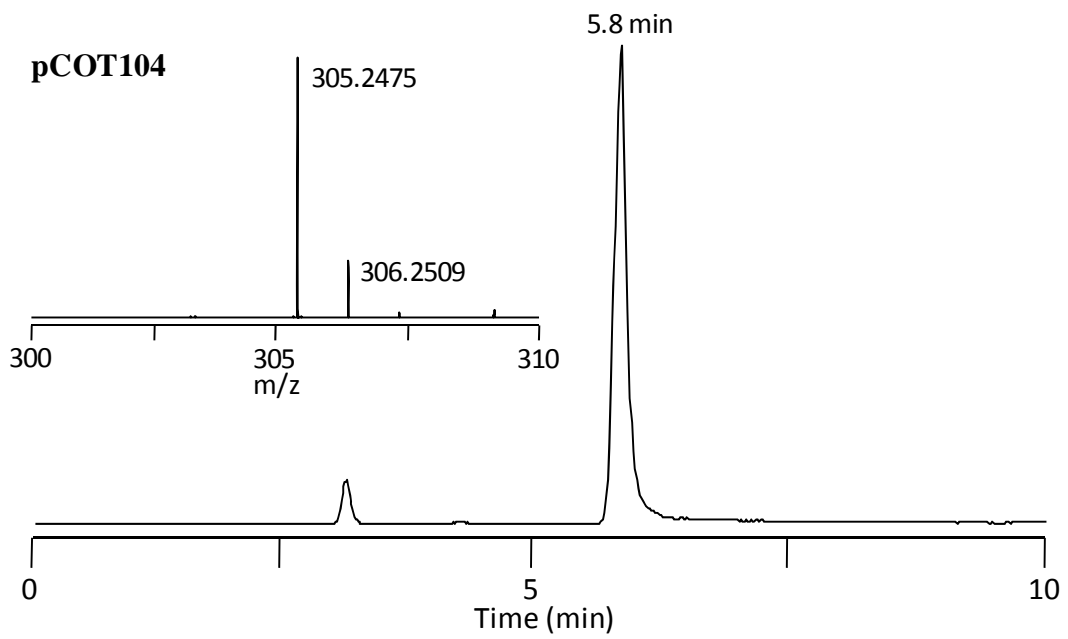
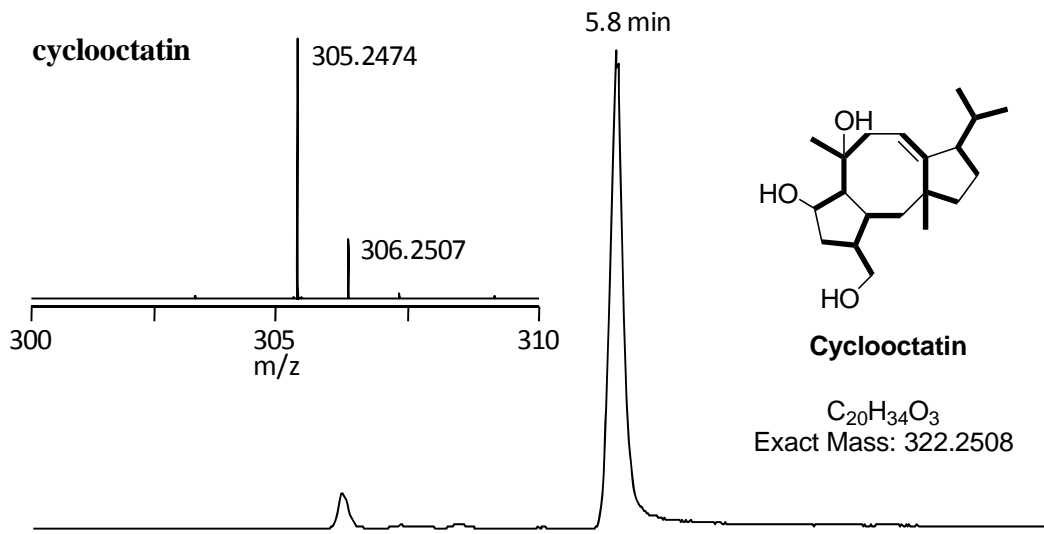


図 1-4-2. *S. albus*/pCOT104 の LC-MS 分析
 $m/z=305.2444-305.2506$ の Mass chromatogram と 5.8 分のピークの HR-MS(挿入図)
 を示す。

結果

S. albus/pCOT104 の培養抽出物のLC-MS分析の結果、保持時間 5.8 分に、 $[M+H-H_2O]^+$ m/z 305.2475 のシグナルが検出されたことから、サイクロオクタチンの生産を確認することができた。一方、第三章第一節で詳細を述べるORF3のみを欠失したpCOT104 のデリーションプラスミドpCOT104 Δ で形質転換した*S. albus*/pCOT104 Δ では、サイクロオクタチンの生産は確認できなかった。従って、以上の結果から、ORF1-4 がサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの最小単位と結論し、これらのORFをCotB1-4 (*cyclooctatin biosynthesis*)と命名した。CotB1-4 の塩基配列は、DDBJ/EMBL/NCBIの塩基配列データベースに、Accession number AB448947 として登録した。

第五節 考察

S. melanosporofaciens MI614-43F2 ゲノムDNAのコスミドライブラリーを構築することができた。このゲノムライブラリーは、 3.8×10^3 個のクローンを含む。各コスミドクローンが平均 40 kbの挿入断片を保持していること、MI614-43F2 のゲノムサイズが 8000 kbと仮定すると、 3.8×10^3 個のクローンを含む今回作製したコスミドライブラリーは、MI614-43F2 ゲノムをすべてカバーしていると考えることができる。このライブラリーに対して、GGDP 合成酵素遺伝子配列をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションおよびサザンハイブリダイゼーションを行い、GGDP 合成酵素遺伝子を有するコスミドクローンを取得することができた。電気泳動のパターンから判断してpCOT2861 とpCOT9469 の異なる 2 種のコスミドクローンを得ることができた。

制限酵素 *HincII* では 2 つの断片にシグナルが見られるのは、コスミドおよびゲノム DNA の GGDP 合成酵素遺伝子中に、*HincII* サイトが存在するため切断され生じていると考えられる。

以上の考察から、得られたコスミドクローンはいずれも、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターのクローニングの指標とした GGDP 合成酵素遺伝子を含むと考えられた。放線菌の二次代謝化合物の生合成遺伝子はまず例外なくクラスターを形成しているという、これまでの報告例から考えて、GGDP 合成酵素遺伝子の周辺領域にはサイクロオクタチン生合成遺伝子がクラスターで存在していると考えられた。さらに各コスミドの断片の大きさを考慮すると、コスミドベクター自体の大きさを除いても少なくとも 35 kb 以上の DNA 断片がクローニングされていると考えられることから、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの周辺領域もクローニングされていると考えられた。GGDP 合成酵素由来のジテルペン化合物を生合成する放線菌は、GGDP 合成酵素遺伝子に近接した領域にジテルペン生合成遺伝子をクラスターで有していることが報告されている[25]。よって今回クローニングしたコスミドには GGDP 合成酵素遺伝子だけでなくジテルペンであるサイクロオクタチンのその他の生合成遺伝子であるジテルペン環化酵素などが存在する可能性があると考えられた。

そこで次に、得られた 5 つのコスミドのうち 2 つのコスミド pCOT2861 と pCOT9469 を *S. albus* に導入して、それらの形質転換体に特異的な化合物の生産

が見られるかどうかを検証した。その結果、*S.albus*/pCOT9469 では、サイクロオクタチンの生産が確認された。このことから、pCOT9469 にはサイクロオクタチンの生合成に関与するすべての遺伝子が含まれていると判断した。

次に、pCOT9469 コスミドクローンの塩基配列から推定されるアミノ酸配列について相同性検索を行った。このシーケンス中からサイクロオクタチン生合成遺伝子と予想されるGGDP 合成酵素 (ORF1、CotB1 と命名)が確かに存在し、その近傍には機能未知タンパク質 (ORF2、CotB2 と命名)と2個のチトクロームP450 (ORF3 とORF4、CotB3 とCotB4 と命名)遺伝子が存在した。CotB2 はBLASTとFASTAでは、そのホモログはヒットしなかったが、PSI-BLASTを用いたドメイン検索では、CotB2 中には、ポリプレニルジリン酸-Mg²⁺ 結合サイトを含む”Terpene cyclase”ドメインが検出された[26]。以上のことから、CotB2 がサイクロオクタチン生合成の鍵酵素であるテルペン環化酵素と推定し、第二章でその詳細を解析する。

また、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの最小単位を解析するためデリーションプラスミドを作製して、*S. albus* での異種発現を解析した結果、CotB1-4 がサイクロオクタチンの最小単位であることが判明した。この結果からは、ORF5 の P450 monooxygenase はサイクロオクタチン生合成に関与しないことも明らかになった。

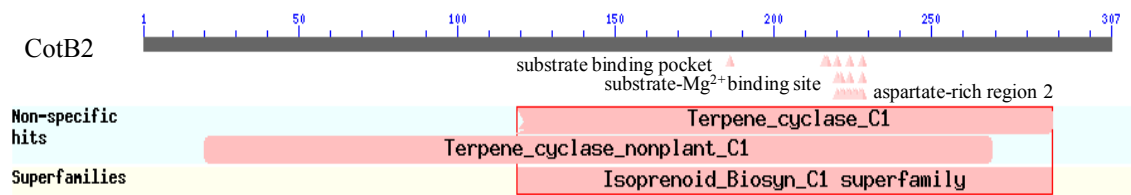


図 1-5-1. CotB2 (ORF2)の配列と”Terpene cyclase”ドメイン

第二章

サイクロオクタチンの骨格形成に関わる酵素の機能 解析

第一節 GGDP 合成酵素 (CotB1)の機能解析

第一項 CotB1 タンパク質の発現系の構築

前節までの結果から、*cotB1*、*cotB2*、*cotB3*、*cotB4* がサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターであることが判明した。*cotB1* がコードすると推定される GGDP 合成酵素は、DMAPP と IPP を用いて GGDP を生産する。そこで、基質として DMAPP と IPP を用い、*cotB1* 遺伝子産物の反応検出を試みた。そのため、*cotB1* 遺伝子産物を大腸菌にて大量発現させ、精製酵素を得ることを試みた。

実験方法

表 2-1-1 に記述したプライマーを利用し、*cotB1* を発現ベクター pETDuet-1 (Novagen) にクローニングして、pDCotB1 プラスミドを構築し、大腸菌 BL21(DE3) を用いて大量発現を行った。pDCotB1 で形質転換した BL21(DE3) のコロニーを 50 µg/ml ampicillin を含む TB 培地に植菌し、37 °C にて 12 時間程度振とう培養をおこなった。この培養液を 200 ml の上記培地の入った坂口フラスコに 1 % 植菌し、再び 37 °C で OD₆₀₀ が約 1.5 になるまで振とう培養を行い、終濃度 0.1 mM の IPTG を添加し、18 °C で 12-14 時間振とう培養した。菌体を遠心分離にて回収し、溶菌 buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0、100 mM NaCl) に懸濁した。菌体を超音波破碎し、40,000 × g で遠心を行い、上清はあらかじめ 20 mM imidazole を含む wash buffer で平衡化をしておいた Ni-NTA カラム (QIAGEN) にアプライし、200 mM imidazole を含む elution buffer を用いて目的タンパク質を溶出させた。目的タンパク質を含む画分を VIVASPIN 20 (Sartorius, MWCO 30,000) を用いて濃縮した。組換えタンパク質の精製度は 12 % SDS-PAGE により確認し、タンパク質濃度は Protein assay kit (BioRad) を用いて算出した。

表 2-1-1 . ORF1 遺伝子のクローニングに用いたプライマー

Forward: 5'-CAG TCA TAT GAC CAC ACC CAC GCT C (下線は *NdeI* site)

Reverse: 5'-CTG GGG GTA CCT CAG TGG TGG TGG TGG TGG TGT GAG TTC (実線の下線は *KpnI* site、点線の下線は His-taq 配列)

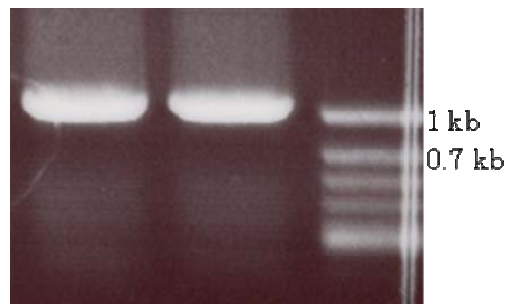


図 2-1-1. CotB1 の PCR 産物

結果

大量発現させた *cotB1* 遺伝子産物は、菌体を破碎した後に、可溶性画分に存在した。この CotB1 はヒスチジンタグを C-末端側に付与したタンパク質であるために、Ni-NTA カラムを用いた精製可能であった。精製後の CotB1 は SDS-PAGE で単一になることを確認した。また、SDS-PAGE の結果、CotB1 の推定アミノ酸分子量に相当する分子量である約 39 kDa を示した。

第二項 CotB1 反応

続いて、前項で精製した組換えタンパク質 CotB1 を用いて、酵素反応の進行を試みた。基質として、DMAPP と IPP を用いた。

実験方法

反応溶液の組成は次の通りである。

表 2-1-2 . CotB1 による GGDP 生成反応溶液の組成

Tris-HCl (pH7.5).....	50 mM
MgCl ₂	5 mM
DMAPP... ..	30 mg
IPP	90 mg
CotB1.....	100 µg
milliQ water	

上記反応溶液を作製し、室温で 12 時間反応させた。その後、Dowex AG 50W-X8 を用いたイオン交換カラムクロマトグラフィーと cellulose gel chromatography を用いて精製行った[27]。GGDP 生成の確認は cellulose TLC (Merck)で行い、2-プロパノール：クロロホルム：アセトニトリル：0.1 M 炭酸水素アンモニウム水 = 5.5 : 2 : 1 : 1.5 で展開した。

結果

組換えタンパク質 CotB1 を用いて DMAPP と IPP を基質に GGDP 化反応を試みたところ、合成標品の GGDP と同じ Rf 値を示す物質の合成が確認でき、これを GGDP と判断した。GGDP のアンモニウム塩、約 30 mg が得られた。

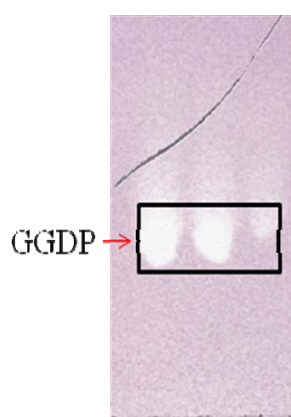


図 2-1-2. GGDP の cellulose TLC

左 2 レーンが CotB1 反応産物、右レーンは合成標品[27]

第二節 テルペン環化酵素 (CotB2)の機能解析

第一項 CotB2 の発現系の構築

次に、テルペン環化酵素と推定した CotB2 について、大腸菌で高発現させたヒスチジンタグ付き組換え酵素を用いて機能解析を行った。

実験方法

CotB2 遺伝子について、表 2-2-3 に記述したプライマーを利用し、発現ベクター-pHis8 にクローニングしてpHCotB2 を構築し、大腸菌BL21(DE3)を用いて大量発現を行った。pHCotB2 で形質転換したBL21(DE3)のコロニーを 50 mg/ml kanamycinを含むTB培地に植菌し、37 °Cにて 12 時間程度振とう培養をおこなった。この培養液を 200 mlの上記培地の入った坂口フラスコに 1 %植菌し、再び 37 °CでOD₆₀₀が約 1.5 になるまで振とう培養を行い、終濃度 0.1 mMのIPTGを添加し、18 °Cで 12-14 時間振とう培養した。菌体を遠心分離にて回収し、溶菌buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0、100 mM NaCl)に懸濁した。菌体を超音波破碎し、4,000 × gで遠心を行い、上清はあらかじめ 20 mM imidazoleを含むwash bufferで平衡化をしておいたNi-NTAカラムにアプライし、200 mM imidazoleを含むelution bufferを用いて目的タンパク質を溶出させた。目的タンパク質を含む画分をVIVASPIN 20 (MWCO 30,000)を用いて濃縮した。組換えタンパク質の精製度は 12 % SDS-PAGEにより確認し、タンパク質濃度はProtein assay kitを用いて測定した。

表 2-2-1 . CotB2 遺伝子のクローニングに用いたプライマー(5'から 3'方向)

Forward : GAG GAA TTC ATG ACG ACA GGA CTT TC (下線は*Eco*RI site)

Reverse : CCC CAA GCT TTC ACT GGA TGC GAG (下線は、*Hind*III site)

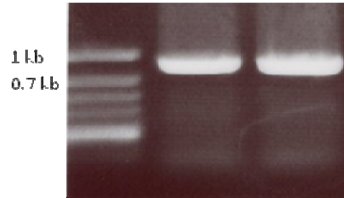


図 2-2-1. CotB2 の PCR 産物

結果

大量発現させた CotB2 遺伝子産物は、菌体を破砕した後に、可溶性画分に存在した。この CotB2 はヒスチジンタグを N-末端側に付与したタンパク質であるために、Ni-NTA カラムを用いた精製可能であった。精製後の CotB2 は SDS-PAGE で単一になることを確認した。また、SDS-PAGE の結果、CotB2 の推定アミノ酸分子量に相当する分子量である約 37kDa を示した。また、ゲル濾過による分子量測定の結果、約 78 kDa であった。

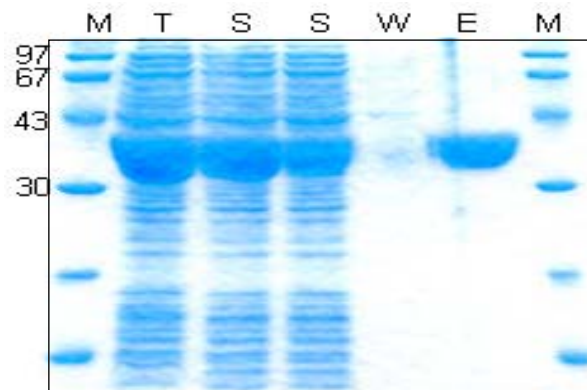


図 2-2-2. CotB2 の SDS-PAGE (37 kDa)

(T; total protein, S; sup. protein, W; wash, E; elution protein, M; marker)

第二項 CotB2 反応の検討

続いて、前項で精製した組換えタンパク質 CotB2 を用いて、酵素反応の進行を試みた。基質として、GGDP [27]、GPP、FPP を試すことにした。

実験方法

反応溶液の組成は次の通りである。

表 2-1-4. CotB2 反応の溶液組成

Tris-HCl (pH7.5).....	50 mM
MgCl ₂	1 mM
GGDP.....	20 mg
CotB1.....	10 µg
milliQ water	

上記反応溶液を作製し、室温で 12 時間反応させた。その後、酢酸エチルで抽出し、GC-MS (条件は、実験の部に記載) と LC-MS (条件は、表 1-1-2) を用いて分析を行った。

結果

精製酵素を用いた *in vitro* 反応産物を GC-MS によって分析したところ、Mg²⁺ 依存的に GGDP が保持時間 9.53 分の未知化合物に変換されることが判明した。また、LC-MS によって分析したところ、保持時間 15.6 分に未知化合物 2 が確認された。しかし、GPP と FPP を基質として反応を行い、GC-MS 分析をした場合は、GPP と FPP は環化しなかった。この結果から、CotB2 は GGDP のみを基質として、環化反応を行う酵素であることが示唆された。

未知化合物 2 は、酢酸エチル抽出のみで CotB2 反応溶液からほぼ単一に精製できることが分かったので、次に NMR と MS による構造解析を行った。

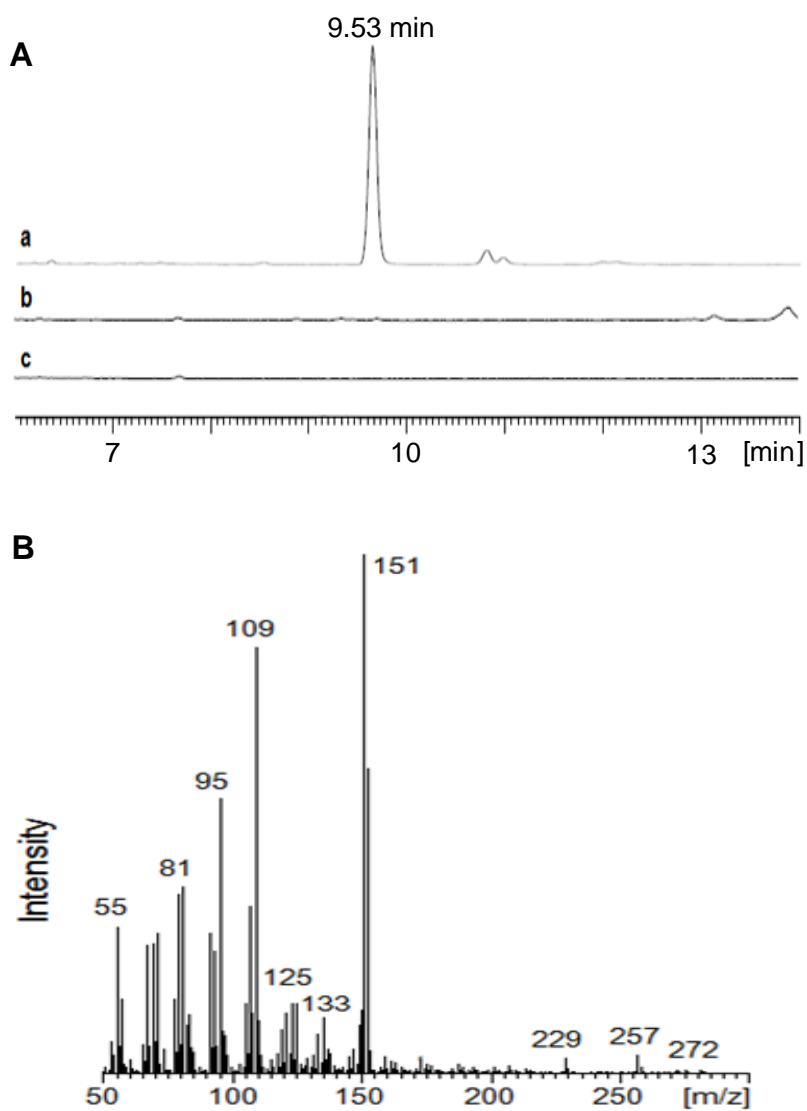


図 2-2-3. GC-MS の分析 m/z 151 のスペクトル
A. a, GGDP と CotB2 の反応、b, FPP と CotB2 の反応、
c, GPP と CotB2 の反応。B. a の mass スペクトル。

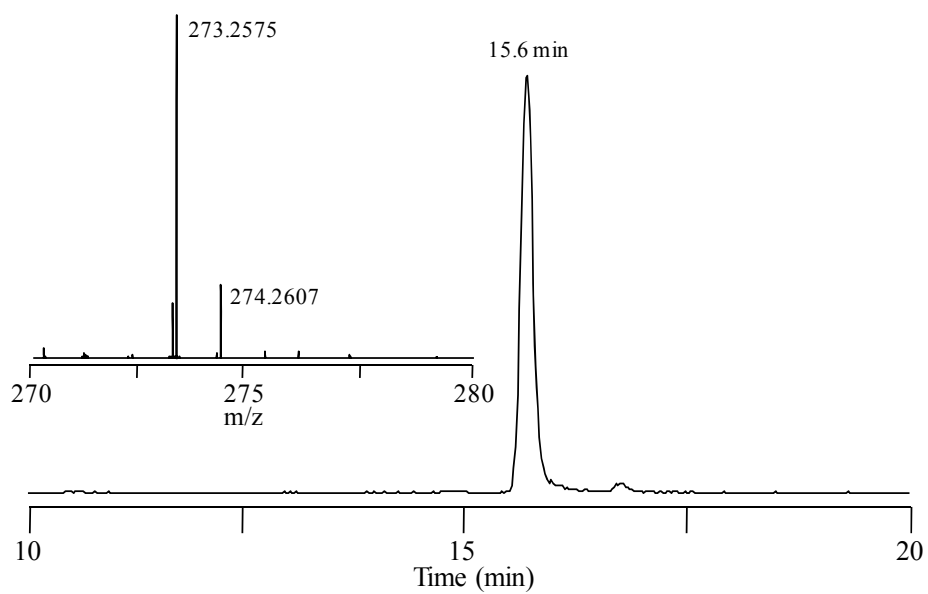


図 2-2-4. 未知化合物 2 の LC-MS 分析

$m/z=273.2550-273.2604$ の Mass chromatogram と 15.6 分のピークの HR-MS (挿入図) を示す。

さらに、CotB1 と CotB2 を共発現ベクターにクローニングして同時に発現させて精製し、これらの組換え酵素を IPP、DMAPP と反応させたところ、やはり保持時間 15.6 分に未知化合物が確認できた(図 2-2-5)。

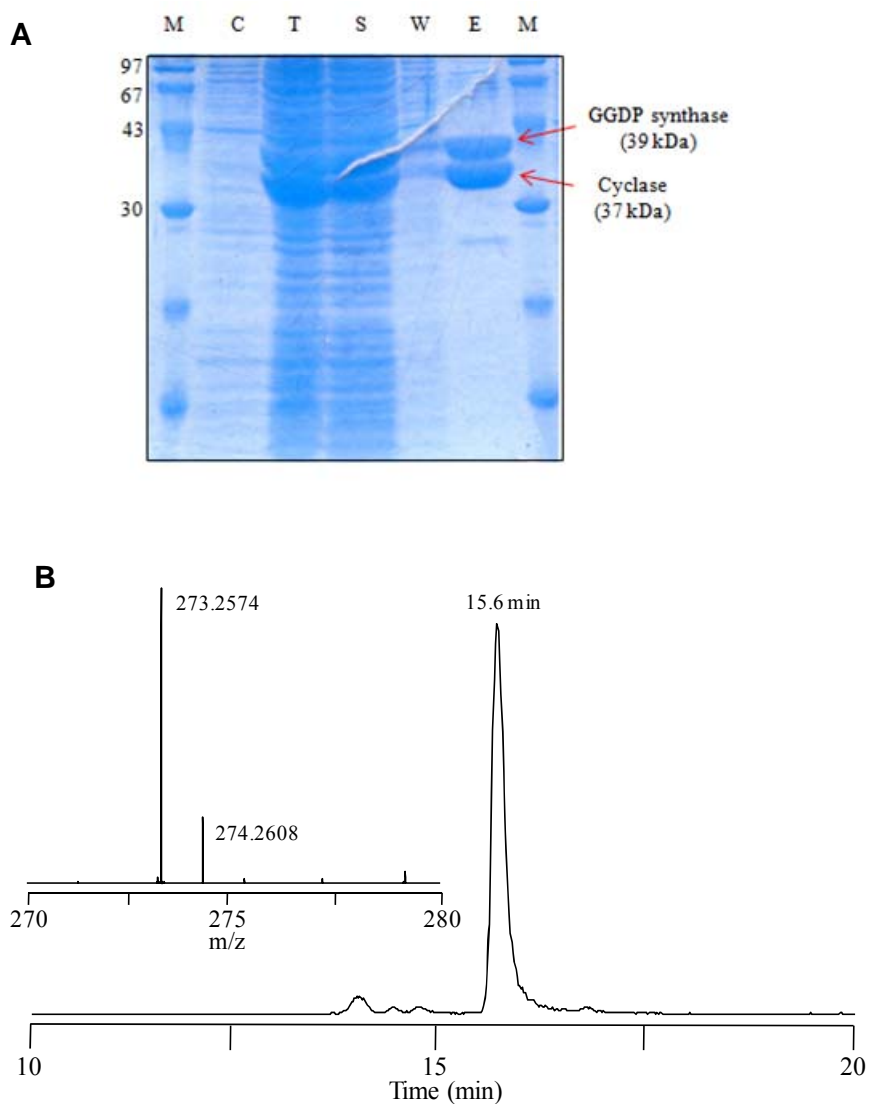


図 2-2-5. CotB1 と CotB2 共発現系の SDS-PAGE (A)と、反応液の LC-MS 分析 (B) $m/z=273.2550-273.2604$ の Mass chromatogram と 15.6 分のピークの HR-MS (挿入図) を示す。

第三節 CotB2 反応産物の構造解析

実験方法

精製物質の構造は、HR-ESE-MS、および各種 NMR スペクトルを用いて解析を行った。

結果

HR-ESI-MS および各種 NMR による分析の結果、未知化合物 2 は C-7 に水酸基を持つ新規なサイクロオクタチン中間体である cycloocta-9-en-7-ol であることが判明した。以下にその構造解析の詳細を記載する。

HR-ESI-MSにおいて $[M+H-H_2O]^+$ m/z 273.2575 ($C_{20}H_{33}$, calcd 273.2577)にシグナルが得られたことから、その分子式は $C_{20}H_{34}O$ であると推測した。UVスペクトルにおいて203 nmに吸収を示すこと、さらに、 1H 及び ^{13}C NMRスペクトル(表2-3-1)からは、化合物 2 は不飽和 4 のジテルペンアルコールであると推定された。化合物 2 には、2 個のtertiary methyl [δ 1.12 と 1.19 (each 3H, s)], 3 個のdoublet methyl [δ 0.77, 0.94 (each 3H, d, $J = 6.8$ Hz)と 0.87 (3H, d, $J = 7.6$ Hz)],そして1 個のolefinic proton [δ 5.21 (1H, dd, $J = 10.3, 8.3$ Hz)], さらに、18 個のprotonが δ 1.20–2.70 に存在する。 ^{13}C NMRスペクトルでは、20 個の炭素シグナルが観察され、それらのうち、低磁場にある二つのシグナル(δ 153.1 及び 117.8 ppm)からは、化合物 2 に 1 個の二重結合の存在が示唆された。各炭素とそれに結合しているプロトンのシグナルは、HSQCによって帰属し、それらのケミカルシフト値を表 2-3-1 に示した。 δ 76.2にある4 級炭素シグナルは1 個の3 級水酸基の存在を示しており、一方、高磁場のシグナルは、1 個の4 級炭素と、5 個のメチン、6 個のメチレン、および5 個のメチル基の存在を示している。

化合物 2 とサイクロオクタチンの 1H and ^{13}C NMRスペクトル[14]を比較して、化合物 2 はサイクロオクタチンと同じ 5-8-5 骨格を持つことが示唆される。さらに、COSY、およびHMBCスペクトル詳細な解析を行うことによって、化合物 2 の構造は、7 位に 1 個の水酸基を持ち、9 位と 10 位が二重結合で結合した、図 2-3-4

に示す cycloocta-9-en-7-ol であると決定した。

化合物 2 の相対配置 ($2S^*$, $3S^*$, $6S^*$, $7R^*$, $11S^*$, $14S^*$) は以下の NOESY 相関によって決定し、さらに ChemDraw Ultra Ver. 9.0 を用いた MM2 エネルギー最小化計算を行った分子モデリングにより確認した (図 2-3-4)。NOESY スペクトルにおいて、H-2 と H-3、H-1 と H-12b、および H-18、H-6 と H-1、および H-19、H-9 と H-15、H-13a と H-16、H-14 と H-13b、および H-17、そして H-19 と H-5b、および H-9 の相関が観察されたことから H-6、H-14、Me-18、および Me-19 は β -配置であることが示された。また、H-2 と H-8、および H-20、H-20 と H-8、および H-12a の相関から H-2、および Me-20 は α -配置と判断した。

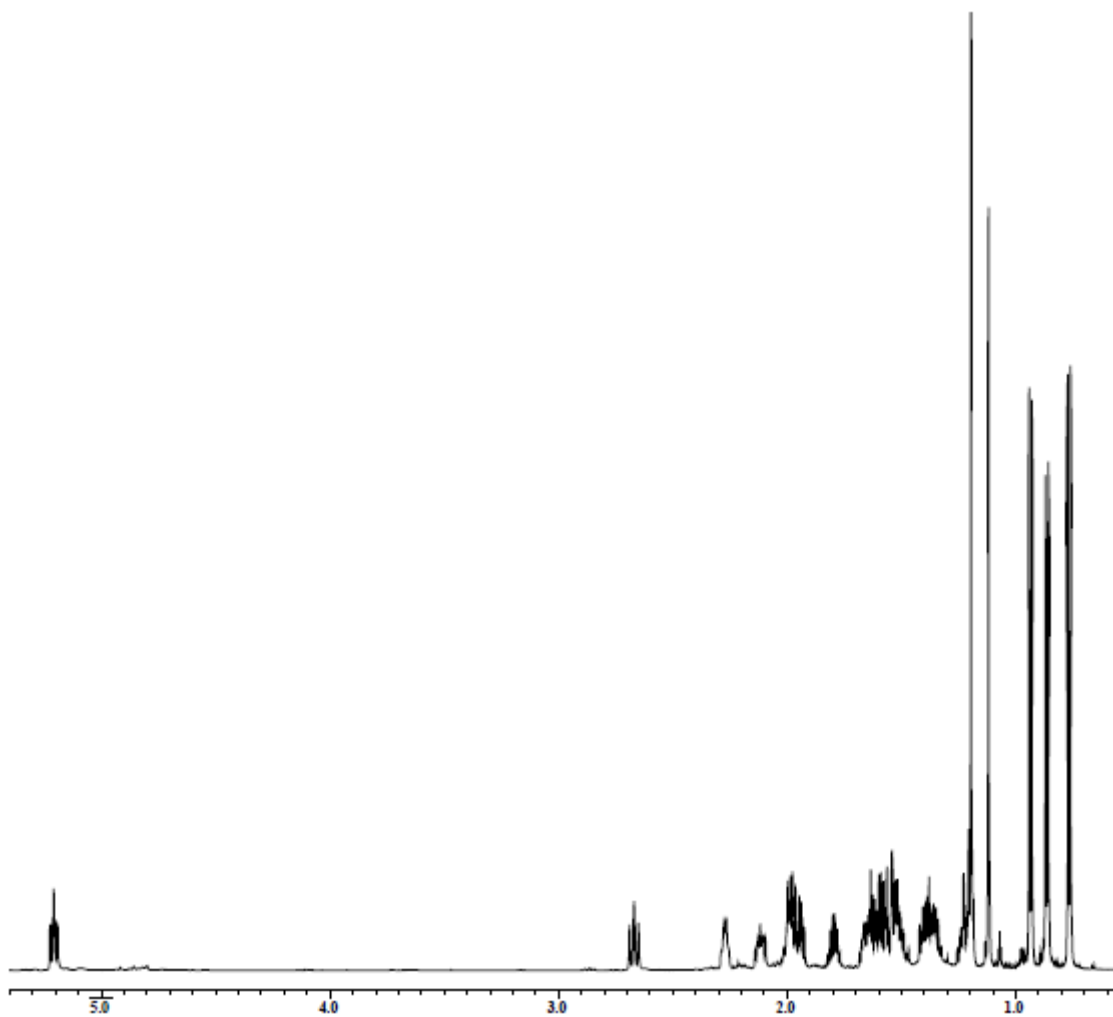


図 2-3-1. cycloocta-9-en-7-ol の重クロロホルム中における¹H NMRスペクトル (ppm)

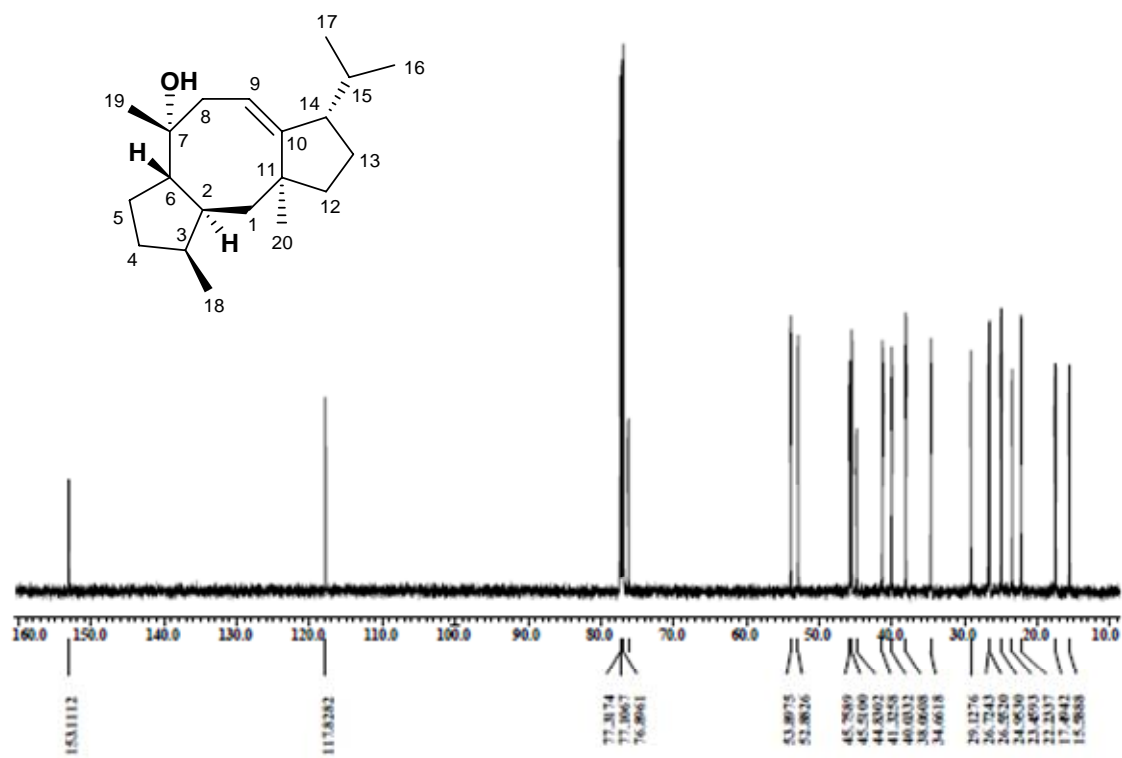


図 2-3-2. cycloocta-9-en-7-ol の重クロロホルム中における ^{13}C NMRスペクトル (ppm)

表 2-3-1. ^1H NMRと ^{13}C NMR スペクトルデータ

2^a		
no	δ_{C}	δ_{H} (mult., <i>J</i> in Hz)
1	45.8 (t)	1.56 (br d, 13.0), 1.21 (t, 13.0)
2	38.1 (d)	2.12 (m)
3	40.0 (d)	1.99 (m)
4	34.7 (t)	1.63 (m), 1.23 (m)
5	26.7 (t)	1.65 (m), 1.51 (m)
6	52.9 (d)	1.94 (br dd, 8.3, 5.5)
7	76.2 (s)	
8	41.3 (t)	2.67 (br t, 11.6, 11.0), 1.98 (dd, 12.4, 7.6)
9	117.8 (d)	5.21 (ddd, 10.3, 7.6, 2.0)
10	153.1 (s)	
11	44.8 (s)	
12	45.5 (t)	1.59 (m), 1.40 (m)
13	23.5 (t)	1.53 (m), 1.36 (m)
14	53.9 (d)	2.28 (m)
15	29.1 (d)	1.80 (m)
16	17.5 (q)	0.77 (d, 6.8)
17	22.2 (q)	0.94 (d, 6.8)
18	15.6 (q)	0.87 (d, 7.6)
19	26.6 (q)	1.12 (s)
20	25.0 (q)	1.19 (s)

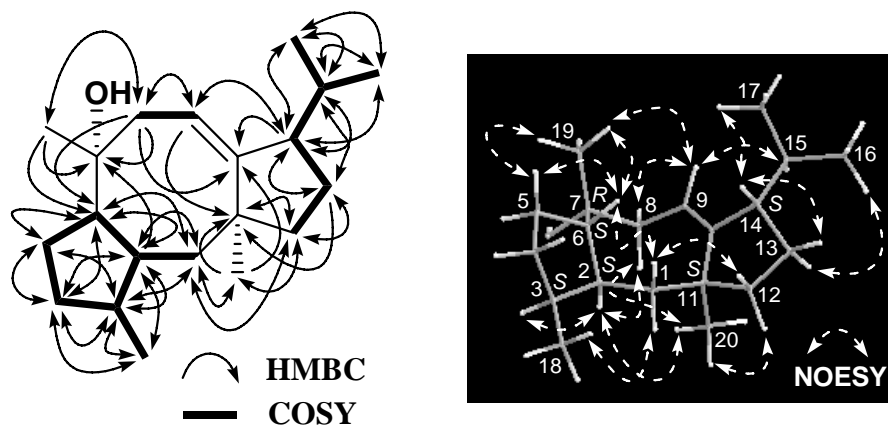


図 2-3-3. cycloocta-9-en-7-ol の構造
 (A) HMBC と COSY、(B) cycloocta-9-en-7-ol の 3D 構造

第四節 考察

第一節では CotB1 の機能解析をするために、DMAPP と IPP を用い、CotB1 の反応生産物の検出を試みた。CotB1 は大腸菌大量発現ベクターに導入し、精製を行った。大量発現させた CotB1 は、SDS-PAGE で単一になることを確認した。SDS-PAGE の結果、CotB1 の推定アミノ酸配列の分子量に相当する分子量である約 39 kDa を示した。組み換えタンパク質 CotB1 を用いて DMAPP と IPP を基質に GGDP 化反応を試みたところ、GGDP が得られた。この結果から、CotB1 は、DMAPP と IPP を基質として GGDP を合成する GGDP 合成酵素であることが機能的にも明らかになった。

第二節では CotB2 の機能解析をするために、テルペン環化酵素と推定した CotB2 について、大腸菌で高発現させたヒスチジンタグ付き組換え酵素を用いて機能解析を行った。SDS-PAGE とゲルろ過による分析の結果から、本酵素は 37 kDa のサブユニットからなる homodimer であると推定した。精製酵素を用いた *in vitro* 反応産物を GC-MS によって分析したところ、 Mg^{2+} 依存的に GGDP が未知化合物 2 に変換されることが判明した。しかしながら、GPP と FPP を基質として反応を行い、GC-MS 分析をした場合は、GPP と FPP は環化しないことがわかった。この結果により、CotB2 は GGDP のみを選択する基質特異性を持っていることが分かった。

第三節では未知化合物 2 の構造を cycloocta-9-en-7-ol と決定した。また、相対配置 (2S*, 3S*, 6S*, 7R*, 11S*, 14S*) は NOESY 相関によって決定し、さらに図 2-3-4 に示す MM2 エネルギー最小化計算を用いた分子モデリングにより確認した。以上の結果から、cycloocta-9-en-7-ol の化学構造と、CotB2 の触媒する環化反応が Mg^{2+} 依存的であることから、この環化反応の反応機構を図 2-4-2 のように推定している。まず、GGDP のジリン酸部分の引き抜きによってカルボカチオン 4 が生成し、次いで、2 つの連続した 1,2-hydride シフトによって 9-10 位間の二重結合が形成され、中間体 5 が生成する。次に、5 の 3 位の protonation によって反応が開始されて 2 位と 6 位の間に C-C 結合が形成され、カルボカチオン 6 が生成する。6 は求核剤の H_2O と反応して、CotB2 反応産物である cycloocta-9-en-7-ol を生成する。CotB2 反応は、以上のような A-B 型の反応機構で反応が進行すると推測している。

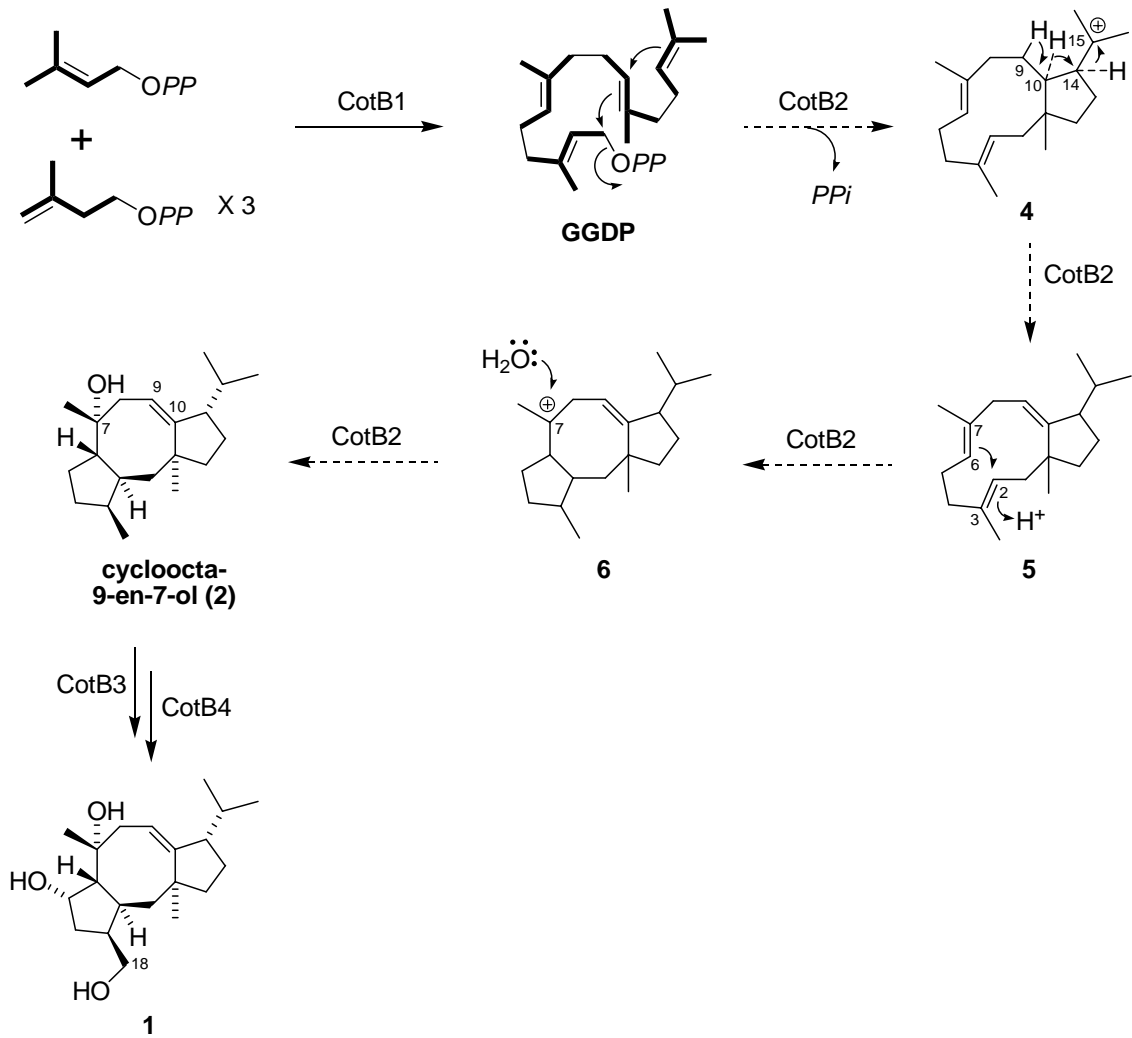


図 2-4-1. cycloocta-9-en-7-ol の生合成経路

第三章

テルペン骨格の修飾に関わる酵素の機能解析

第一節 チトクローム P450 遺伝子 CotB3 の機能解析

第一項 pCOT104 デリレーションプラスミドの構築と *S. albus* への導入

第二章では、テルペン環化酵素 CotB2 が GGDP を基質として cycloocta-9-ene-7-ol を生成することを明らかにした。このことから、cycloocta-9-ene-7-ol はサイクロオクタチンの生合成中間体であり、この化合物がチトクローム P450 である CotB3 または CotB4 による水酸化を受けることでサイクロオクタチンが生合成されると推定した。このことを明らかにするため、pCOT104 のデリレーションプラスミドを構築し、*S. albus* を用いた異種発現を試みた。

実験方法

第一章では、*cotB1*、*cotB2*、*cotB3*、*cotB4* がサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの最小単位であることを明らかにした。本章では二つのチトクローム P450 (CotB3 と CotB4) の機能解析を行った。まず、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターをクローニングしたコスミド pCOT9469 をテンプレートに表 3-1-1 のプライマーを用いて *cotB1* から *cotB3* 遺伝子を含む 3.4 kb の DNA 断片を増幅し、PCR 産物を電気泳動して精製した。これを Ligation High を用いて pT7Blue T-vector にクローニングした。ライゲーション産物を DH5 α のコンピテントセルに 5 μ l 加えてトランスフォームし、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に植菌した。37 $^{\circ}$ C で 14 時間培養し生えてきたコロニーに対しコロニー-PCR を行った。*cotB1* から *cotB3* を含むプラスミドを保持したコロニーを 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し、プラスミドを回収して、pSE101 ベクターに導入した(pCOT103)。さらに、pCOT104 から *cotB3* のみを欠失させるため、*cotB3* 中に 0.7 kb 離れて 2 箇所存在する *Pfl*MI で pCOT104 を消化した後、セルフライゲーションを行って pCOT104 のデリレーションプラスミド pCOT104 Δ を構築した。さらには、*cotB1* と *cotB2* のみからなる 2.0 kb の DNA 断片を含むプラスミド pCOT102 は、表 3-1-2 のプライマーを用いて構築した。構築したプラスミドを *S. albus* に導入し、異種発現を試みた。

表 3-1-1 . pCOT103 のクローニングプライマー

Forward: 5'-GGA TAT CTA GAT TTC GAC GTG GAG TCA GTC AG (下線は、*Xba*I)

Reverse: 5'-CGG GAA AGC TTC AGC GCG CGG CTC GCA CAC CAT GG (下線は、*Hind*III)

表 3-1-2 . pCOT102 のクローニングプライマー

Forward: 5'-GGA TAT CTA GAT TTC GAC GTG GAG TCA GTC AG (下線は、*Xba*I)

Reverse : CCC CAA GCT TTC ACT GGA TGC GAG (下線は、*Hind*III site)

PCR 反応

Prime Star GXL taq (TaKaRa)を用い、以下の反応条件で行った。

95	5 分	} 30 回
98	20 秒	
68	4 分	
72	10 分	
4		

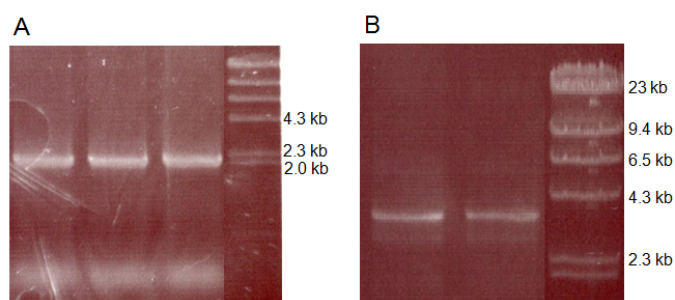


図 3-1-1 . *cotB1* から *cotB3* を含む PCR 産物

A, CotB1-2 (2 kb); B, CotB1-3 (3.4 kb)

結果

PCR 結果、約 3.4 kb の CotB1 から CotB3 までの PCR 産物を確認した。また、pCOT104 のプラスミドから CotB3 がデリーションプラスミドも 2.9 kb の CotB1

や CotB2 そして CotB4 を含むプラスミドと CotB1 から CotB2 を含むプラスミドの 2.0 kb の PCR 産物を確認した。また、放線菌 大腸菌シャトルベクター pSE101 に導入した pCOT103 や pCOT102 そして pCOT104 をデリージョンプラスミドである pCOT104 Δ のプラスミドも確認した。それぞれのプラスミド (図 3-1-2) を用いて *S. albus* に異種発現を成功した。

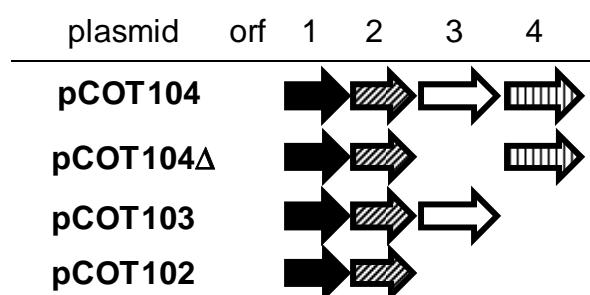


図 3-1-2 . サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの最小単位 (pCOT104) とデリージョンプラスミド

第二項 *S. albus* 形質転換株の培養物の分析

実験方法

第一項で作製した各デリーションプラスミドを導入した *S. albus* の形質転換体 *S. albus*/pCOT103、*S. albus*/pCOT102、*S. albus*/pCOT104Δ を TSB 培地にて 30 で 3 日間培養した。培養後、培養液の 2 倍量のアセトンを加えて静置した後、エバポレーターでアセトンを除去した水相を酢酸エチルで抽出した。この酢酸エチル抽出物について、LC-MS を用いて分析を行った (表 3-1-3)。

表 3-1-3 . LC-MS の条件

Thermo Fisher Accela HPLC
Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap MS
CAPECELLPAK C18 UG120 column (2.0 Ø ×150 mm, 5 µm, Shiseido)
Temperature at 40
Flow rate 0.2 ml/min
50-100 % ACN in water (with 0.01 % TFA) for 20min
Positive ion mode
FTMS + ESI

結果

S. albus 形質転換体培養物の LC-MS 分析の結果、*cotB1*、*cotB2*、*cotB3* を含むプラスミド pCOT103 を保持する *S. albus*/pCOT103 の抽出液にのみ、保持時間 11.58 分に新たな未同定化合物 3 が検出された(図 3-1-3)。一方、*S. albus*/pCOT102、*S. albus*/pCOT104Δ 由来の培養液の酢酸エチル抽出物からは、保持時間 15.65 分の cycloocta-9-en-7-ol が検出された(図 3-1-4)。

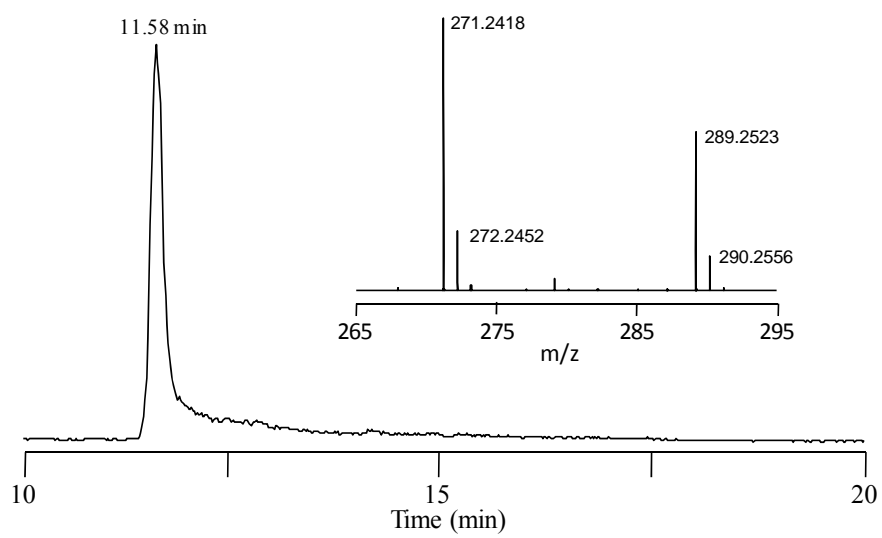


図 3-1-3. *S. albus*/pCOT103 培養物の酢酸エチル抽出物の LC-MS 分析
 $m/z=289.2497-289.2555$ の Mass chromatogram と 11.58 分のピークの HR-MS(挿入
図) を示す。

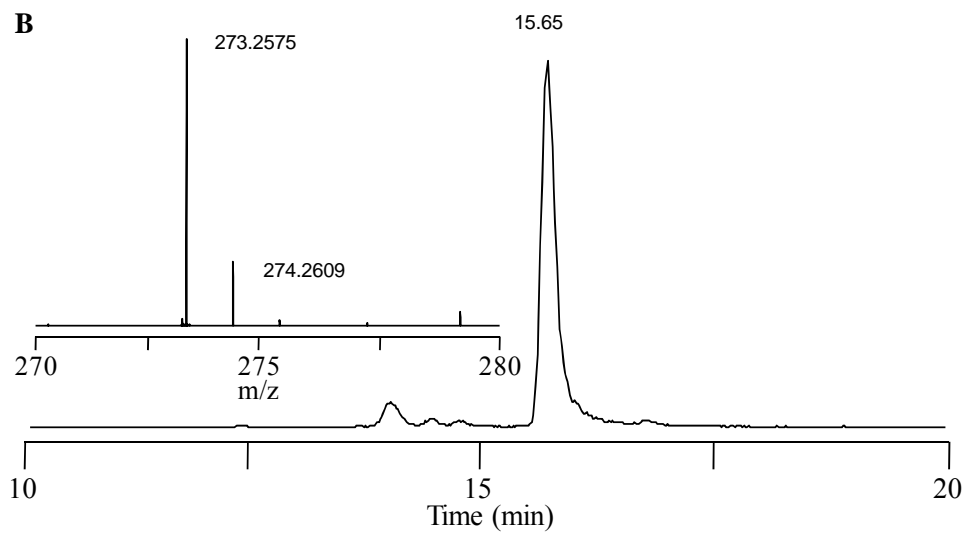
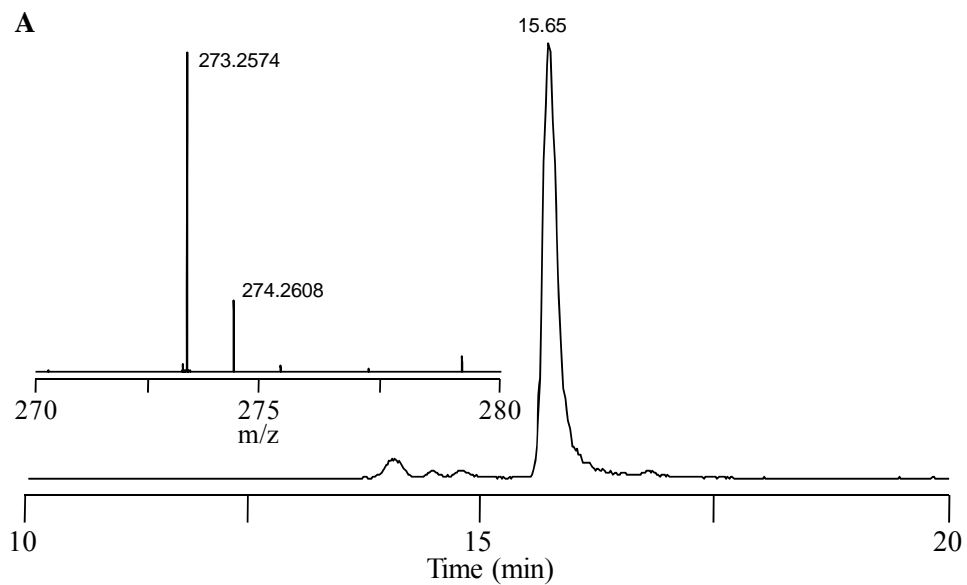


図 3-1-4. *S. albus*/pCOT104 Δ (A)と *S. albus*/pCOT102 (B)培養物の酢酸抽出物の LC-MS 分析
 $m/z=273.2550-273.2604$ の Mass chromatogram とそれぞれの 15.65 分のピークの HR-MS (挿入図) を示す。

第三項 未同定化合物 3 の精製

前項で見いだした *S. albus*/pCOT103 培養物中の未同定化合物 3 を精製するために、*S. albus*/pCOT103 を 100 ml の TSB 培地を入れた 500 ml コブ付き三角フラスコで 30℃ にて 3 日間培養した。10 L 分の培養物について、まず、菌体はアセトンで抽出した後、酢酸エチルで抽出した。培養上清については、そのまま酢酸エチル抽出を行った。これらの酢酸エチル抽出物は、silica gel chromatography を用いてヘキサンと酢酸エチルの混合溶媒で溶出し、さらに、HPLC を用いて精製を行った。

実験方法

TSB 培地での生産物は silica gel chromatography を用いて精製を行った。この精製方法は図 3-1-5 に示した。

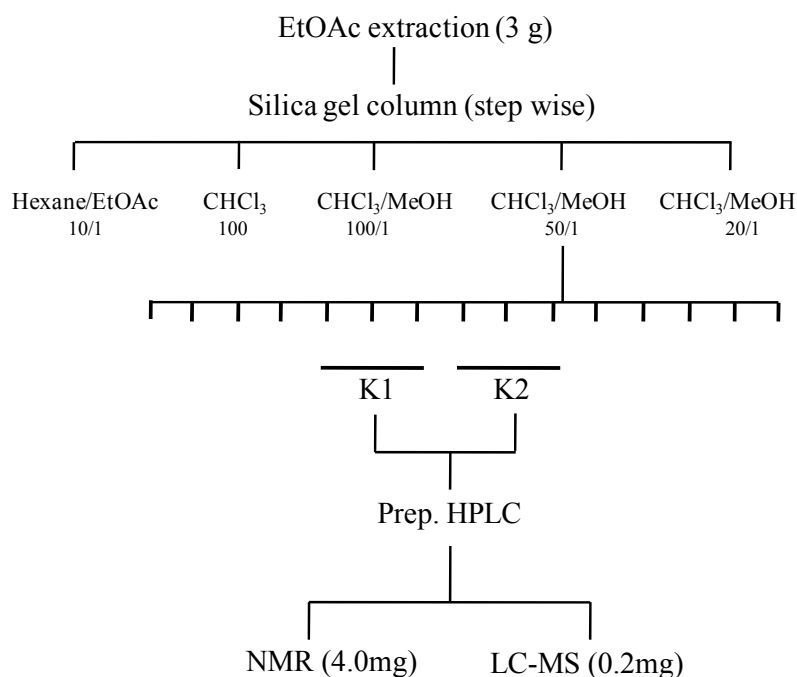


図 3-1-5 . Silica gel chromatography を用いた新たな未同定化合物 3 の精製

表 3-1-3 . HPLC 条件

HPLC条件

Senshu Pak
PEGASIL ODS
(20 x250 mm,)
Flow rate 4.0 ml/min
90% MeOH
UV 203 nm

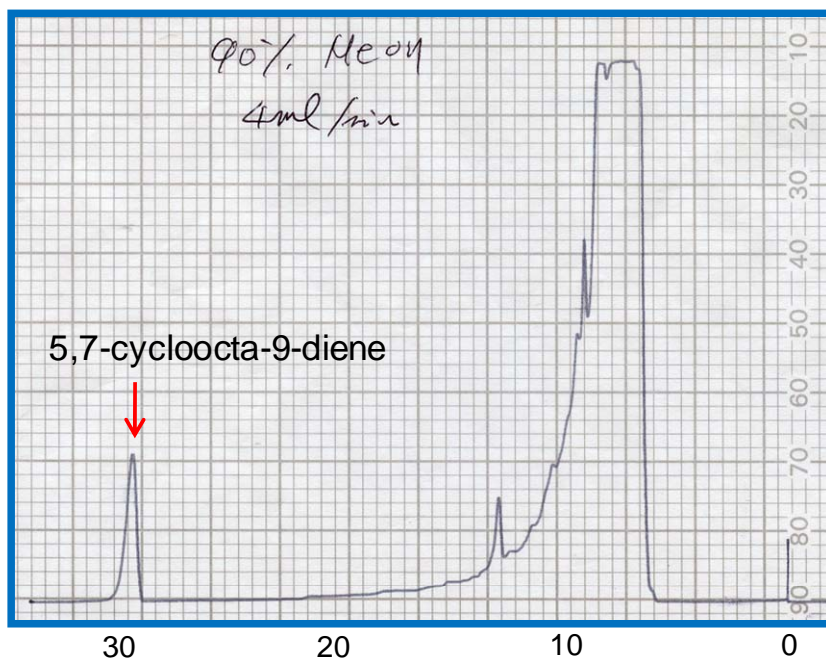


図 3-1-6 . HPLC を用いた新たな化合物 3 の精製

結果

10 L分のTSB培養液から、3 gの酢酸エチル抽出物が得られた。その抽出物 3g をsilica gel chromatographyを用いてさらに精製したところ、新たな未同定化合物 **3** はCHCl₃/MeOHの比 50:1 の条件で溶出された。さらに、HPLCを用いて精製を進めたところ、4.2 mgの未同定化合物 **3** が得られた。

第二節 CotB3 反応産物の構造解析

実験方法

第一節で精製した未同定化合物 3 の構造解析について、HR-ESI-MS、および各種 NMR スペクトルを用いて行った。

結果

HR-ESI-MSの結果、 $[M+H-H_2O]^+$ m/z 289.2522 ($C_{20}H_{33}O$, calcd 289.2526)、および、 $[M+H-(H_2O \times 2)]^+$ m/z 271.2418 ($C_{20}H_{31}$, calcd 271.2522)のシグナルが確認されたことから(図 3-1-3) 化合物 3 はcycloocta-9-en-7-olより酸素原子 1 個分大きい分子式 $C_{20}H_{34}O_2$ を持つと推定した。HSQCスペクトルを解析することによって、各炭素に結合したプロトンのシグナルを帰属し、それらのケミカルシフト値を表 3-2-1 にまとめた。サイクロオクタチン、およびcycloocta-9-en-7-olの 1H と ^{13}C NMR スペクトルと比較して、化合物 3 は、サイクロオクタチン、および cycloocta-9-en-7-olと同様に 5-8-5 骨格を持つことが示唆された。化合物 3 では、cycloocta-9-en-7-olのC-5 のメチレンシグナルの代わりに、メチンシグナル[δ_H 4.43 (br dd, 4.8, 3.4), δ_C 75.5]を持つことが確認された。このことは、化合物 3 は、cycloocta-9-en-7-olのC-5 に水酸基が付加した構造であることを示している。

さらに、COSY、および HMBC スペクトルの詳細な解析によって、化合物 3 は、図 3-2-3 に示す cycloocta-9-en-5,7-diol を持つことが判明した。

化合物 3 の相対配置(2*S**, 3*S**, 5*S**, 6*S**, 7*R**, 11*S**, 14*S**)は、5 位以外は化合物 2 と同様に決定し、5 位については以下の NOESY 相関によって決定した。さらに ChemDraw Ultra Ver. 9.0 を用いた MM2 エネルギー最小化計算を行った分子モデリングにより確認した。NOESY スペクトルにおいて、H-5 と H-6、および H-19 の相関から H-5 はβ-配置と判断した。以上の結果から、チトクローム P450 である CotB3 は cycloocta-9-en-7-ol の 5 位に水酸基を立体選択的に付加して、cycloocta-9-en-5,7-diol を合成することが明らかになった。

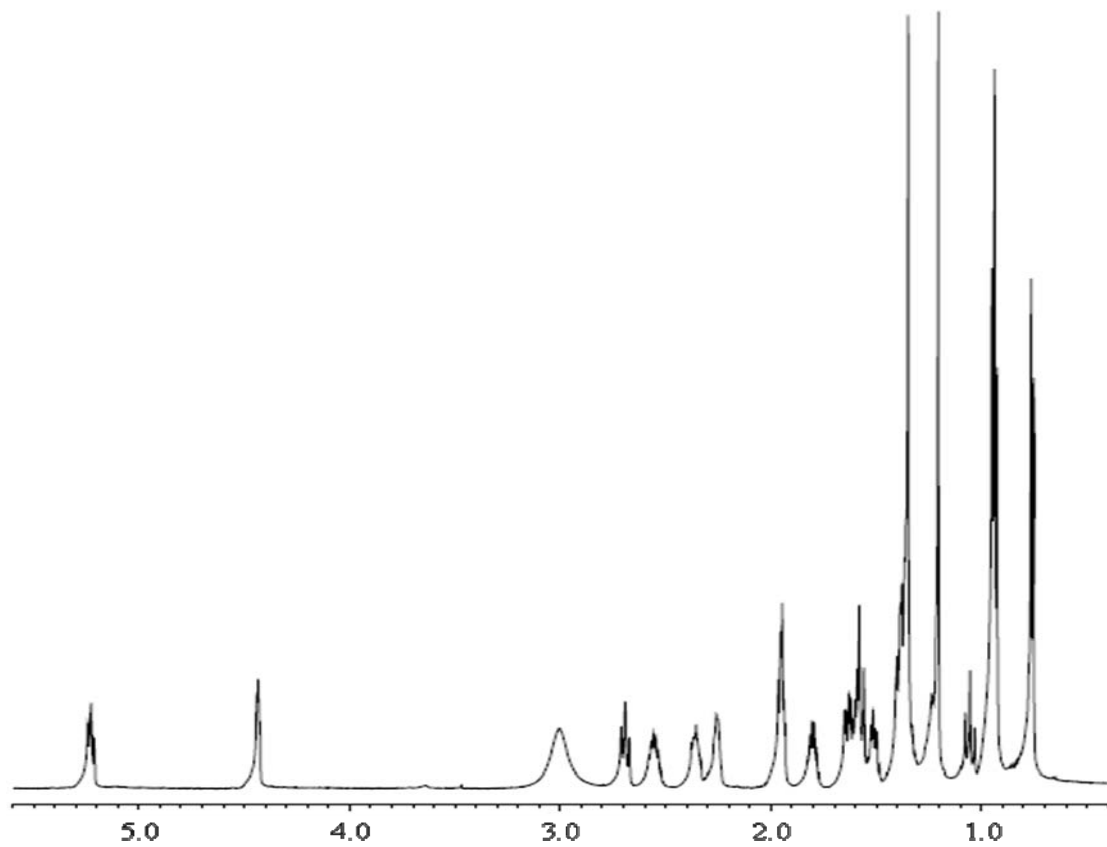


図 3-2-1. cycloocta-9-en-5,7-diolの ^1H NMRスペクトル (ppm)

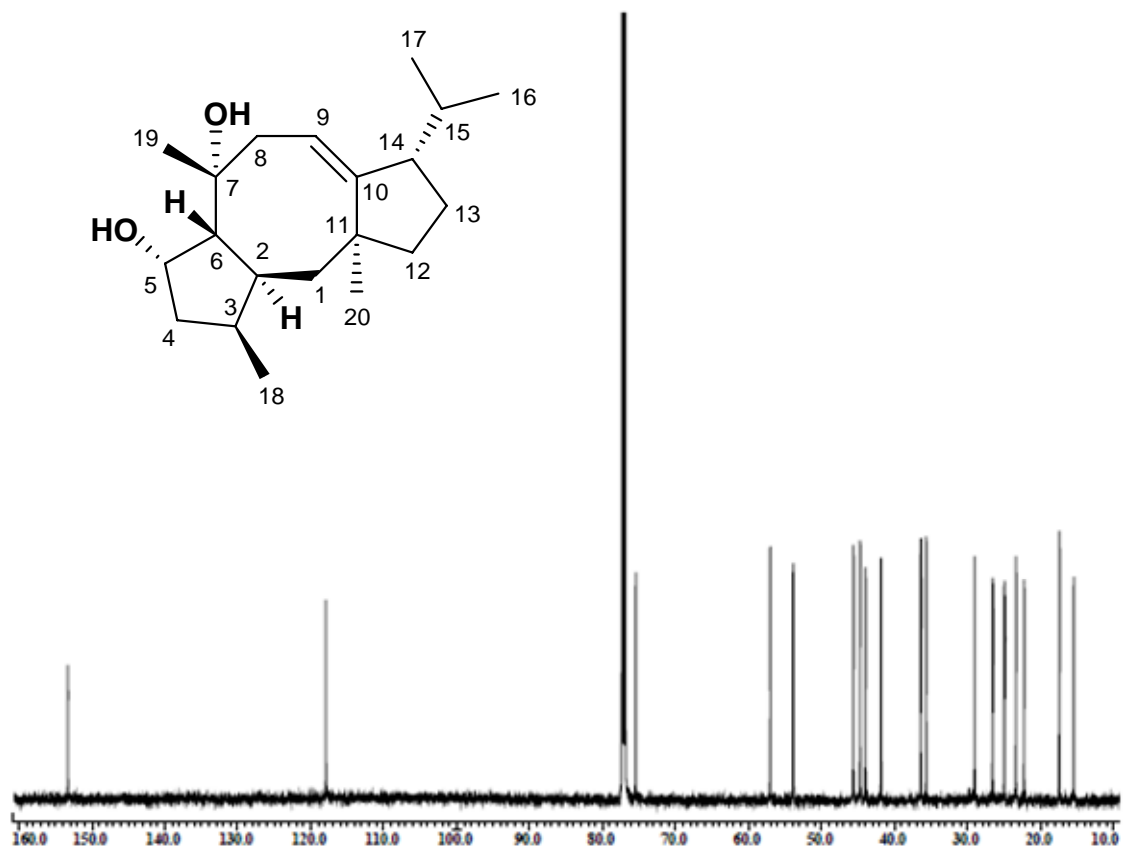
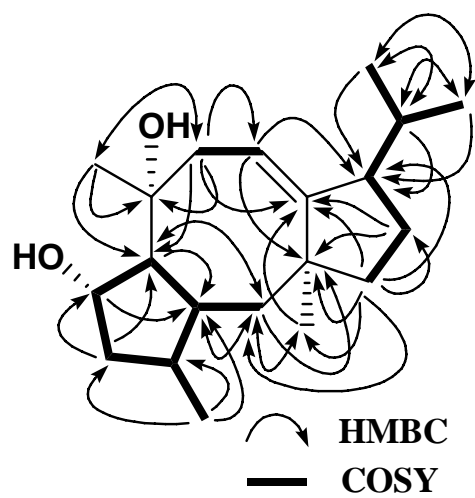


図 3-2-2. cycloocta-9-en-5,7-diolの ^{13}C NMRスペクトル

表 3-2-1. Cycloocta-9-en-5,7-diolとcyclooctatinの¹H NMR及び
¹³C NMRスペクトルのデータ

cycloocta-9-en-5,7-diol		cyclooctatin	
δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (mult., <i>J</i> in Hz)
44.72 (t)	1.57 (br d, 13.1), 1.05 (t, 13.1)	45.6 (t)	1.68 (br d, 12.8), 1.20 (t, 12.8)
36.4 (d)	2.37 (m)	35.8 (d)	2.56 (m)
35.6 (d)	2.56 (m)	44.9 (d)	2.61 (m)
44.0 (t)	1.64 (dd, 12.7, 5.2), 1.38 (dd, 12.7, 3.4)	39.7 (t)	1.71 (br dd, 12.6, 5.0), 1.38 (dt, 12.6, 3.4)
75.5 (d)	4.43 (br dd, 4.8, 3.4)	75.7 (d)	4.44 (br dd, 5.0, 3.4)
57.0 (d)	1.95 (t, 4.8)	58.0 (d)	1.97 (t, 5.0)
77.3 (s)		78.4 (s)	
41.8 (t)	2.69 (br t, 11.7, 11.0), 1.94 (m)	42.2 (t)	2.72 (br t, 11.6), 1.91 (dd, 12.8, 7.4)
117.9 (d)	5.23 (ddd, 10.3, 7.6, 2.0)	119.1 (d)	5.28 (ddd, 10.3, 7.4, 2.2)
153.3 (s)		154.5 (s)	
44.69 (s)		45.9 (s)	
45.6 (t)	1.59 (m), 1.37 (m)	46.6 (t)	1.59 (m), 1.42 (m)
23.3 (t)	1.51 (m), 1.36 (m)	24.3 (t)	1.56 (m), 1.38 (m)
53.9 (d)	2.26 (m)	55.1 (d)	2.30 (m)
29.0 (d)	1.80 (m)	30.2 (d)	1.83 (m)
17.4 (q)	0.76 (d, 6.9)	17.8 (q)	0.79 (d, 6.6)
22.2 (q)	0.93 (d, 7.6)	22.5 (q)	0.96 (d, 6.6)
15.4 (q)	0.95 (d, 7.6)	63.4 (t)	3.66 (dd, 10.8, 7.4), 3.55 (dd, 10.8, 6.8)
26.6 (q)	1.35 (s)	26.7 (q)	1.33 (br s)
24.9 (q)	1.21 (s)	25.2 (q)	1.25 (s)

A



B

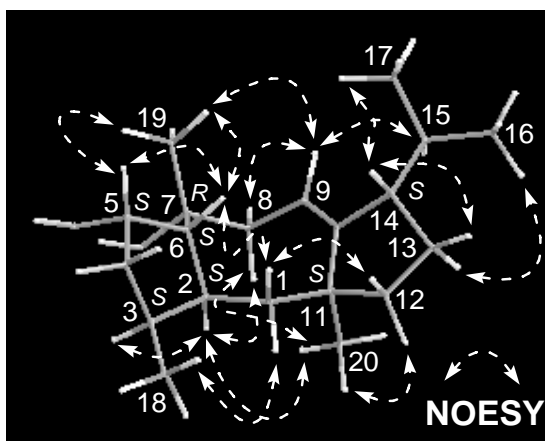


図 3-2-3. cycloocta-9-en-5,7-diol の構造
(A) HMBC と COSY、(B) cycloocta-9-en-5,7-diol の 3D 構造

第三節 チトクローム P450 遺伝子 CotB4 の解析

第一項 大腸菌を用いた微生物変換系の構築

第二節では、*S. albus*/pCOT103 の培養物からサイクロオクタチンの中間体である新規 cycloocta-9-en-5,7-diol が単離され、その構造が決定された。このことから、中間体 cycloocta-9-en-7-ol がチトクローム P450 である CotB3 によって水酸化され、cycloocta-9-en-5,7-diol に変換されることが明らかになった。本節では、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスター中の残りの一つの遺伝子であるチトクローム P450 (*cotB4*) の機能解析を試みた。原核生物由来の P450 に関しては、大腸菌で発現させて、その P450 発現大腸菌を用いた微生物変換によって機能解析が行われている例が報告されている。そこで、*Pseudomonas putida* 由来の flavodoxin と flavodoxin reductase を組み込んだ P450 発現用ベクター pT7NS-camAB [28] に、*cotB3* と *cotB4* をそれぞれ別々にクローニングした大腸菌を作製することとした。

実験方法

サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターを含むしたコスミド pCOT9469 をテンプレートに表 3-3-1 のプライマーを用いて *cotB3* と *cotB4* 遺伝子をそれぞれ増幅し、PCR 産物を電気泳動して精製した。これを Ligation High を用いて pT7Blue T-vector にクローニングした。ライゲーション産物を DH5 α のコンピテントセルに 5 μ l 加えてトランスフォームし、50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に植菌した。37 $^{\circ}$ C で 14 時間培養し生えてきたコロニーに対しコロニー-PCR を行った。*cotB3* または *cotB4* を持っていたコロニーを 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培地に植菌し、プラスミドを回収して、それぞれ制限酵素 *Nde*I と *Spe*I を処理して P450 発現用ベクター pT7NS-camAB ベクターに導入した。

表 3-3-1 . cotB3 とcotB4 のクローニングプライマー

CotB3-F: 5'-GGG CAT ATG AGG GAA CGG GGA CCC GTG ACT CCC (下線は、*NdeI*)

CotB3-R : 5'-GGG GAC TAG TTC AGC GCG CGG CTC GCA CAC CAT GG (下線は、*SpeI*)

CotB4-F: 5'-GGG CCA TAT GAG GAC CGC GCA GCA ACC GGC GAC (下線は、*NdeI*)

CotB4-R: 5'-GGG CAC TAG TTC AGC GTG GTT CCG GAA TCA TCC (下線は、*SpeI*)

PCR 反応

Ex Taq (TaKaRa)を用い、以下の反応条件で行った。

955分	} 30回
9820秒	
6890秒	
7210分	
4保存	

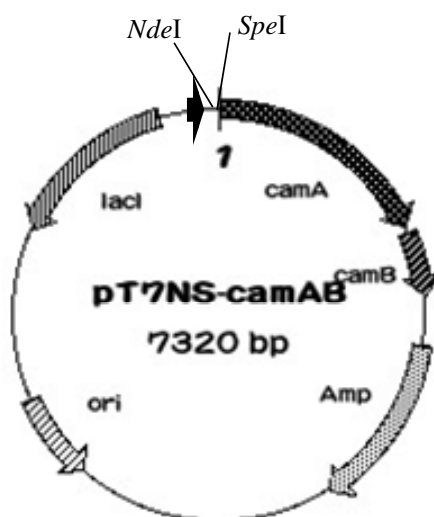


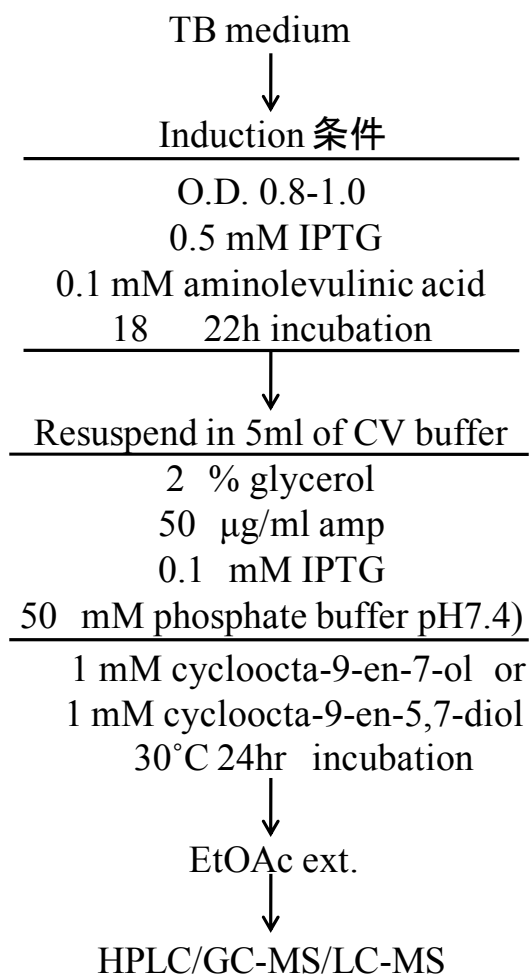
図 3-3-1 . pT7NS-camAB ベクターの構造

第二項 *cotB3* と *cotB4* の発現と生産物の分析

実験方法

P450 発現用ベクター-pT7NS-camAB に導入した *cotB3* と *cotB4* は、*E. coli* BL(DE3)を用いて発現させた。これらの形質転換体を用いた *cotB3* と *cotB4* の発現条件と微生物変換系は表 3-3-2 に示した。

表 3-3-2 . *cotB3* と *cotB4* の発現条件と微生物変換



結果

LC-MS 分析の結果 (図 3-3-2) 組換え CotB3 を用いて cycloocta-9-en-7-ol の微生物変換を試みたところ、確かに、cycloocta-9-en-5,7-diol が生産された。この結果から、CotB3 が cycloocta-9-en-7-ol の 5 位に水酸基を付加して cycloocta-9-en-5,7-diol を合成することが、微生物変換によっても証明することができた。また、GC-MS 分析の結果から CotB3 の反応後、基質である cycloocta-9-en-7-ol (保持時間 9.53 分) は cycloocta-9-en-5,7-diol に変換されるため、その量は確かに減少することが確認された(図 3-3-3)。一方、CotB4 反応の場合は、cycloocta-9-en-7-ol 量の減少は観察されなかったことから、CotB4 は cycloocta-9-en-7-ol とは反応しないことが示唆された(図 3-3-4)。

次いで、組換え CotB4 を発現している大腸菌を用いて、cycloocta-9-en-5,7-diol の微生物変換を行った。その LC-MS 分析の結果 (図 3-3-5) サイクロオクタチンに由来する保持時間 5.78 分のピークと、HR-MS において、 $[M(C_{20}H_{34}O_3)+H-H_2O]^+$ m/z 305.2472 ($C_{20}H_{33}O_2$, calcd 305.2481) のシグナルが検出されたことから、CotB4 は cycloocta-9-en-5,7-diol を基質として反応して、サイクロオクタチンを合成することが判明した。つまり、CotB4 は、cycloocta-9-en-5,7-diol の 18 位に水酸基を立体選択的に導入する水酸化酵素であることが明らかになった。

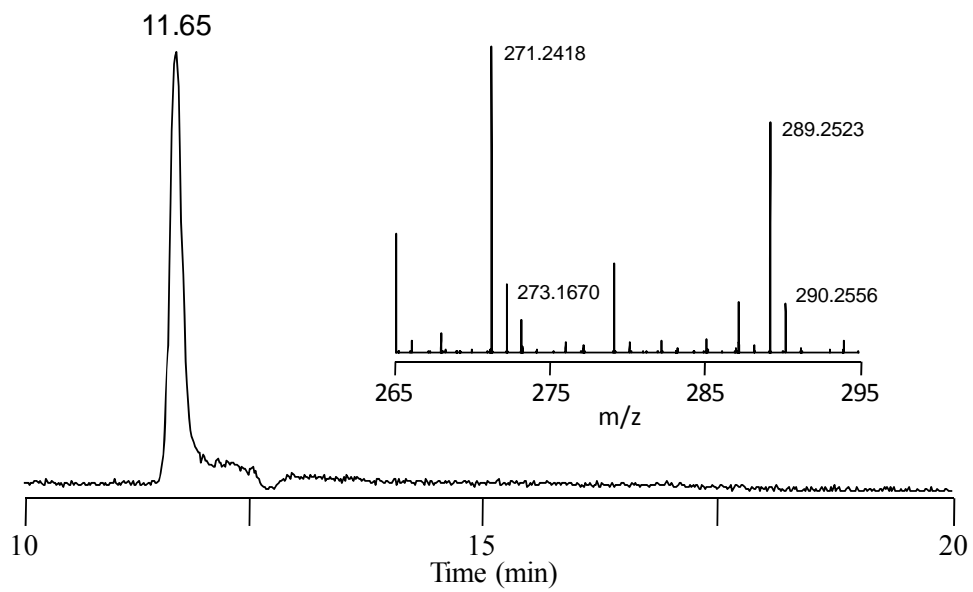


図 3-3-2 . CotB3 を用いた微生物変換の LC-MS 分析
 $m/z=289.2497-289.2555$ の Mass chromatogram と 11.65 分のピークの HR-MS(挿入
 図) を示す。

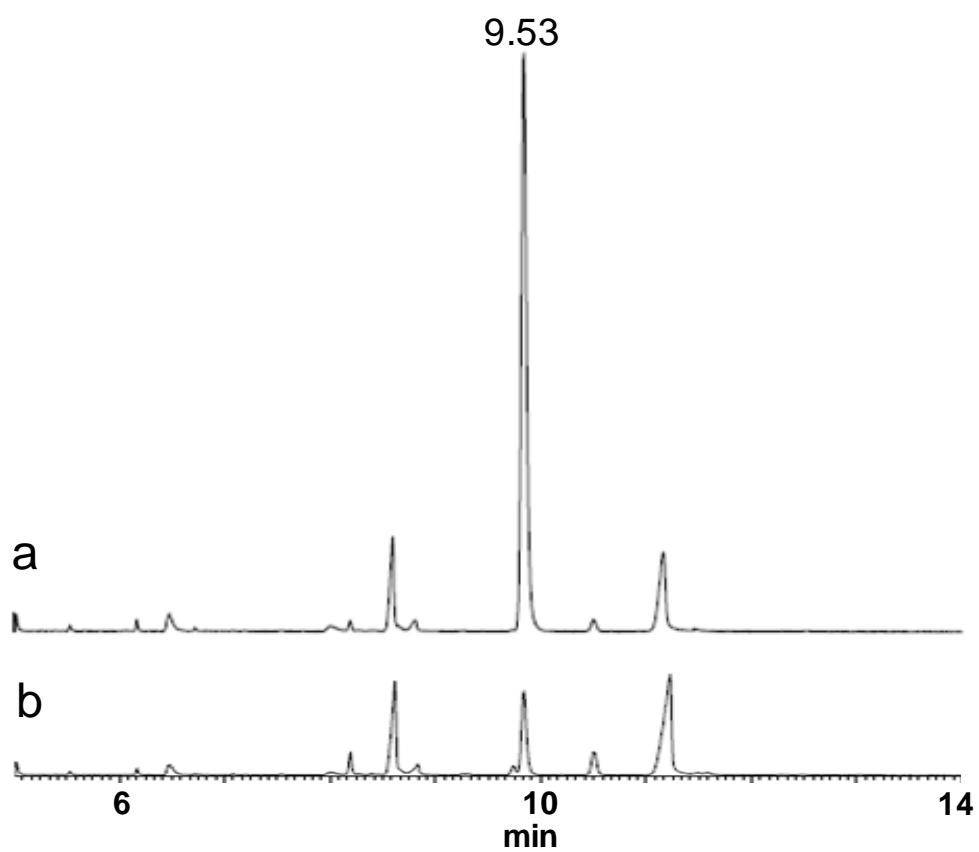


図 3-3-3. CotB3 発現大腸菌による cycloocta-9-en-7-ol の微生物変換の GC-MS 分析
(a, 熱処理した CotB3; b, CotB3)

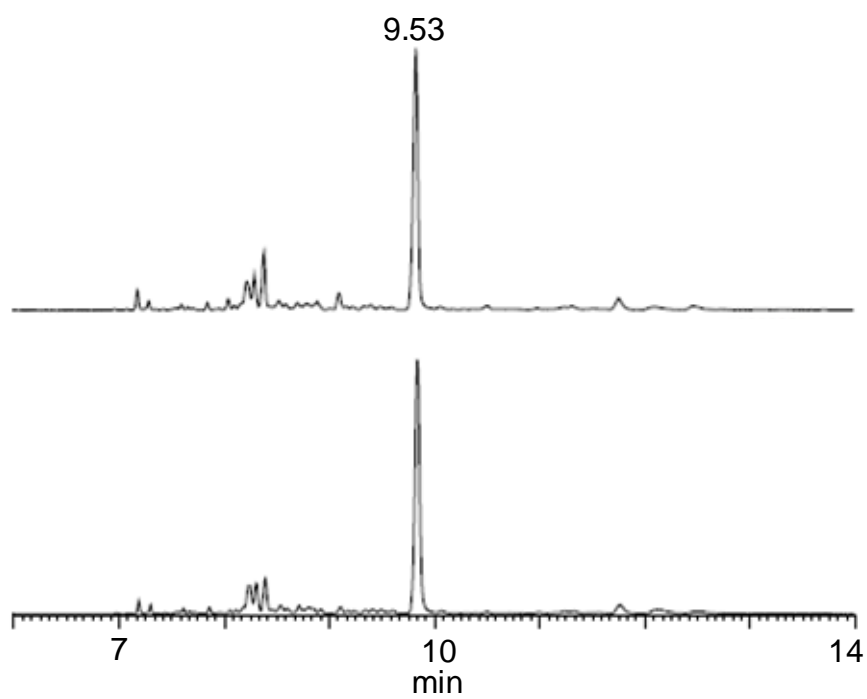


図 3-3-4. CotB4 発現大腸菌による cycloocta-9-en-7-ol の微生物変換の GC-MS 分析
(上, 熱処理した CotB4; 下, CotB4)

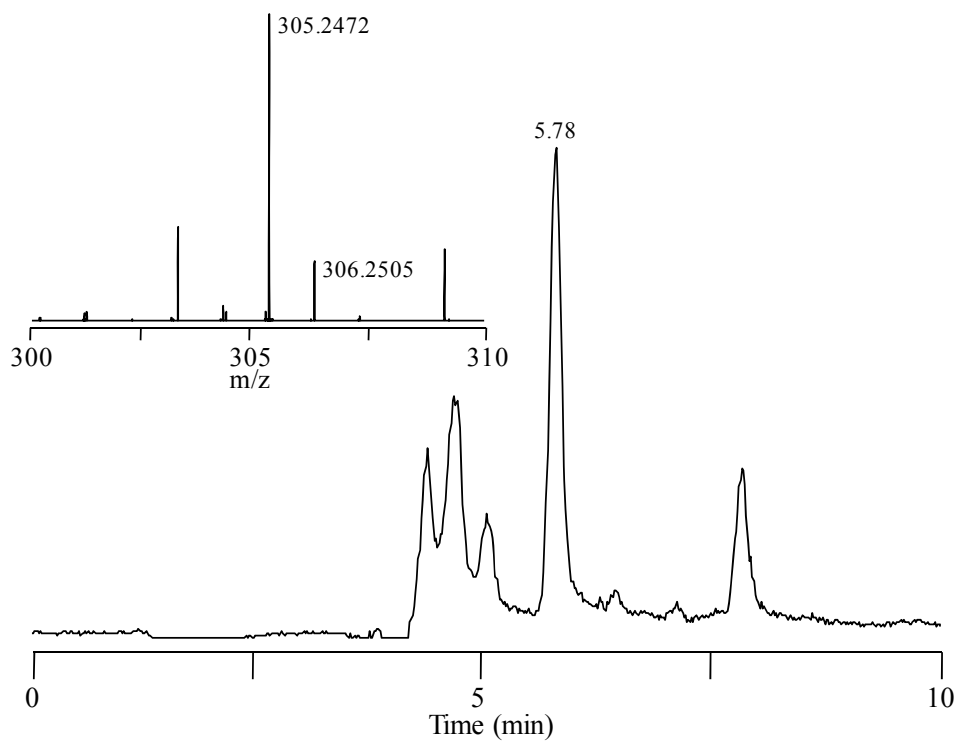


図 3-3-5. CotB4 を用いた微生物変換の LC-MS 分析
 $m/z=305.2444-305.2506$ の Mass chromatogram と 5.78 分のピークの HR-MS (挿入
図) を示す。

第四節 考察

第一節ではチトクローム P450 遺伝子 CotB3 の機能解析をするために、PCR を行って 3.4 kb の CotB1 から CotB3 までの組換えプラスミド(pCOT103)を構築した。また、pCOT104 のプラスミドから、CotB3 が欠失したプラスミド(pCOT104Δ)も構築した。それらのプラスミドを導入した *S. albus* の培養物の酢酸エチル抽出物について LC-MS 分析を行ったところ、pCOT103 場合にのみ新たな未同定化合物 3 が検出された。一方、CotB1 と CotB2 のみを含む場合(pCOT102)と CotB1、CotB2、CotB4 を含む場合(pCOT104Δ)には LC-MS の分析結果、cycloocta-9-en-7-ol が蓄積した(図 3-1-4)。これらの結果から、CotB3 が先に cycloocta-9-en-7-ol に水酸基を導入すること、その後に CotB4 が反応することが示唆された。

未同定化合物 3 を同定するために、10 L 分の *S. albus*/pCOT103 培養物から 4.2 mg の未同定化合物 3 を精製した。

第二節では未同定化合物 3 の構造解析を行い、その構造は cycloocta-9-en-5,7-diol であると決定した。

第三節ではチトクローム P450 遺伝子 CotB4 の解析をするために、*Pseudomonas putida* 由来の flavodoxin と flavodoxin reductase を組み込んだ P450 発現用ベクター-pT7NS-camAB に CotB4 をクローニングした。また、CotB3 も同じベクター-pT7NS-camAB に導入して微生物変換を試みた。その結果から、CotB3 は cycloocta-9-en-7-ol を基質として 5 位に水酸基を導入し、cycloocta-9-en-5,7-diol を合成することを明らかにした。次に、CotB4 は、cycloocta-9-en-5,7-diol を基質として 18 位に水酸基を導入して、サイクロオクタチンを合成することを証明した。CotB4 は、cycloocta-9-en-7-ol を基質としなかったことから、その基質特異性は高いと考えられる。

以上の結果から、cycloocta-9-en-7-ol からサイクロオクタチンまでの生合成経路を図 3-4-1 のように決定した。

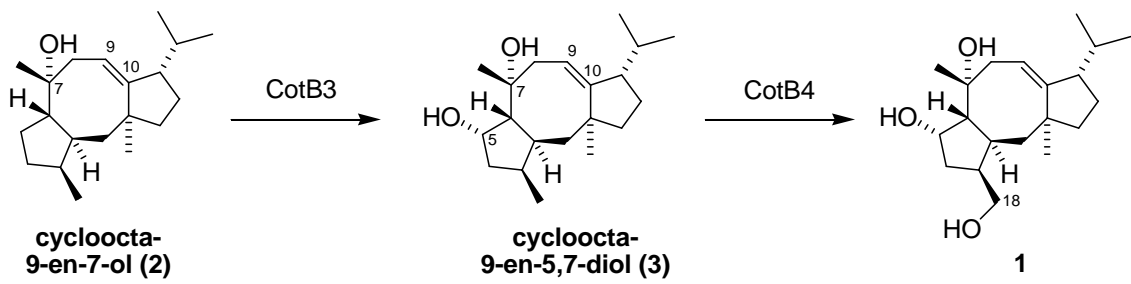


図 3-4-1 . cycloocta-9-en-5,7-diol からサイクロオクタチンまでの生合成経路

第四章

テルペン環化酵素 (CotB2) の結晶構造解析

第一節 CotB2 組換えタンパク質の調製

前章までにCotB2 はGGDPをcycloocta-9-en-7-olに変換するジテルペン環化酵素であることを明らかにした。これまでに、GGDPの環化を行うジテルペン環化酵素として、Taxadiene synthase [29]やFusicoccadiene synthase [19]などが知られているがいずれに関しても立体構造は報告されていない。それらの活性発現機構に関しては他のテルペン環化酵素とのホモロジーから、¹¹⁰DDMDモチーフ、²²⁰NDFYSYDREモチーフが重要であることが予想されるが、GGDPの認識機構や反応機構は不明である。さらに、CotB2 はジテルペン環化酵素ファミリーの中で、反応中に基質の水酸化を行うものとしてユニークな特徴を持つことが明らかとなり、この水酸化機構にも興味を持たれる。そこで、CotB2 の反応機構・基質認識機構の解明を目的として、CotB2 の結晶構造解析を行った。

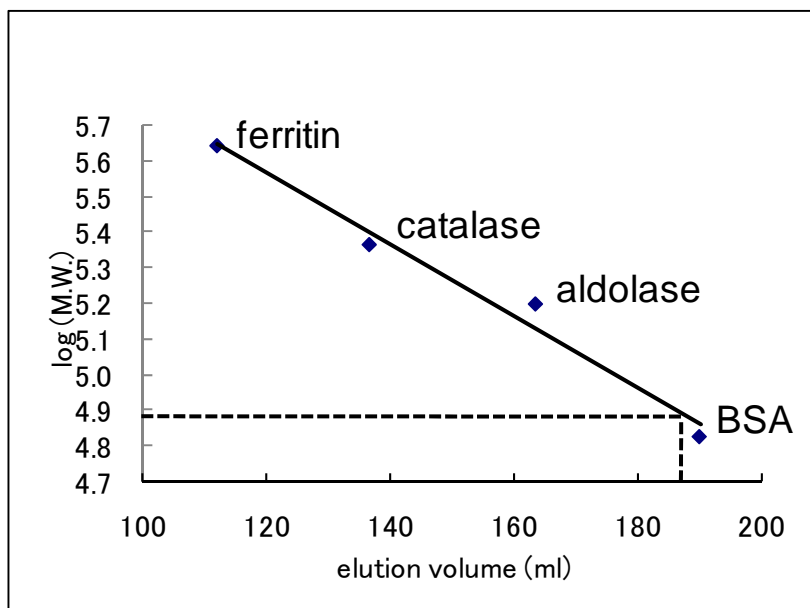
第一項 CotB2 組換えタンパク質の大量発現と精製

実験方法

第二章の第二節に述べた通り作製したpHCotB2 を用いて形質転換した大腸菌 BL21(DE3)のコロニーを 50 µg/ml kanamycinを含むLB培地に植菌し、37 °Cで 12 時間程度振とう培養をおこなった。この培養液を 200 mlのLB培地の入った坂口フラスコに 1 %植菌し、37 °CでOD₆₀₀が約 1.5 になるまで振とう培養を行い、終濃度 0.1 mMのisopropylthiogalactopyranoside (IPTG)を添加した後、18 °Cで 12-14 時間振とう培養した。菌体を 4 °C、4,000 × g、10 分間の遠心分離にて回収し、buffer A (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、100 mM NaCl) で懸濁した。菌体を超音波破砕し、4 °C、40,000 × g、10 分間で遠心を行い、上清をあらかじめ 20 mM imidazole を含むbuffer Aで平衡化をしておいたNi²⁺-NTAカラム(QIAGEN)にアプライし、250 mM imidazoleを含むbuffer Aを用いて目的タンパク質を溶出させた。目的タンパク質を含む画分をVIVASPIN 20 (Sartorius, MWCO 30,000) を用いて 2 mlまで濃縮し、これをbuffer Aであらかじめ平衡化したHiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare) で素通りさせて精製サンプルとした。組換えタンパク質の精製度は 12 % SDS-PAGEにより確認し、タンパク質濃度はprotein assay kit (BioRad-Japan) を用いて測定した。

結果

Ni²⁺-NTAカラムを用いた精製の結果、250 mMのimidazoleを含むbuffer Aの溶出画分に、37 kDaのCotB2 組換えタンパク質が精製できたことが、SDS-PAGEにより確認された(図 2-2-2)。また、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いた分子量測定から、CotB2 は分子量 78 kDaと決定され(図 4-1-2)、CotB2 はhomodimerを形成していることが明らかとなった。0.5 リットルの培養液から、CotB2 の精製サンプルが 270 mg得られた。



molecular	oligomeric
weight (kDa)	state

78.4 homodimer

図 4-1-1 . ゲルろ過の結果

第二項 CotB2 の Se-Met 置換体の発現と精製

実験方法

Se-Met置換体タンパク質の発現は大腸菌のMet要求株であるB834 (DE3)を宿主として行った。pHCotB2 で形質転換したB834 (DE3)のコロニーを 50 µg/ml kanamycinを含むLB培地に植菌し、37 °Cで 12 時間程度振とう培養をおこなった。この培養液を 200 mlのLB培地の入った坂口フラスコに 1 %植菌し、37 °Cで OD₆₀₀が 1.5 程度になるまで振とう培養を行い、遠心分離により菌体を回収した。あらかじめオートクレーブ滅菌したSe-Met core培地 (Wako) で菌体の洗浄を行い、4.7 g Se-Met core培地、2 g D-glucose、50 mg MgSO₄·7H₂O、0.83 mg FeSO₄·7H₂O、5 mg seleno-L-methionine、1 x vitamine溶液(sigma)を含む 200 mlの培地の入った坂口フラスコに植菌し、再び 37 °CでOD₆₀₀が 1.5 程度になるまで振とう培養をおこなった。終濃度 0.1 mM となるようにIPTGを添加し、18 °Cにて約 20 時間振とう培養を行った。菌体の回収から精製までの過程は前項で述べたnativeタンパク質の調製と同様の方法で行った。

結果

Native タンパク質と同様に Se-Met 置換体の CotB2 組換えタンパク質が精製できたことが、SDS-PAGE により確認された (図 4-1-2)。また、ゲルろ過クロマトグラフィーにおける溶出堆積は native のものとほぼ同じであり、同じく homodimer 構造を有することが示唆された (図 4-1-3)。0.5 リットルの培養液から、Se-Met 置換された CotB2 精製タンパク質が 251 mg 得られた。

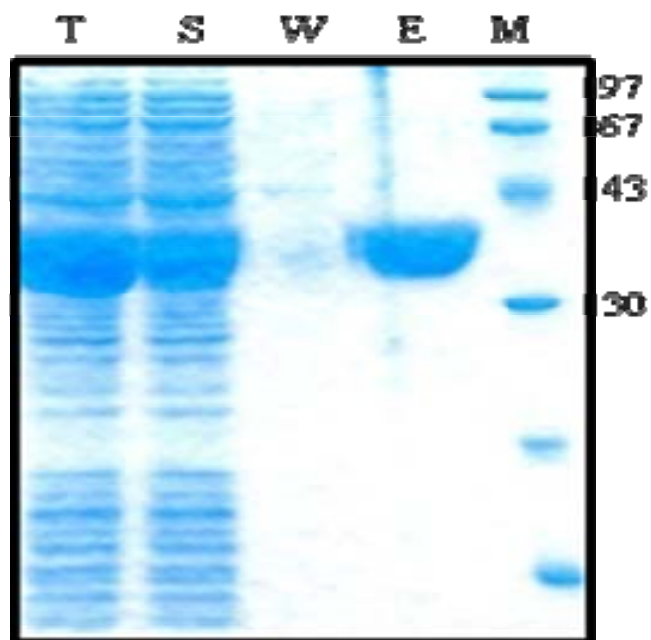


図 4-1-2-1. SDS-PAGE の結果

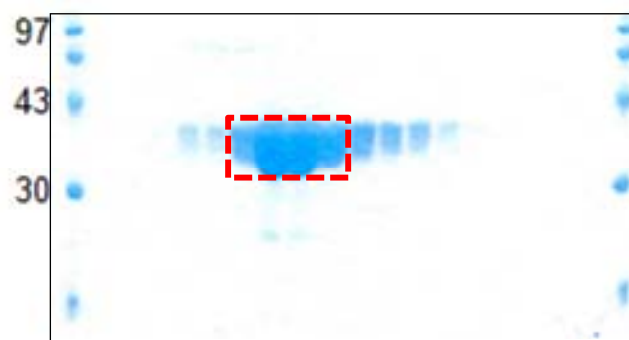


図 4-1-2-2 . ゲルろ過の結果

第二節 CotB2 の結晶構造解析

第一項 CotB2 の結晶化条件のスクリーニングと最適化

実験方法

精製した CotB2 を VIVASPIN 20 (MWCO 30,000)により濃縮した後、10 mg/ml に調製し、結晶化スクリーニングに用いた。結晶化は 20 °C における hanging drop 蒸気拡散法で行った。2 mM GGDP を添加・非添加条件の 2 条件で、Crystal Screen I, II 及び PEG/Ion Screen、Grid Screen-Ammonium Sulfate、PEG6000、MPD(Hampton Research)をリザーバー溶液として用いて結晶化条件のスクリーニングを行った。結晶化条件の最適化は、1.4-5 M ammonium formate、0.1 M HEPES-NaOH (pH 7.0-8.5)の条件で行った。

結果

結晶化条件の最適化は 0.1 M HEPES pH7.5 を緩衝液として使用し、沈殿剤として 2.0 M ammonium formate を用いて行った。2 mM GGDP 入りでも同じリザーバー溶液条件で結晶が得られた(図 4-2-1A)。native 結晶は、ドロップの作製から 40 日程度で、十分な大きさに成長した。また、Se-Met 置換した結晶化条件の最適化は 0.1 M Tris-HCl (pH8.0)を緩衝液として使用し、沈殿剤として 2.2 M ammonium formate の条件で最も大きな結晶が得られた(図 4-2-1B)。


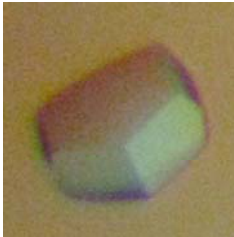
	Crystal	Protein solution	Reservoir solution
A		10 mg/ml cyclase 50 mM Tris-HCl (pH7.5) 100 mM NaCl 1 mM GGDP	0.1 M HEPES pH7.5 2.0 M Ammonium formate
B		10 mg/ml cyclase 50 mM Tris-HCl (pH7.5) 100 mM NaCl	0.1 M Tris-HCl pH8.0 2.2 M Ammonium formate

図 4-2-1. CotB2 の結晶. A, native; B, SeMet 置換

第二項 X線回折データ収集、構造決定

実験方法

X線回折データ収集の前に、結晶をクライオプロテクタントとして 30 % (v/v) glycerol を含むリザーバー溶液に移し、窒素ガスによって 95 K まで急速に冷やし、液体窒素の中で保存した。Native 結晶および Se-Met 置換体結晶の回折データは、つくば市の高エネルギー加速器研究機構 (KEK) の photon factory のビームライン NW12 および BL-6A でそれぞれ収集した。95 K の低温を保持しながら結晶を、ゴニオメーターにマウントした後、X線を照射すると、分解能 4-6 Å 程度の反射が得られたため、flash annealing [30] [31] による分解能の向上を試みた。95 K のクライオストリームを 3 秒程度遮断することにより結晶を室温に戻した後、再びクライオストリームにより急冷する操作を 2-3 回行い、X線を照射することにより native 結晶と Se-Met 置換体結晶ともに 3 Å を超える分解能を得ることができた。データ測定における X線の波長は native 結晶については 1.000 Å で行った。Se-Met 置換体結晶は Se の XAFS を測定し、プログラム CHOOCH を用いて Peak 波長を 0.97908 Å と決定し、1 波長での回折データを測定した。index、integrate、scaling のデータ処理はプログラム HKL2000 [32] を用いて行い、結晶の空間群を $P6_522$ 、格子定数を $a = 105.6$ Å、 $c = 310.4$ Å と決定した。位相の決定、改良および初期構造構築は、SOLVE と RESOLVE [33] [34] を用いて行った。電子密度図を用いたモデルの修正にはプログラム Coot [35] を、構造精密化には CCP4 [36] の Refmac5.2 [37] を用いた。タンパク質分子中の結合長や結合角の妥当性、Ramachandron plot は PROCHECK [38] を用いて確認した。図は PyMOL [http://www.sourceforge.net] を用いて作製した。X線回折データ、位相決定、構造精密化の統計値は表 4-2-1 に示した。タンパク質の空洞の計算には VOIDOO [39] を用いた。

結果

Se-Met置換体結晶から得られた分解能 2.90 ÅのSeのPeak波長でのデータを用いて単波長異常分散(SAD)法で初期構造の決定に成功し、native結晶について、2.40 Å分解能、R-factor=19.2%、R_{free}=24.6%の最終構造を決定した。Ramachandran plotでは、favored regionに 97.7%、allowed regionに 2.3%のアミノ酸残基が含まれることを確認した。最終的な構造はasymmetric unitにCotB2のbiological unitに当たるhomodimer (A, B-chain)を含んでいた(図 4-2-2A)。A, B-chainについてそれぞれGly9-Asn292のモデルを構築した。また、サブユニット間領域にリザーバー溶液に含まれていたformate ionが2個存在していた。これらはそれぞれAまたはB-chainのArg175とイオン結合を、Arg210の主鎖カルボニルと水素結合を形成していた。また、383個の水分子が存在していた。A-chainとB-chainはroot mean square deviation (rmsd) = 0.3 Åで重ね合わさり、N末Gly9-Gln11がA,B-chain同士で異なるのを除いて、ほぼ同一の構造を有していたため(図 4-2-2B)、これ以降構造についての記述はA-chainについて行う。

構造はテルペンサイクラーゼファミリーに典型的な α -ヘリックスからなる構造を有していた。CotB2は13本の α -ヘリックス(α 1:Arg19-Val37, α 2:Val48-Leu65, α 3:Asp71-Ser84, α 4:Met93-Asp111, α 5:Phe119-Tyr133, α 6:Pro136-Arg157, α 7:Pro160-Thr168, α 8:Pro170-Ile181, α 9:Val183-Tyr194, α 10:Pro197-Thr205, α 11:Leu207-Leu231, α 12:Glu246-Ala269, α 13:Asn272-Thr290)から構成されていた(図 4-2-2C)。 α 6, α 7, α 8, α 10, α 11がA-chainとB-chainのインターフェースを形成しており、接触面積は3424 Å²で、homodimerの表面積(19450 Å²)の約18%であり、homodimer形成に十分なインターフェースを有しているといえる。

Dali [40]による類似構造の検索の結果、*Aspergillus terreus*のAristolochene synthase (以下AtAS) [41]と最も構造が似ていることがわかった(Z-score=18.5、rmsd=3.6 Å、PDB ID 2OA6、seq.id. 14%)。次いで、青チーズカビ*Penicillium roqueforti*のAristolochene synthase (Z-score=17.0、rmsd=3.4 Å、PDB ID 1DGP、seq.id. 15%) [42]、*Mentha spicata*の(4S)-limonene synthase (Z-score=16.3、rmsd=3.2 Å、PDB ID 2ONG、seq.id. 11%) [43]、*Fusarium sporotrichioides*のtrichodiene synthase (Z-score=16.2、rmsd=3.7 Å、PDB ID 2KIZ、seq.id. 12%) [44]、*Streptomyces* sp. UC5319のpentalenene synthase (Z-score=15.8、rmsd=3.3 Å、PDB ID 1HM7、seq.id. 13%) [45]

と似ていることがわかった。CotB2 において活性発現に重要であると予想された¹¹⁰DDMDモチーフと²²⁰NDFYSYDREモチーフは活性中心ポケットと予想される空洞の入り口の、それぞれ反対側に対になるように配置していた(図 4-2-3)。AtASの構造との重ね合わせから、この配置はAtASの相当モチーフの配置とよく似ていることがわかった。これらのモチーフを活性中心の入り口とした時、ポケットの空洞の大きさはAtASが 164 Å³なのに対して、CotB2 のものは 937 Å³と大きく広がっている。このことはAtASがC15 炭素鎖のFPPをCotB2 がC20 炭素鎖のGGDPを基質とすることを差し引いても、CotB2 の構造が大きく開いたopen formであることを示唆している。

表 4-2-1. X 線回折データ統計値

	Se-Met CotB2 Peak	Native CotB2
Data collection		
Wavelength (Å)	0.97908	1.0000
Space group	<i>P</i> 6 ₅ 22	<i>P</i> 6 ₅ 22
Cell dimensions		
<i>a</i> (Å)	105.6	105.3
<i>b</i> (Å)	-	-
<i>c</i> (Å)	310.4	309.7
Resolution (Å)	2.90 (2.90-3.00) ^a	2.40 (2.40-2.49) ^a
Total reflections	413779	684655
Unique reflections	23774	40918
Completeness (%)	100.0 (100.0) ^a	100.0 (100.0) ^a
Average <i>I</i> / σ (<i>I</i>)	21.0 (5.2) ^a	43.7 (5.1) ^a
<i>R</i> _{merge} (%) ^a	12.8 (56.8) ^a	7.6 (52.4) ^a
Phasing		
No. of Se sites	17	
FOM ^c	0.30 (0.60) ^c	
Refinement		
Resolution (Å)		40.12-2.40
<i>R</i> -factor/ <i>R</i> _{free} (%)		19.4/24.6
No. of protein atoms		4644
No. of formate		2
No. of water molecules		383
Average B-factor (Å ²)		
Protein		42.9
formate		58.5
Water		60.8
R.m.s.d. from ideal values		
Bond length (Å)		0.014
Bond angles (deg.)		1.5
Ramachandran plot (%)		
Favored		97.7
Allowed		2.3
Disallowed		0

^a Highest resolution range for compiling statistics.
^b $R_{\text{merge}} = \frac{\sum \sum |I_i - \langle I \rangle|}{\sum \langle I \rangle}$
^c Calculated using a test data set: 5% of total data selected randomly from observed reflections.

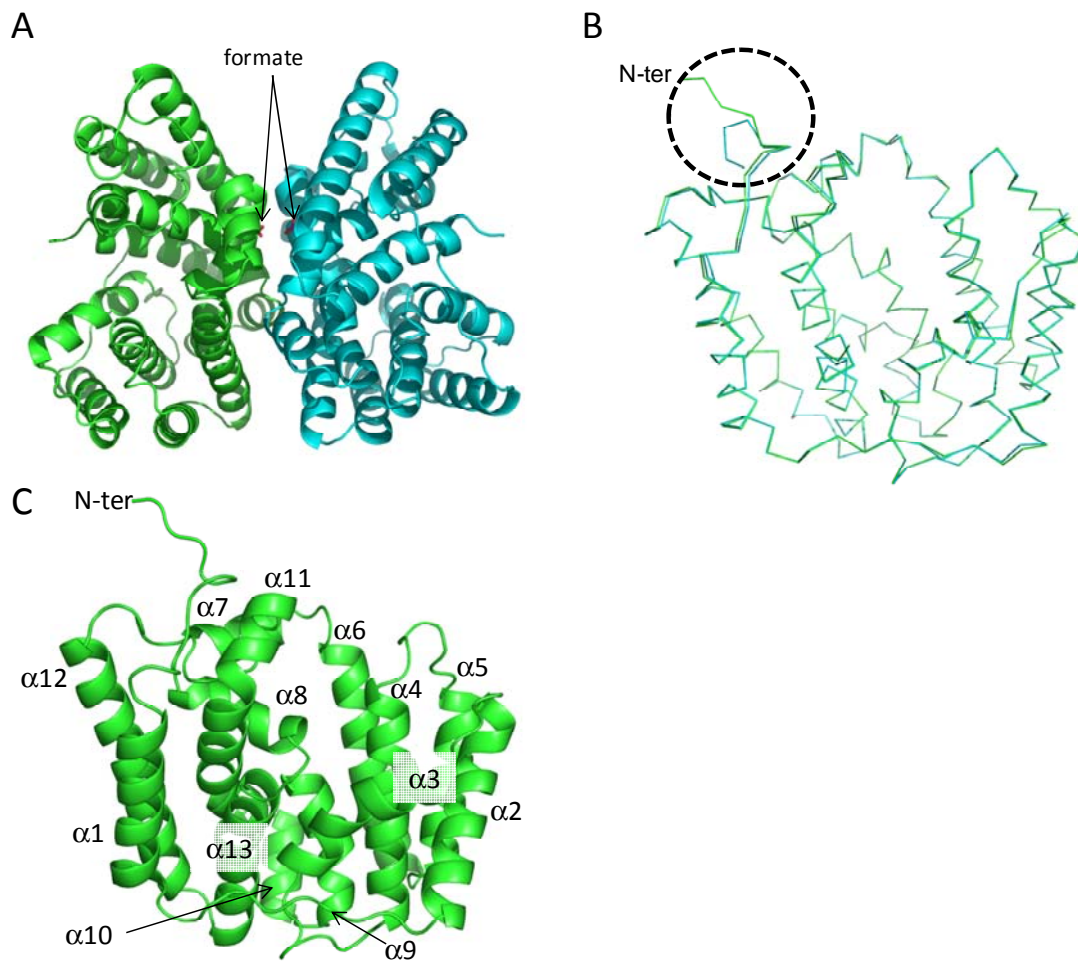


図 4-2-2. A, CotB2 homodimer 構造、B, A-chain と B-chain の重ね合わせ、
C, 二次構造の表記

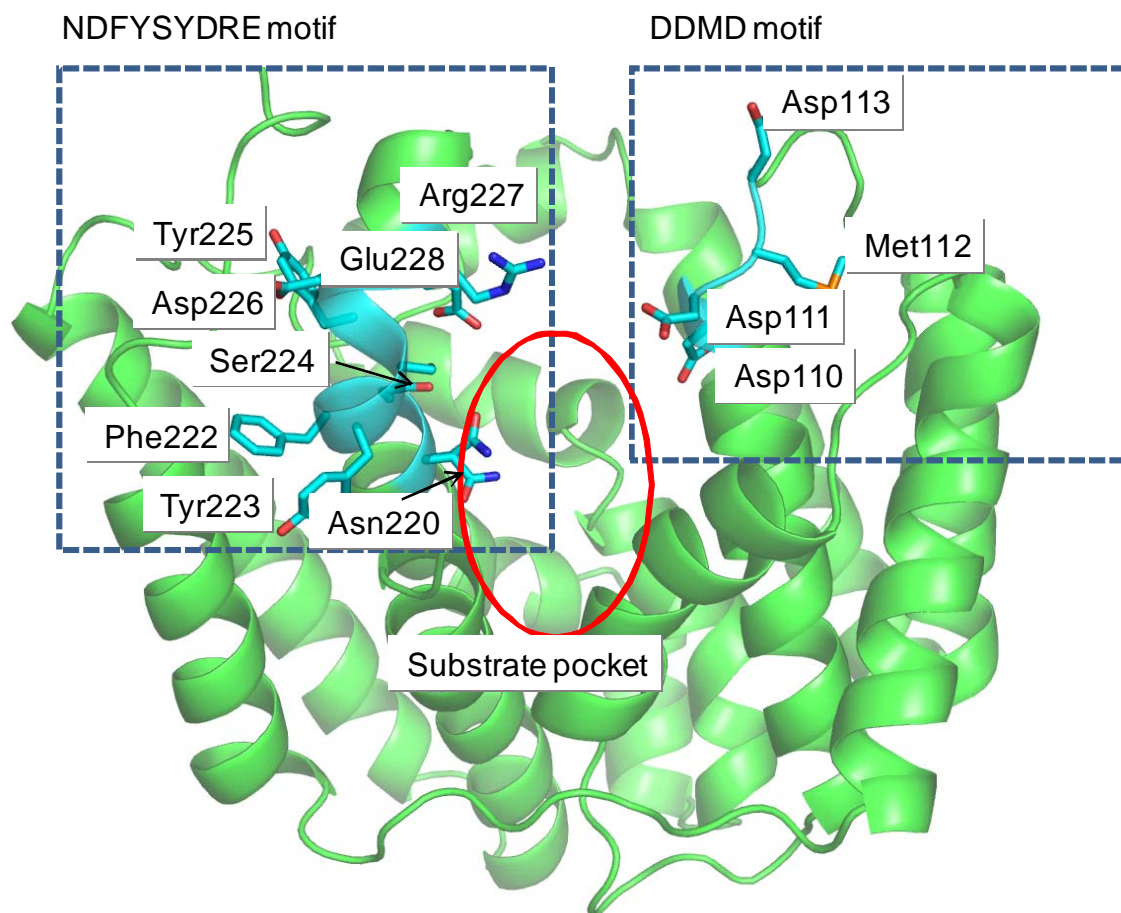


図 4-2-3. CotB2 の DDMD モチーフと NDFYSYDRE モチーフの配置
 CotB2 monomer を示した。DDMD モチーフと NDFYSYDRE モチーフを blue square で囲い、blue stick で示した。基質ポケットを red circle で示した。

第三節 考察

CotB2 の結晶構造は、図 4-2-2Aに示すように、 α -helixのみから構成される homodimer構造であった。GGDPの環化を行うジテルペン環化酵素の結晶構造として初めての構造決定である。この構造から既知のテルペン環化酵素で保存されている¹¹⁰DDMDモチーフと²²⁰NDFYSYDREモチーフが基質結合ポケットを構築することが明らかとなった。今回決定したCotB2の結晶構造は基質(アナログ)を含まないアポ体であるため、直接反応機構の全容の解明には至らないが、最も構造の似ているAtASの基質アナログ複合体の構造との比較からCotB2の反応機構・基質認識機構の一部を推定することができる。

AtASについては以下のように推定されている[46]。AtASは、基質がない状態では基質ポケットの入り口が開いた構造(open form)をとっており、FPPと活性発現に必要な3つの Mg^{2+} イオンが、順次、活性中心に入る際の2番目の Mg^{2+} が入る時に大きな構造変化が生じ、閉じた構造(closed form)となり、引き続きcyclization cascadeが促進される機構で反応が進行する(図 4-3-1A)(19)。その際、基質ポケット入口付近にあるArg314とAsp91がイオン結合を形成し、closed formの形成が促進される。FPPのジリン酸基はArg314, Tyr315と結合した Mg^{2+} イオンA, Bと結合する。 Mg^{2+} イオンA, CはAsp90により、 Mg^{2+} イオンBはAsn219, Ser223により安定化される。Tyr315の働きによりionizationが起こり、カルボカチオンが形成される。このカルボカチオンはTyr67, Phe87, Trp308などの芳香環の π 電子により安定化されると考えられている。さらに、Asn305またはTyr67によりprotonationが起こり複合環形成が促進される。また、FPPのC15炭素鎖の認識には、Val63, Tyr67, Phe83, Leu86, Phe153, Leu183, Leu184, Leu187, Trp308のような基質ポケットの奥に存在する多数の疎水性、芳香族アミノ酸残基に加え、Gln157, Gly180が関わっている。

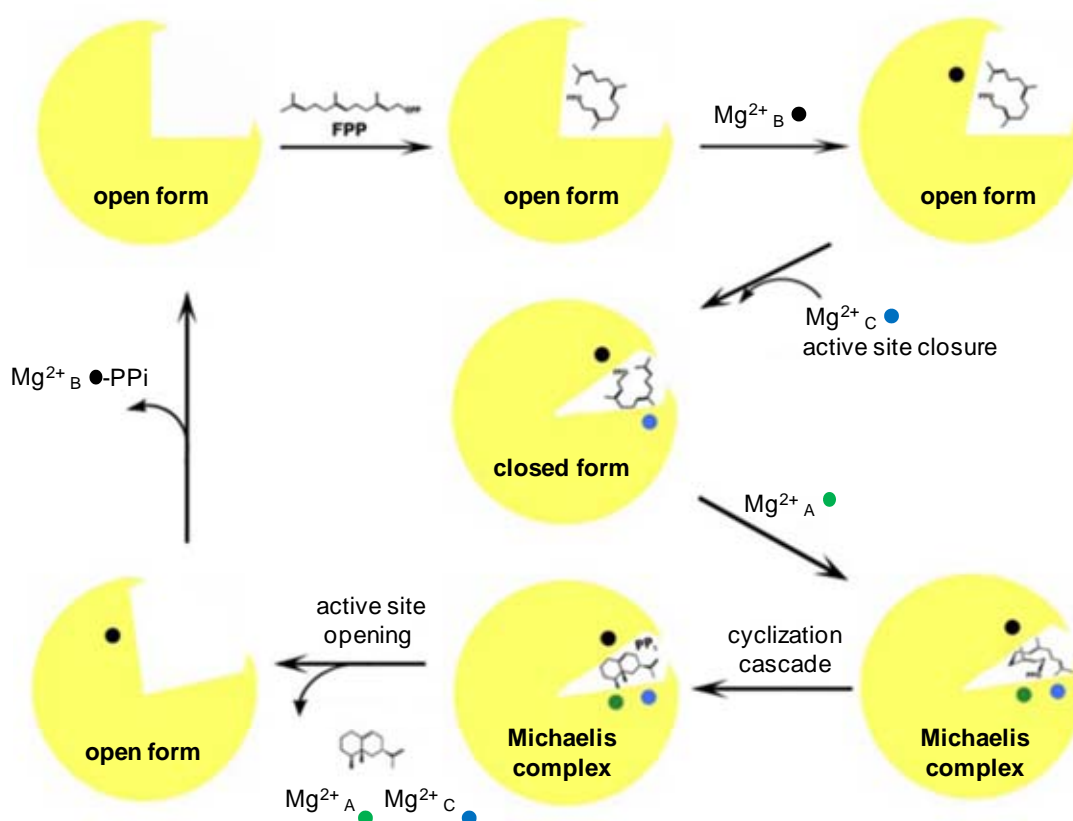
アミノ酸配列アラインメント(図 4-3-2)からCotB2はこれらのアミノ酸残基の多くが保存されていることが分かり、CotB2も類似の反応機構を有することが示唆される。¹¹⁰DDMDモチーフ内のAsp111はArg294とイオン結合の形成が予想されるが、今回の解明した構造ではC末端側がAsn292までしか見えないため、このような結合がみられず、基質ポケットは開いている。これと同時にdisorderしているTyr315は、Arg294がAsp91とイオン結合を形成する時に活性中心に入

り込み、GGDPのionizationに重要な役割を持つと考えられる(図 4-3-4)。また、Asp110 はAtASのAsp90 に相当し、 Mg^{2+} の結合に関わると考えられる。Met112 とAsp113 は活性中心から離れた位置にあるため、基質との直接の作用には関わらないと予想されるが、アミノ酸配列のアラインメントからCotB2 は他のテルペン環化酵素が5アミノ酸残基からなるDDXXDモチーフを持つのに比べ、1アミノ酸少ないIDDMDモチーフを有していることから、この違いはCotB2 の反応を特徴づけるような、例えば水酸化反応機構などに重要な役割を持っているのかもしれない。 $^{220}NDFYSYDRE$ モチーフ内のAsn220 はポケットの奥に存在し、3位のprotonationに関わる可能性が考えられる。Asp221, Phe222, Tyr223, Tyr225, Asp226, Arg227, Glu228 は活性中心ポケットには向いておらず、活性中心の構造の安定化に関わると考えられる。Asn220、Ser224 はそれぞれAtASのAsn219, Ser223 に相当し、 Mg^{2+} イオンBの結合に関わると考えられる。これらの Mg^{2+} はGGDPのジリン酸基とこれらアミノ酸残基との結合を仲介している。活性中心ポケットの深部はTyr77, Val80, Val81, Val99, Phe107, Phe149, Ile181, Val183, Phe185, Trp186, Met187, Met189, Leu216, Leu281, Trp288 のような多数の疎水性、芳香族アミノ酸に加え、Asn103, Thr106, Gly182, Asn285 により形成されており、これらがGGDPのC20 炭素鎖の認識に関わると考えられる。これらのアミノ酸残基のうちPhe107 とTrp288 (と、構造では見えていないがTyr295)の π 電子は、AtASのアナロジから、中間体のカルボカチオンの安定化に寄与しているのかもしれない。3位のprotonationのstepは、CotBでは活性中心ポケットに存在するAsn103 やAsn285 のような親水性アミノ酸残基が行うと予想される。また、7位の水酸化は、カルボカチオン中間体(図 4-3-4、6)と求核剤の水分子が反応することにより起こると予想されるが、このような水分子を活性中心内に適切に配置するためにAsn103 やAsn285 のような親水性残基が関与している可能性も考えられる。これらの考察は、CotB2 反応に必須のステップであるprotonationと水酸化には親水性残基が関与している可能性が高いにも関わらず、活性中心ポケットを構成するアミノ酸残基には疎水性アミノ酸と芳香族アミノ酸が多く、親水性残基はAsn103 とAsn285 に限定されることに基づくものである。

今回の構造は基質を含まない構造であるため、CotB2 の反応機構、基質認識に関する情報は断片的なものである。特に、ジテルペン環化酵素の中でも CotB2 のユニークな特徴である基質の水酸化機構についての手掛かりは全くなく、

ionization や protonation の前段階で trap されるような基質アナログとの複合体の結晶構造解析や部位特異的変異導入酵素の解析等により、水酸化機構も含めた cyclization cascade の反応機構、基質認識と特異的な環化産物の合成機構に関する興味深い知見が得られることが期待される。また、現在のところジテルペン環化酵素の改変による環化産物の構造多様性の創出の報告例はなく、今回明らかになった基質ポケット構成するアミノ酸残基を中心とした部位特異的（ランダム）変異導入などにより、環化産物の改変が期待される。

A



B

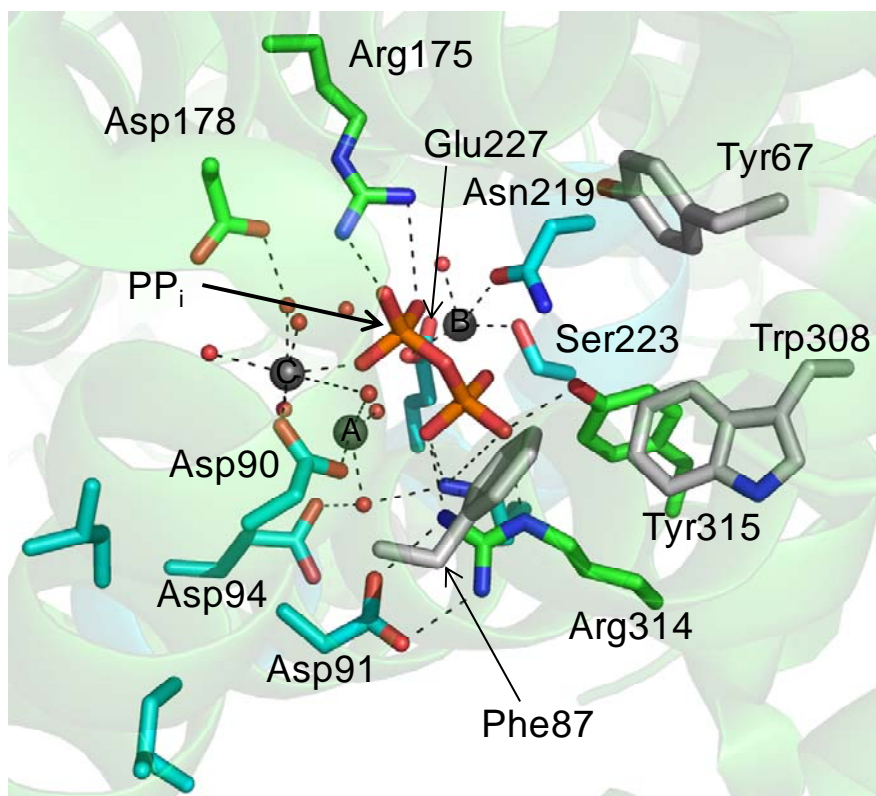


図 4-3-1. AtASの反応機構

A, AtASの金属結合、基質結合、構造変化のスキーム (文献 41 より引用)

B, AtAS-Mg²⁺₃・PPi複合体の構造

DDLLEモチーフ、NDIYSYEKEモチーフをblue stick、他のリン酸基の結合に関わるアミノ酸残基をgreen stick、カルボカチオン中間体の形成、安定化に関わると考えられている残基をgray stickで示した。

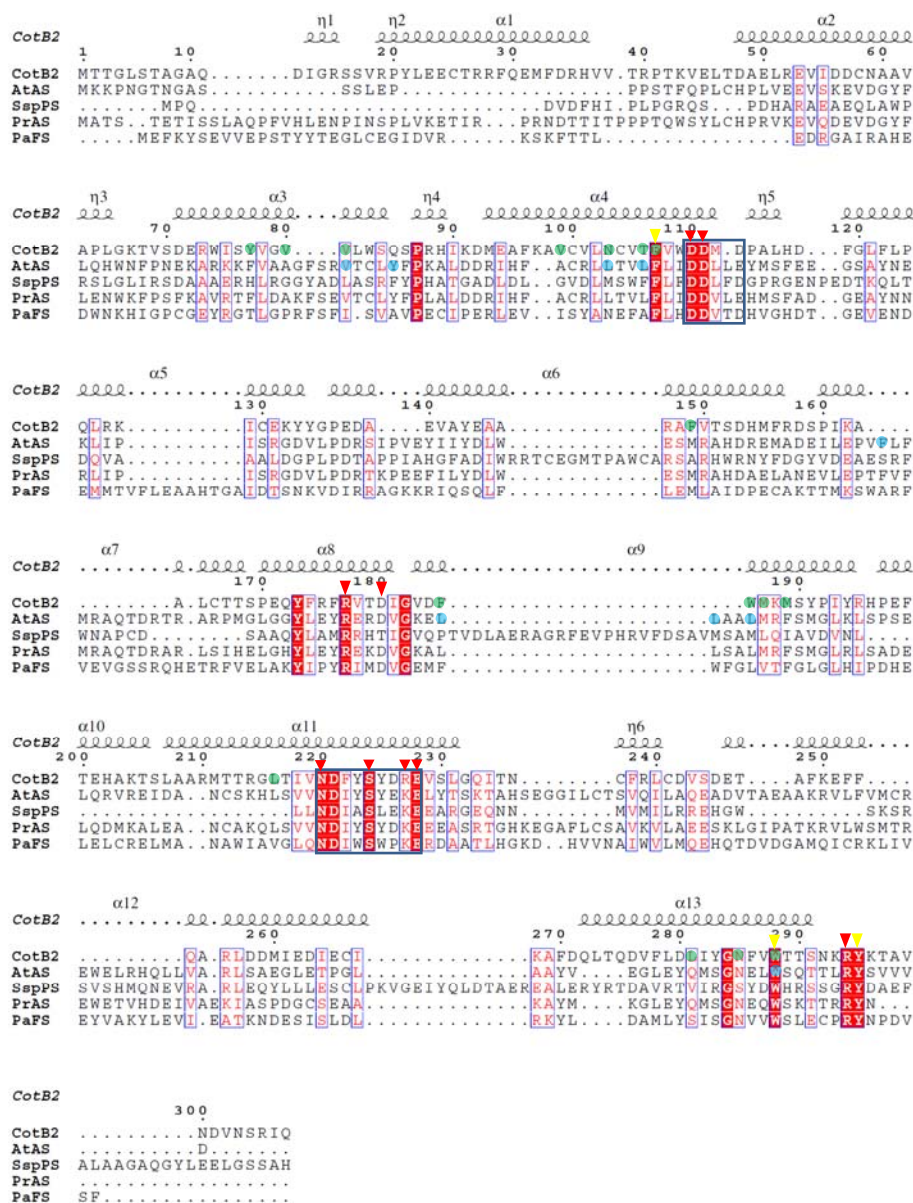


図 4-3-2. CotB2 とテルペン環化酵素とのアミノ酸配列アラインメント
保存されたモチーフを blue square で囲った。GGDP のジリン酸基の結合に関与するアミノ酸残基を red triangle、カルボカチオンの安定化に寄与すると考えられるアミノ酸残基を yellow triangle で示した。CotB2, AtAS においてそれぞれ C15, C20 炭素鎖を認識すると考えられるアミノ酸残基を blue または green の circle で囲った。

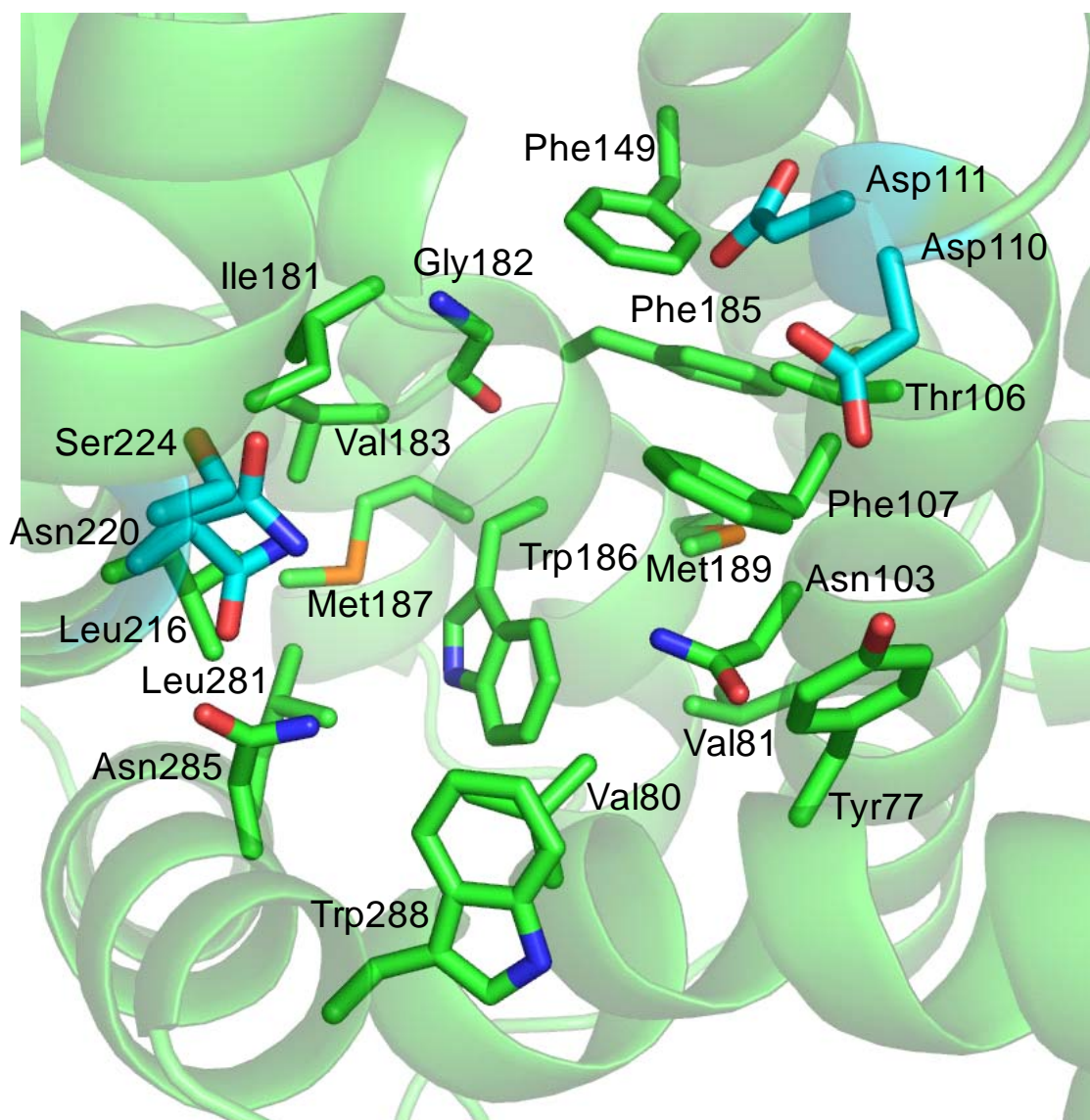


図 4-3-3. CotB2 の基質ポケット

基質ポケット内の残基を green stick で、DDMD モチーフ、
NDIYSYEKE モチーフの残基を blue stick で示した。

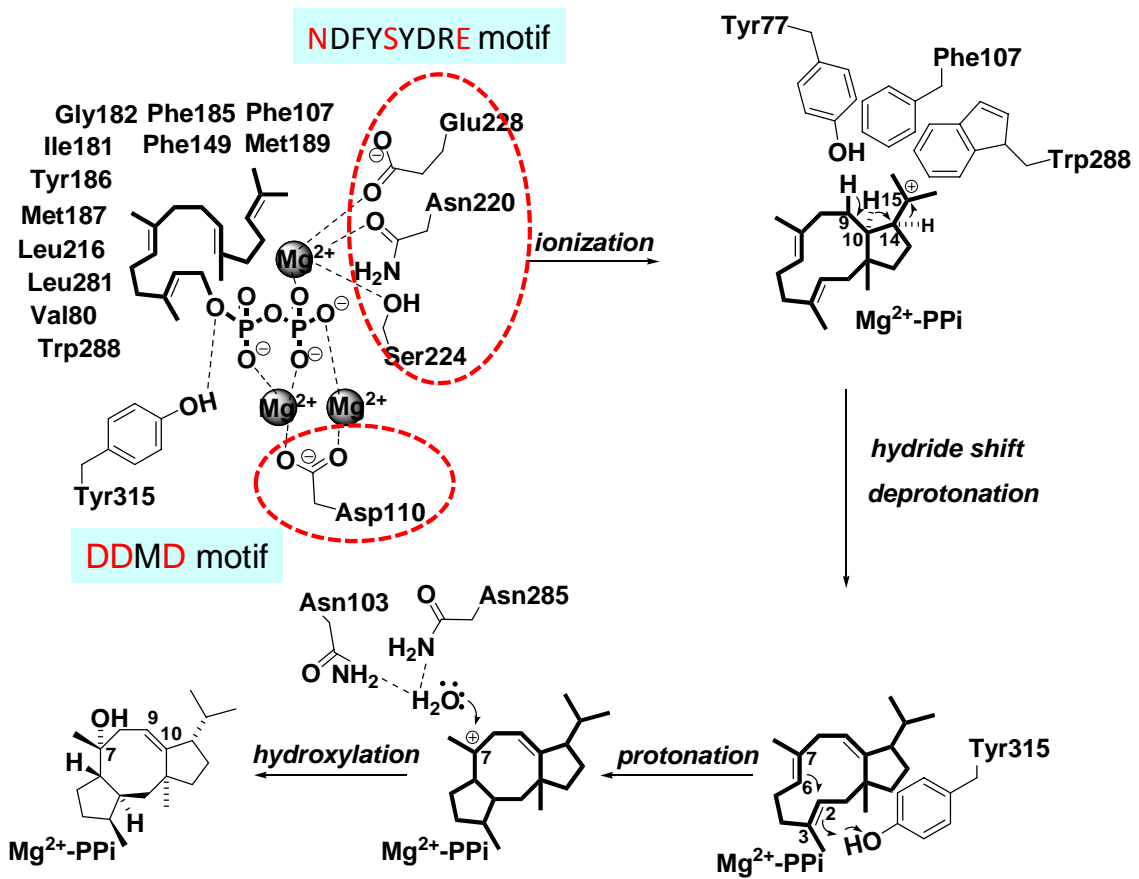


図 4-3-4. CotB2 の推定反応機構

総括

サイクロオクタチン (cyclooctatin)は、lysophospholipids (LysPL)の脂肪酸エステル結合を加水分解する lysophospholipase の阻害剤である。この阻害剤は、lysophospholipase を標的にした抗炎症剤のリード化合物の開発を目的としたスクリーニングの過程で、*Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2 から単離された、5-8-5 員環構造を有するジテルペン化合物である。サイクロオクタチンのような環状テルペノイドは、プレニル鎖長を決定するポリプレニルジリン酸合成酵素により生成した直鎖状ポリプレニルジリン酸がテルペン環化酵素によって環化されて炭素骨格が形成された後、酸化や還元等の化学修飾を受けて生合成される。このような生合成過程において、geranylgeranyl diphosphate (GGDP) 環化酵素のような環化酵素は、直鎖ポリプレニルジリン酸を構造多様な環状テルペノイド化合物へと変換するための鍵酵素である。

これまで、GGDP 環化酵素のほとんどが高等植物と真菌から単離され、解析されている。この酵素群の環化様式は、1) A 型、2) B 型、3) A-B 型、そして4) B-A 型に分類される。A 型反応は GGDP のジリン酸の ionization により、B 型反応は GGDP の末端二重結合の protonation によってそれぞれ環状化合物を生成する。A 型反応と B 型反応が複合して起こるのが A-B 型と B-A 型の反応であり、ionization と protonation の順番により、これら二つに分類される。これまでに原核生物由来の GGDP 合成酵素については、terpentecin を生産する *Kitasatospora griseola* 由来の terpedinol diphosphate synthase、viguiepinol を生産する *Streptomyces* sp. KO-3988 由来の ent-copalyl diphosphate synthase、そして *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv3377c 由来の 5,13-halimadiene diphosphate synthase についてのみ報告されている。これら三つの GGDP 環化酵素はいずれも B 型の様式で環化反応を触媒する。最近、植物病原性真菌である *Phomopsis amygdali* から A-B 型の fusicocca-2,10(14)-diene synthase (PaFS)が同定された。この PaFS は多機能酵素であり、N-末側の GGDP 環化酵素に続いて、C-末側に GGDP 合成酵素が融合している。fusicocca-2,10(14)-diene とサイクロオクタチンの構造類似性から、fusicocca-2,10(14)-diene がサイクロオクタチンの重要な中間体であり、PaFS のような多機能酵素がサイクロオクタチン生合成経路に関与すると予想されたが、サイクロオクタチンの生合成経路に関する情報はまったくなかつ

た。

本研究では、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 からのサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターのクローニング、および生合成遺伝子クラスターの機能解析、特に環化酵素の同定と環化反応機構の解明を中心としたサイクロオクタチン生合成経路の全容解明を目的とした。また、ジテルペン環化酵素としては初めての結晶構造解明も目的として研究を行った。

第一章 サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターの同定

第一章では、サイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターのクローニングを行った。

サイクロオクタチンはC₂₀からなるGGDPを共通の生合成中間体とするジテルペン化合物である。そのため、その生合成遺伝子はGGDP合成酵素遺伝子とクラスターを形成していると考えた。そこで、ポリプレニルジリン酸合成酵素の保存配列から設計したPCRプライマーを用いて、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2のゲノムDNAからGGDP合成酵素遺伝子の部分配列のクローニングを行った。次いで、このGGDP合成酵素遺伝子をプローブにして、pOJ446を用いて構築したMI614-43F2株のコスミドライブラリーから、複数の陽性クローンを選抜した。陽性クローンについては、*S. albus*を用いて異種発現させ、サイクロオクタチンの生産を確認した後、シーケンス解析を行った。サイクロオクタチンの生産性を確認したコスミドpCOT9469には24個のORF (open reading frame)を含む34-kbpのDNA断片が挿入されていた。また、24個のORFの中にはGGDP合成酵素(ORF1)が確かに存在し、その近傍には機能未知タンパク質(ORF2)と2個のチトクロームP450(ORF3とORF4)遺伝子も存在した。ORF2はBLASTとFASTAによる検索ではホモログの存在が確認できないものの、PSI-BLASTを用いたドメイン検索の結果、ポリプレニルジリン酸-Mg²⁺結合配列を含む”Terpene cyclase”ドメインを持つことが判明し、ORF2がサイクロオクタチンの鍵酵素であるterpene cyclaseと推定した。

次にこれら4つのORFがサイクロオクタチン生合成の最小単位であることを確認するために、放線菌大腸菌シャトルベクターpSE101にORF1からORF4を含むDNA断片を挿入したプラスミドpCOT104を構築し、*S. albus*を導入した。その結果、*S. albus*形質転換体の培養液中にサイクロオクタチンの生産が確認された。以上の結果からORF1-4がサイクロオクタチン生合成の最小単位と結論し、これらのORFをCotB1-4 (cyclooctatin biosynthesis)と命名した。

第二章 サイクロオクタチンの骨格形成に関わる酵素の機能解析

第二章では、GGDP 合成酵素 CotB1 の機能解析と、テルペン環化酵素であると推定した CotB2 の機能解析を行った。

大腸菌で高発現させたヒスチジンタグ付き組換え酵素CotB2 は、SDS-PAGEとゲルろ過による分析の結果から、37 kDaのサブユニットからなるhomodimerであると推定した。精製酵素を用いたin vitro反応産物をGC-MSによって分析したところ、Mg²⁺依存的にGGDPが未知化合物 2 に変換されることが判明した。そこで、未知化合物 2 を silica gel chromatography により精製し、その精製物質のHR-ESI-MS、および各種NMRスペクトルを解析したところ、化合物 2 は 5-8-5員環構造を持つ新規なジテルペン化合物cycloocta-9-en-7-olであることが判明した。cycloocta-9-en-7-olの化学構造と、CotB2 の触媒する環化反応がMg²⁺依存的であることから、この環化反応を図 1 のように推定した。まず、GGDPのジリン酸部分の引き抜きによってカルボカチオン 4 が生成し、次いで、2 つの連続した1,2-hydrideシフトによって 9-10 位間の二重結合が形成され、中間体 5 が生成する。次に、5 の 3 位のprotonationによって 2 位と 6 位の間にC-C結合が形成されて、カルボカチオン 6 が生成する。最後に、6 は求核剤H₂Oと反応して、CotB2 反応産物であるcycloocta-9-en-7-olを生成する。

第三章 テルペン骨格の修飾に関わる酵素の機能解析

第三章では、ジテルペン骨格の修飾に関わるシトクローム P450 と推定される CotB3 と CotB4 の機能解析を行った。

第二章ではテルペン環化酵素 CotB2 が cycloocta-9-en-7-ol を生成することを明らかにしたことから、cycloocta-9-en-7-ol がサイクロオクタチンの生合成中間体であり、この化合物がチトクローム P450 である CotB3 と CotB4 による水酸化を受けることでサイクロオクタチンが生合成されると推定した。そこで、このことを明らかにするため、pCOT104 のデリベーションプラスミドを構築し、*S. albus* を用いた異種発現を試みた。

S. albus 形質転換体培養物の LC-MS 分析の結果、CotB1、CotB2、CotB3 を含む場合にのみ新たな未同定化合物 3 が検出された。そこで、3 を silica gel chromatography と HPLC を用いて精製し、さらなる構造解析を行った。

HR-ESI-MS および各種 NMR による分析の結果、化合物 3 は C-5 に水酸基を持つ新規なサイクロオクタチン中間体である cycloocta-9-en-5,7-diol であることが判明した。一方、CotB1 と CotB2 のみを含む場合と CotB1、CotB2、CotB4 を含む場合には、cycloocta-9-en-7-ol が蓄積した。また、*Pseudomonas putida* 由来の flavodoxin と flavodoxin reductase を組み込んだ P450 発現用ベクター pT7NS-camAB に CotB3 をクローニングして大腸菌を形質転換し、この組換え大腸菌を用いて cycloocta-9-en-7-ol の微生物変換を試みたところ、確かに、cycloocta-9-en-5,7-diol が生産された。これらの結果から、CotB3 が cycloocta-9-en-7-ol に水酸基を付加して cycloocta-9-en-5,7-diol を合成すること、次いで、CotB4 がさらに cycloocta-9-en-5,7-diol の 18 位に水酸基を付加してサイクロオクタチンを合成することが明らかになった。以上の結果からサイクロオクタチンの生合成経路を図 1 のように決定した。

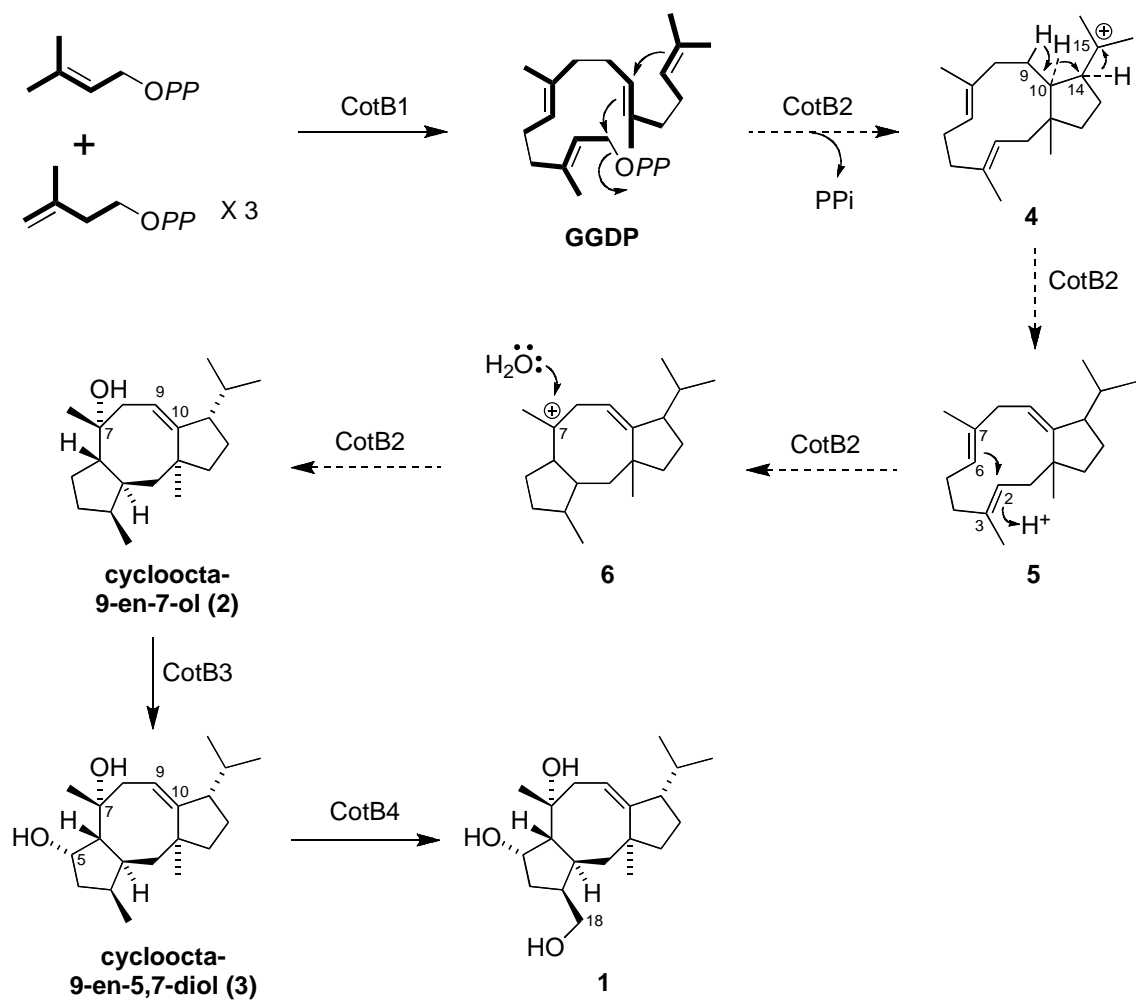


図1 . サイクロオクタチンの生合成経路

CotB1, GGDP 合成酵素; CotB2, GGDP 環化酵素; CotB3, P450; CotB4, P450.

-----> は CotB2 反応を示している。

第四章 テルペン環化酵素 (CotB2) の結晶構造解析

第四章では、ジテルペン環化酵素としては初めての結晶構造解析を行った。

(His)₆タグが融合したCotB2 を大腸菌B834(DE3)を用いて大量発現させて精製し、10 mg/mlまで濃縮して結晶化に用いた。結晶化スクリーニングの際には、1 mM GGDPを添加したサンプルも用意し、hanging drop蒸気拡散法による20°Cでのスクリーニングと結晶化条件の最適化を行ったところ、0.1 M Tris-HCl (pH8.0)、2.2 M ammonium formateの条件で良質の結晶が得られた。さらにSeMet置換体結晶を作製し、そのX線回折データから、結晶の空間群をP6₅22に、その格子定数を $a = b = 105.6 \text{ \AA}$ 、 $c = 310.4 \text{ \AA}$ と決定した。CotB2の結晶構造は、図2に示すように、 α -helixのみから構成されるhomodimer構造であった。また、既知のテルペン環化酵素で保存されているDDXDモチーフとNSEモチーフが基質結合ポケットを構築し、その基質結合ポケットはGGDP非結合型のopen formを形成していた。CotB2の結晶構造はジテルペン環化酵素としては初めて決定されたものである。

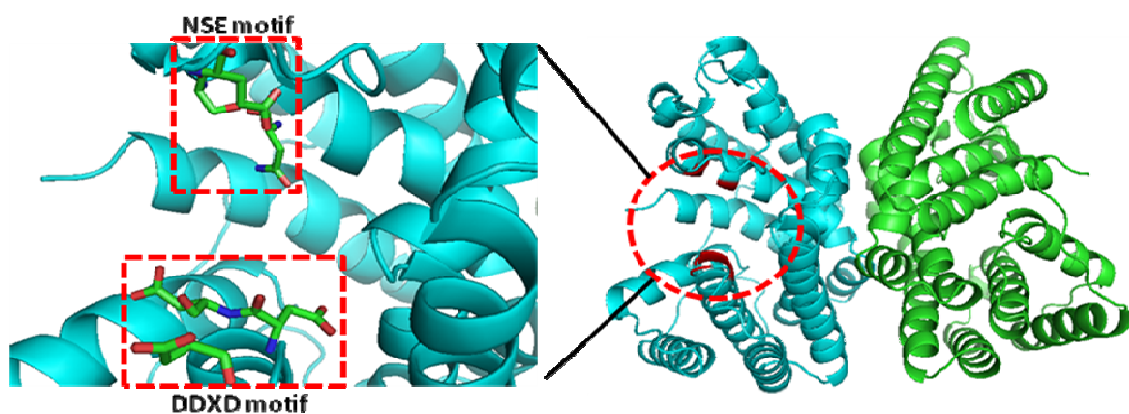


図2 . GGDP cyclase の全体構造と、DDXD モチーフと NSE モチーフ

以上、本研究では、*S. melanosporofaciens* MI614-43F2 由来のサイクロオクタチン生合成遺伝子クラスターのクローニングと *S. albus* での異種発現に成功し、サイクロオクタチン生合成経路の全容を解明した。サイクロオクタチン生合成遺

伝子クラスターは4つの遺伝子、*cotB1-4* からなり、その中に見出された CotB2 は、GGDP から cycloocta-9-en-7-ol を合成する新規なジテルペン環化酵素であった。続いて、二つのチトクローム P450 の機能解析を行い、CotB3 は cycloocta-9-en-7-ol の 5 位に水酸基を導入して cycloocta-9-en-5,7-diol を合成すること、次いで、CotB4 が cycloocta-9-en-5,7-diol の 18 位に水酸基を導入しサイクロオクタチンを合成することを明らかにした。さらには、ジテルペン環化酵素 CotB2 の結晶構造解析に成功し、A-B 型反応を行う同酵素の構造的基盤を明らかにした。今後は、基質や反応産物との共結晶を調製して解析することで、ジテルペン環化酵素による立体選択的な環化メカニズムの詳細が明らかになるものと考えている。さらには、本研究で解明されたジテルペン環化酵素の結晶構造を基盤にした酵素工学を利用して、生物活性を示す新規なジテルペン化合物が創製されることを期待している。

実験の部

表 1. 本研究に用いたコスミドとプラスミド

Cosmid and plasmid	Description	Reference or source
pOJ446	<i>Streptomyces-E. coli</i> shuttle cosmid; Apramycin ^r	Ref.
pSE101	<i>Streptomyces-E. coli</i> shuttle vector; Thiostrepton ^r , Amp ^r	Ref.
pETDuet-1	<i>E. coli</i> coexpression vector; Amp ^r	Novagen
pHis8	<i>E. coli</i> expression vector; Kanamycin ^r	Novagen
pT7Blue	<i>E. coli</i> cloning vector; Amp ^r	Novagen
pT7NS-camAB	<i>E. coli</i> expression vector of P450 by putidaredoxin reductase and putidaredoxin; Amp ^r	Mercian
pCOT9469	pOJ446 with a 41-kb <i>Sau3AI-Sau3AI</i> fragment from the M1614-43F2 genome DNA	This study
pCOT104	pSE101 with the 4.8-kb DNA fragment containing ORF1-4 (accession no. AB448947)	This study
pCOT103	pSE101 with the 3.4-kb DNA fragment containing ORF1-3	This study
pCOT105Δ	pCOT104 with a deletion of the 0.7-kb <i>PflMI-PflMI</i> fragment located in ORF3	This study
pCOT102	pSE101 with the 2.0-kb DNA fragment containing ORF1-2	This study
pDCotB1	pETDuet-1 with the 1.1-kb DNA fragment containing CotB1	This study
pHCotB2	pHis8 with 0.98-kb DNA fragment containing CotB2	This study
pDCotB1-2	pETDuet-1 with 2.0-kb DNA fragment containing CotB1 and CotB2	This study
pCotB3-camAB	pT7NS-camAB with 1.3-kb DNA fragment containing CotB3	This study
pCotB4-camAB	pT7NS-camAB with 1.3-kb DNA fragment containing CotB4	This study

DNA 精製

Kit を用いて精製を行った際は以下のものを用いた。操作は説明書に従った。

ゲル抽出：QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)

プラスミド精製：QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)

DNA シーケンシング

プラスミドの挿入断片の塩基配列は、Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit (GE Healthcare)を用いて反応を行い、DNA sequencer model 4000L (Licor)を用いて解析した。

コスミドクローン pCOT9469 の挿入断片の塩基配列は、Genotech Inc. (Korea)に依頼し、ショットガン法で解析した。

Cosmid library の構築

DNA のライゲーション溶液をエタノール沈殿し、1~4 μ l TE Buffer 中に DNA が 0.1~1.0 μ g になるよう溶かした。Gigapack III XL packaging extract kit を氷上で溶かし、1.0 g の DNA を加え、軽く混ぜてフラッシングした。室温で 2 時間反応させた後、SM Buffer 500 μ l を加えて、そのうち 25 μ l を XL1-blue MRF'溶液 25 μ l と合わせた。室温で 30 分間放置した後、200 μ l の LB を加えて 30℃ で 2 時間培養した。この際、約 15 分おきに培養液を転倒攪拌した。そして遠心した菌体を 50 μ l の LB に再懸濁し、LB 寒天培地 (apr 50 μ g/ml を添加)にプレーティングして 30℃ にて 36 時間培養した。

XL1-blue MRF'溶液は次のようにして調製した。大腸菌 XL1-blue MRF'株を LB 培地 (10 mM $MgSO_4$, 0.2 % Maltose)5 ml に植菌し、37℃ にて OD_{600} が 1.0 を超えないように培養した(4~6 時間)。培養液を 500 \times g、10 分間遠心して集菌し、2.5 ml の 10 mM $MgSO_4$ に静かに懸濁した。

アルカリ法による cosmid の抽出

大腸菌の培養液を 5000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てた。菌体に Sol I を 300 μ l 加え、混合した。Sol II を 300 μ l 加えて転倒攪拌によって混合し、氷上で 5 分間放置した。Sol III を 300 μ l 加えてよく混合し、氷上に 15 分以上置いた。13000 rpm, 4℃ にて 10 分間遠心後、上清を新しいエッペンに移した。560 μ l の 2-propanol を加え、よく攪拌した後に 13000 rpm で 10 分間遠心し、上清を新しいエッペンに移した。70 %エタノールで洗い、13000 rpm, 4℃ で 5 分間遠心し、真空ポンプにて乾燥させて RNase 入りの TE Buffer に溶かした。

Sol I : 50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl (pH8.0), 4 mg/ml Lysozyme

Sol II : 0.2 N NaOH, 1 % SDS

Sol III : 60 ml potassium acetate (5 M), 11.5 ml 氷酢酸, H_2O 28.5 ml

Colony hybridization / Southern hybridization

ハイブリダイゼーション反応には HYBRIDIZATION OVEN (IWAKI-ASAHI TECHNO GLASS) を使用した。コロニーの生えたプレートをクリーンベンチ内

で1時間乾燥させた。そしてHybond-N⁺ nylon membrane (GE)を密着させてコロニーを転写した。次いで変性溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl)を浸したる紙上に5分間、中和液 (0.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH7.5))に浸したる紙上に5分間、メンブレンを放置してその後風した。そして80℃で1時間乾熱することでDNAをメンブレンに固定した。

ハイブリダイゼーションはECL direct nucleic acid labeling and detection system (GE)を使用して行い、方法は付属の説明書に準拠した。検出には LAS-1000 (FUJIFILM)を使用し、5-30秒間の露光で行った。

放線菌からのゲノム DNA 抽出

Hopwoodらの方法に従って以下のように行った。

Salting out法

1. 終濃度 0.5 %でグリシンを添加した適当な培地で2日間培養
2. 集菌し培養液 30 ml に対して 5 ml となるように SET Buffer を加え懸濁
3. 終濃度 1.0 mg/ml となるように lysozyme を添加→30~60分 37℃で保温
4. Proteinase K および SDS 溶液をそれぞれ終濃度 0.5 mg/ml、1 %となるように添加→ときどき穏やかに攪拌しながら 55℃で2時間以上保温
5. 5 M NaCl を 2 ml 添加しよく混ぜる
6. 37℃程度に冷ましてからクロロホルムを 5ml 加え、30分間室温で穏やかに攪拌
7. 4,500 × g で室温で15分間遠心分離を行い、上清を新しい容器に移す
8. 0.6倍量のイソプロパノールを加えて転倒攪拌する
9. 沈殿してきた DNA を回収し 70 %EtOH で洗った後適当量の TE Buffer に溶解する。適宜 RNase 処理などを行い冷凍保存

CTAB法

1. Salting out 法と同様にして菌体を培養
2. 集菌し培養液 30 ml に対して 5 ml の TE25S buffer を加え懸濁する
3. 終濃度 2 mg/ml となるよう lysozyme を加える
4. 30~60分間 37℃で保温
5. Proteinase K を終濃度 0.18 mg/ml、10 % SDS を終濃度 0.5 %で加え穏や

- かにしっかりと攪拌して 55 °C で 1 時間以上保温 (ときどき攪拌する)
- 6 . 終濃度 0.8 M となるよう 5 M NaCl を加えよく攪拌する
 - 7 . 0.65 ml CTAB/NaCl を加えよく混ぜた後 55 °C で 10 分間保温
 - 8 . 37 °C に冷ましたあと 5 ml のクロロホルム/イソアミルアルコール (24:1) を加えて 30 分間穏やかに攪拌する
 - 9 . 13,500 × rpm で室温で 15 分間遠心分離を行い、上清を新しい容器に移す。
 - 10 . 以下 Salting out 法と同様

放線菌プロトプラスト作製

(50ml 培養した場合)

- 1 . 培養液を 10.3 % Scrose で 2 倍程度に希釈
- 2 . 遠心分離を行い集菌し、10.3 % Sucrose 30 ml に懸濁
- 3 . 遠心分離を行い集菌し、P Buffer に 0.5 % KH_2PO_4 、3.68 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5.73 % TES Buffer (pH 7.2) を加えたものを 10 ml 加えてよく混ぜる
- 4 . Lysozyme 20 mg を 10 ml の P buffer に溶かし、0.45 μm のフィルターでろ過滅菌しながら菌体に加える。30°C で 30 分インキュベート
- 5 . 綿せんをつめた漏斗でろ過する (菌糸とプロトプラストを分ける)
- 6 . 遠心分離を行ったのちピペットで上清を除き、20ml の P Buffer に懸濁
- 7 . 綿せんをつめた漏斗でろ過する
- 8 . 遠心分離を行い集菌し、P Buffer 300 μl に懸濁した後、100 μl ずつ分注

放線菌形質転換

- 1 . プロトプラストにコスミド を 4 μl 加える
- 2 . PEG 1g を P Buffer 3 ml に溶かし、そのうち 500 μl を加えて懸濁し、1 分間放置
- 3 . P Buffer を 5 ml 加える
- 4 . 遠心分離を行い集菌した後、プレート枚数に応じて適量の P Buffer に懸濁
- 5 . R2YE 寒天培地に植菌し 30 °C で 16 時間ほど培養
- 6 . 終濃度 20 $\mu\text{g/ml}$ となるように apr を重層し、30 °C で 3 日間培養
- 7 . 生育してきた放線菌コロニーを TSB 寒天培地 (終濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ apr) に植え継ぎ 30 °C で 3 日間培養

培地

Yeast-Starch agar (pH 7.3)

Yeast	2.0 g
Soluble starch	10.0 g
Agar	15.0 g/L

Production media (pH7.4)

Galctose	2 %
Dextrine	2 %
Glycerol	1 %
Soytone	1 %
Corn steep liq.	0.5 %
(NH ₄) ₂ So ₄	0.2 %
CaCo ₃	0.2 %

R2YE medium

sucrose	103 g
K ₂ So ₄	0.25 g
glucose	10 g
MgCl ₂	10.12 g
casamino acid	0.1 g
trace	2 ml
yeast	5 g
TES	5.73 g

-----/H₂O 850 ml

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

agar 22 g

● Trace element

ZnCl₂ 40 mg
FeCl₃.6H₂O 200 mg
CuCl₂.2H₂O 10 mg
MnCl₂.4H₂O 10 mg
NaB₄O₇.10H₂O 10 mg
(NH₄)₆MO₇O₂₄.4H₂O 10 mg

YEME

yeast 3 g
peptone 5 g
malt 3 g
glucose 10 g
sucrose 340 g
-----/1 L
20 % glycine 25 ml
2.5 M MgCl₂ 2 ml

Tryptone Soya Broth (pH 7.3)

Pancreatic digest of casein 17.0 g
Papaic digest of soybeen meal 3.0 g
Sodium chloride 5.0 g
Di-basic potassium phosphate 2.5 g
Glucose 2.5 g/L

LB 培地

Bacto-tryptone 10.0 g
Bacto-yeast extract 5.0 g

NaCl	5.0 g/L
------	---------

TB 培地

Bacto-tryptone	12.0 g
----------------	--------

Bacto-yeast extract	24.0 g
---------------------	--------

Glycerol	5.04 g
----------	--------

KH ₂ PO ₄	2.31 g
---------------------------------	--------

K ₂ HPO ₄	12.54 g/L
---------------------------------	-----------

試薬

P buffer

Sucrose	10.3 g
K ₂ SO ₄	0.025 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.202 g
Trace element solution	0.2 ml
Distilled water to	80 ml

KH ₂ PO ₄ (0.5 %)	1 ml
CaCl ₂ ·2H ₂ O (3.68 %)	10 ml
TES buffer (5.73 %, pH7.2)	10 ml

● Trace element

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	200 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	10 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10 mg
NaB ₄ O ₇ ·10H ₂ O	10 mg
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	10 mg

TES buffer

50 mM Tris-Cl (pH8.0)
10 mM EDTA
50 mM NaCl

SM buffer

Tris-HCl (1 M, pH7.5)	2 ml
Mg ₂ SO ₄ (1 M)	0.1 ml
NaCl (5 M)	2 ml
Gelatine	0.1 g

Distilled water to	100 ml
20 × SSC	
NaCl	17.532 g
Trisodium citrate	8.823 g
Distilled water to	100 ml
50 × TAE buffer for agarose (pH8.0)	
Tris (base)	2 M
EDTA	0.05 M
Denaturation solution	
NaCl	1.5 M
NaOH	0.5 M
Neutralizing solution (pH7.5)	
NaCl	1.5 M
Tris-HCl	0.5 M
Primary wash buffer	
Urea	6 M
SDS	0.4 %
20 × SSC	0.5 × SSC
Secondary wash buffer	
20 × SSC	100 ml/L
Lysis Buffer	
Wash Buffer	
Tween 20	

Wash Buffer

50 mM Tris-HCl (pH8.0)

100 mM NaCl

20 % (w/v) Glycerol

20 mM Imidazole (pH8.0)

miliQ water

Elution Buffer

50 mM Tris-HCl (pH8.0)

100 mM NaCl

20 % (w/v) Glycerol

250 mM Imidazole (pH8.0)

miliQ water

透析液

50 mM Tris-HCl (pH8.0)

0.1 M NaCl

10 mM 2-Mercaptoethanol

miliQ water

ゲルろ過クロマトグラフィー用 Buffer

50 mM Tris-HCl (pH8.0)

100 mM NaCl

HPLC

ポンプ	JASCO PU-2089 Plus
PDA	JASCO MD-2010 Plus
オートサンプラー	JASCO AS-2057 Plus
コントローラー	JASCO LC-Net II/ADC

GC-MS

Agilent 6890N GC-5973N mass selective detector system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA): InertCap 5MS/Sil capillary column (0.25 mm ϕ \times 30 m, GL Sciences, Tokyo), 80 °C (2 min)-180 °C (20 °C/min), 210 °C (2 °C/min), 280 °C (20 °C/min), 280 °C (3 min).

LC-MS

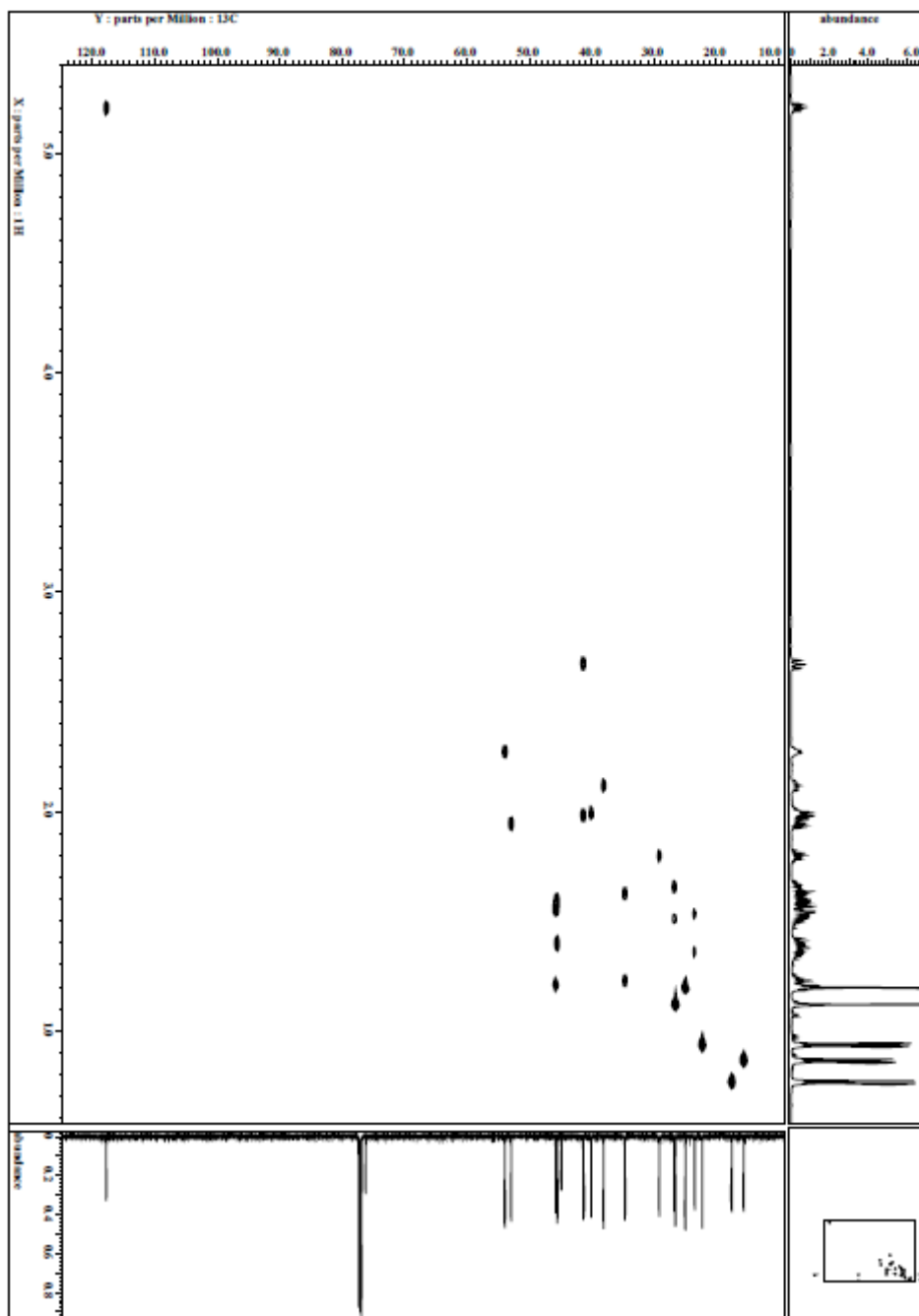
Thermo Fisher Accela high performance liquid chromatography system linked a Thermo Fisher Scientific LTQ Orbitrap mass spectrometer. A CAPCELL PAK C18 UG120 column (2.0 ϕ \times 150 mm, 5 μ m, column temperature at 40 °C, Shiseido, Tokyo) was used at a flow rate 0.2 ml/min with linear solvent gradient of 50-100 % acetonitrile in water (with 0.01 % trifluoroacetic acid) over a period 20 min.

NMR スペクトル

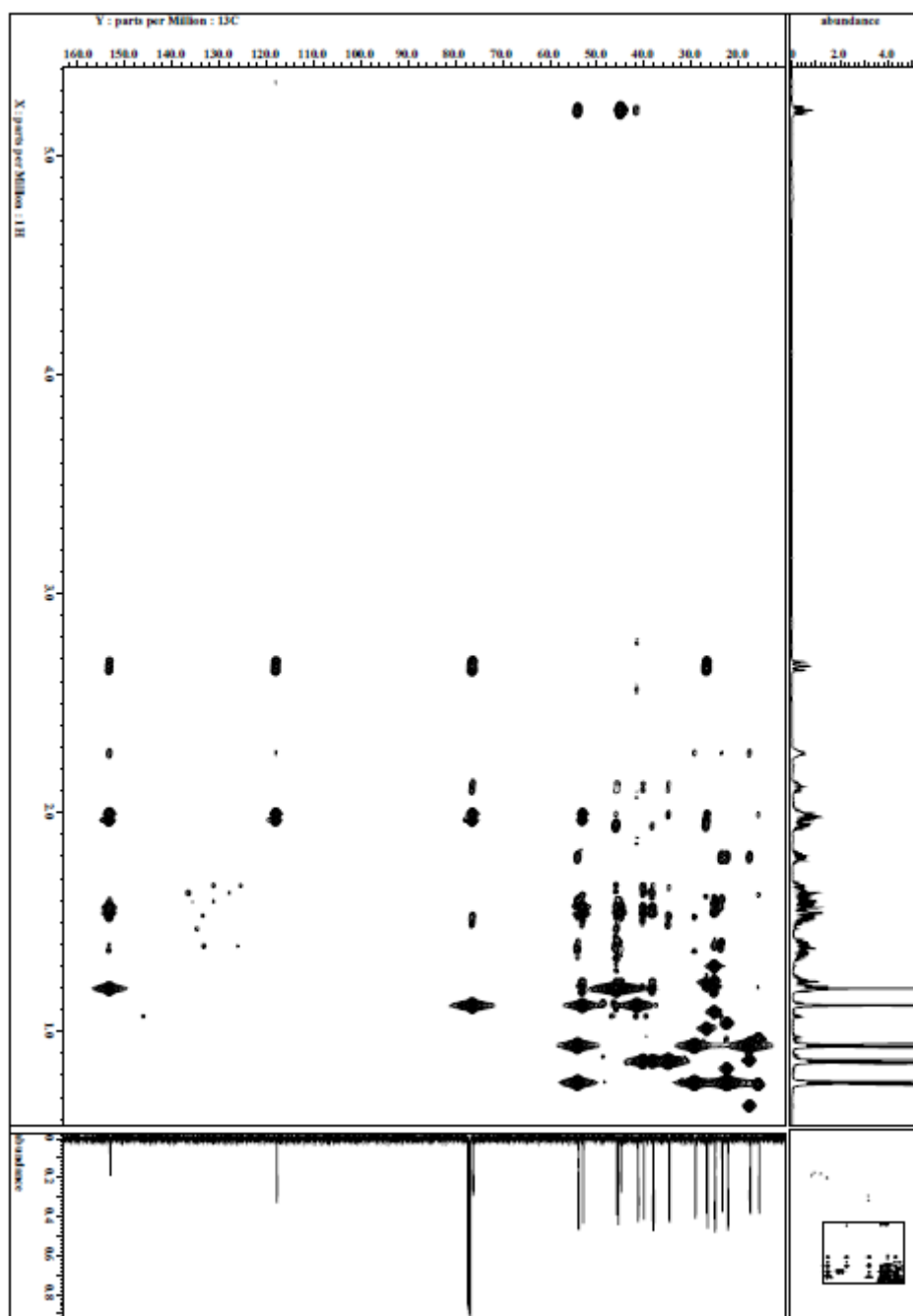
JEOL JNM-ECA 600

¹H NMR, 600 MHz

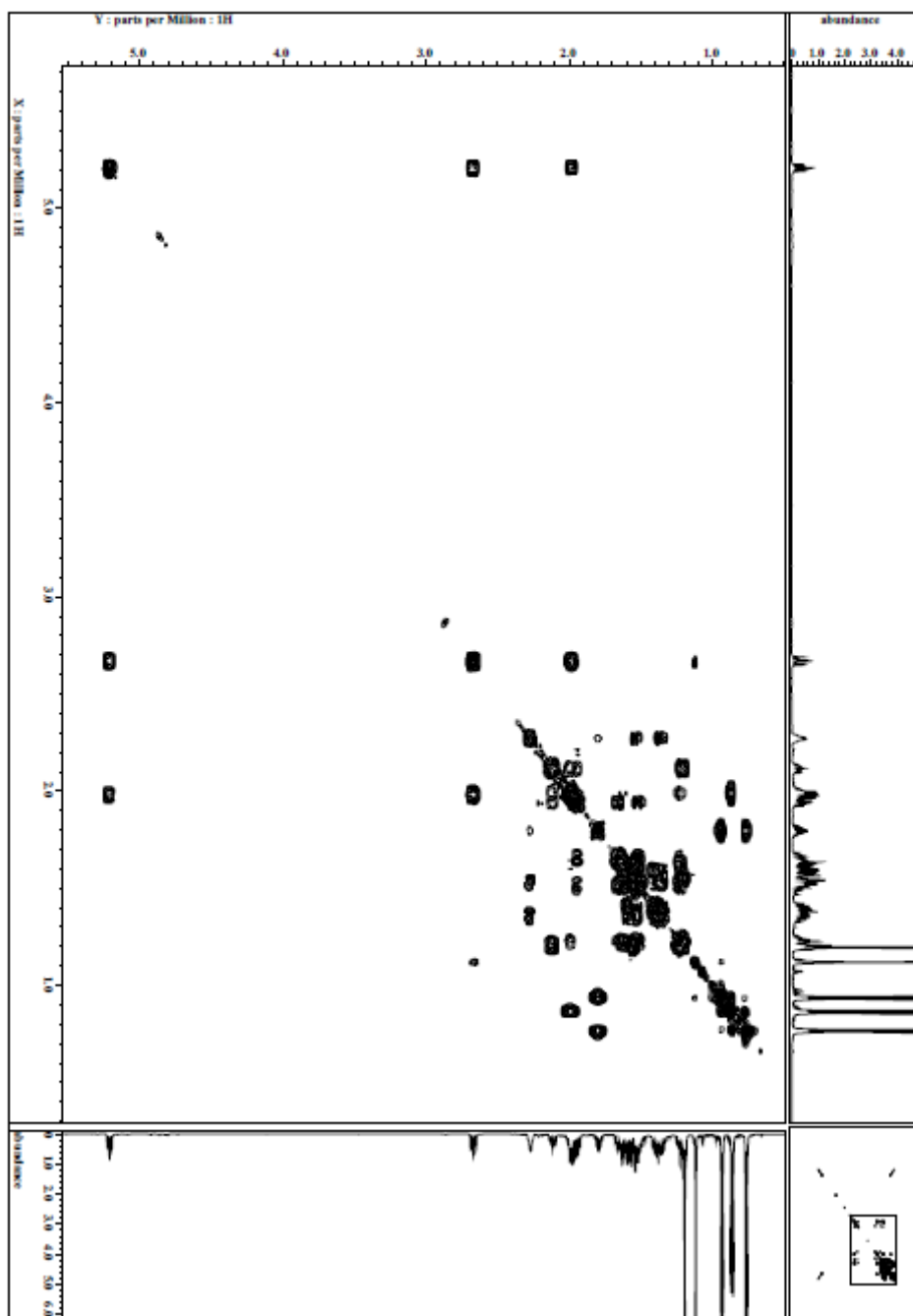
¹³C NMR, 150 MHz



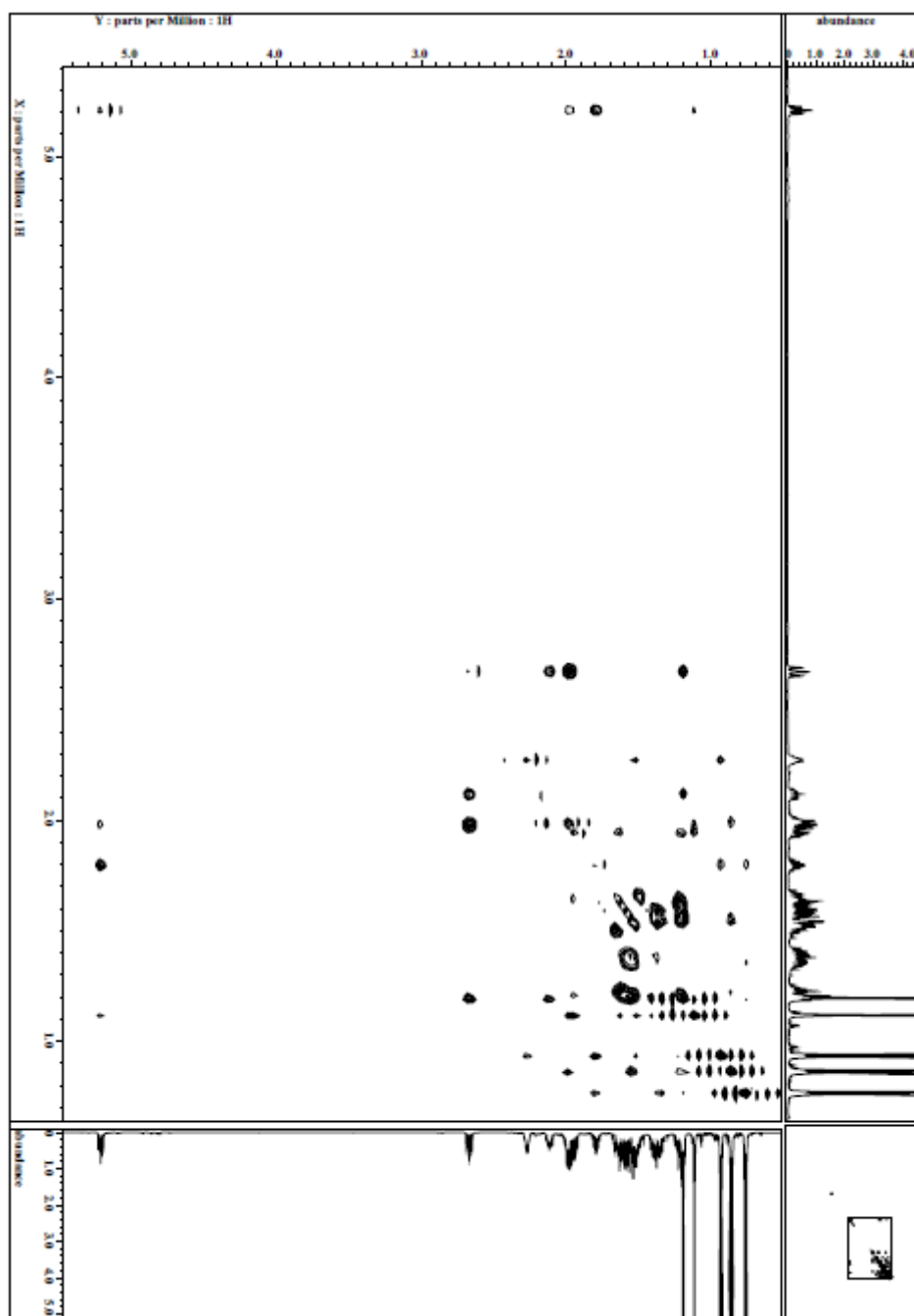
Cycloocta-9-en-7-ol の HSQC データ



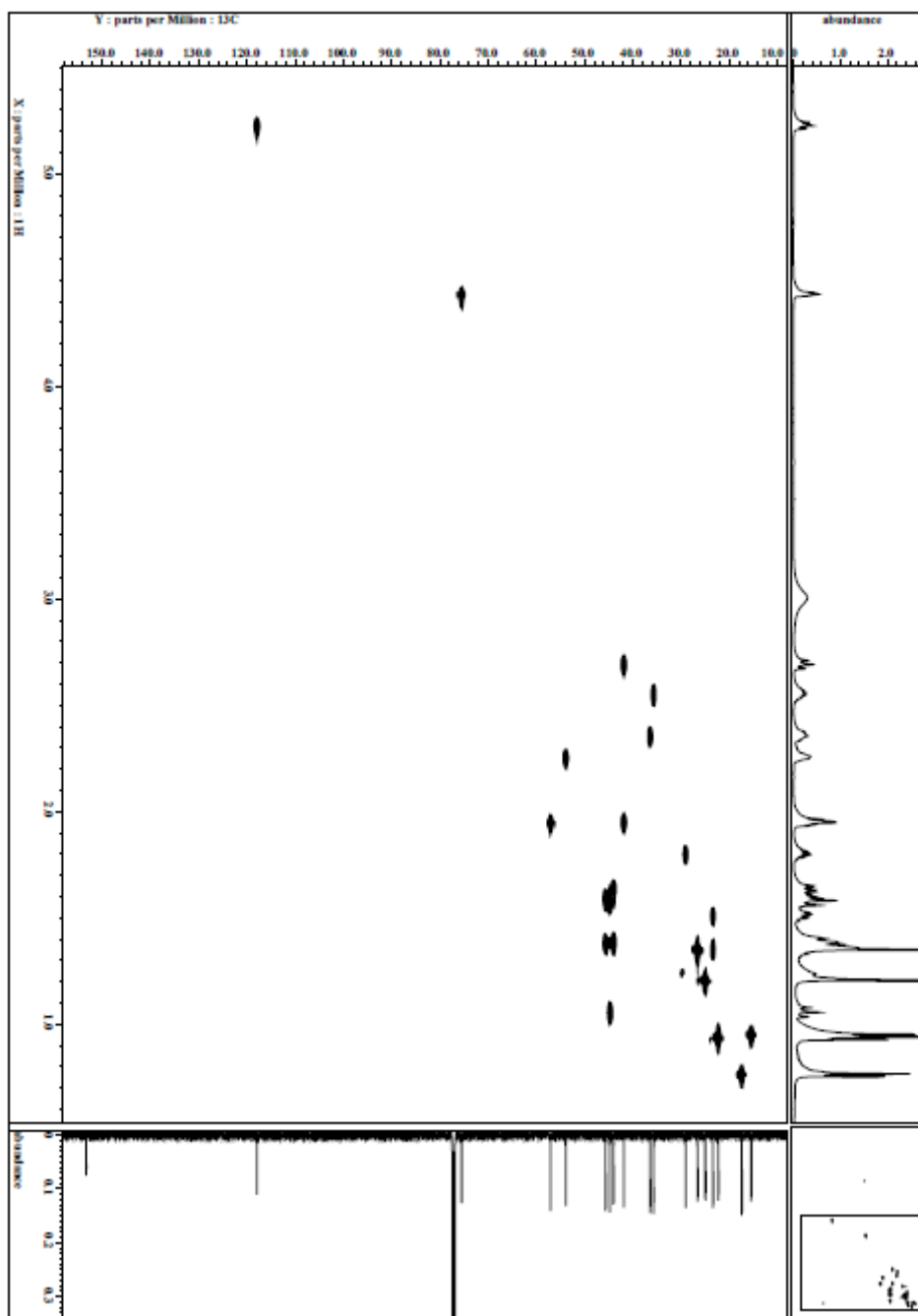
Cycloocta-9-en-7-ol の HMBC データ



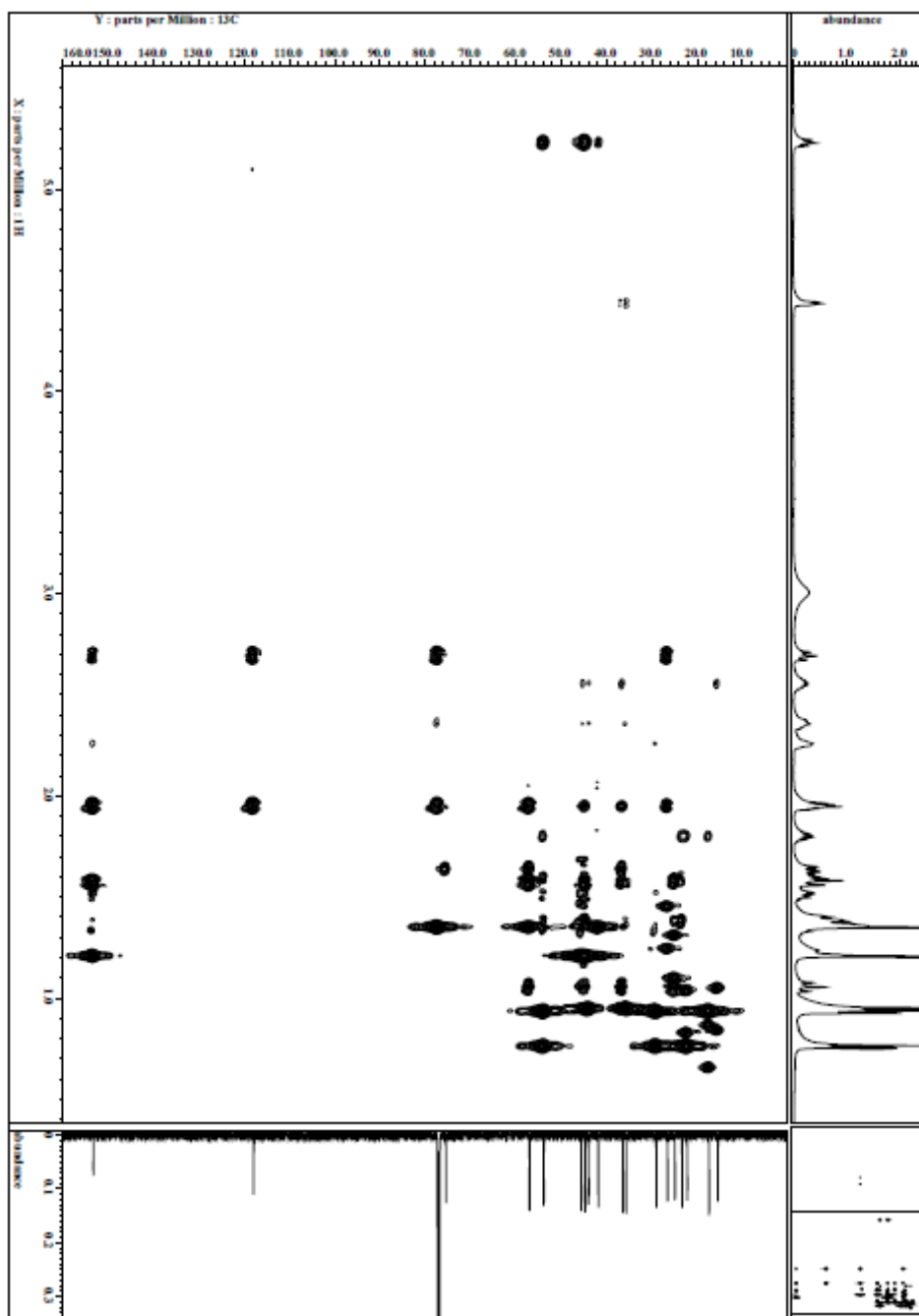
Cycloocta-9-en-7-ol の COSY データ



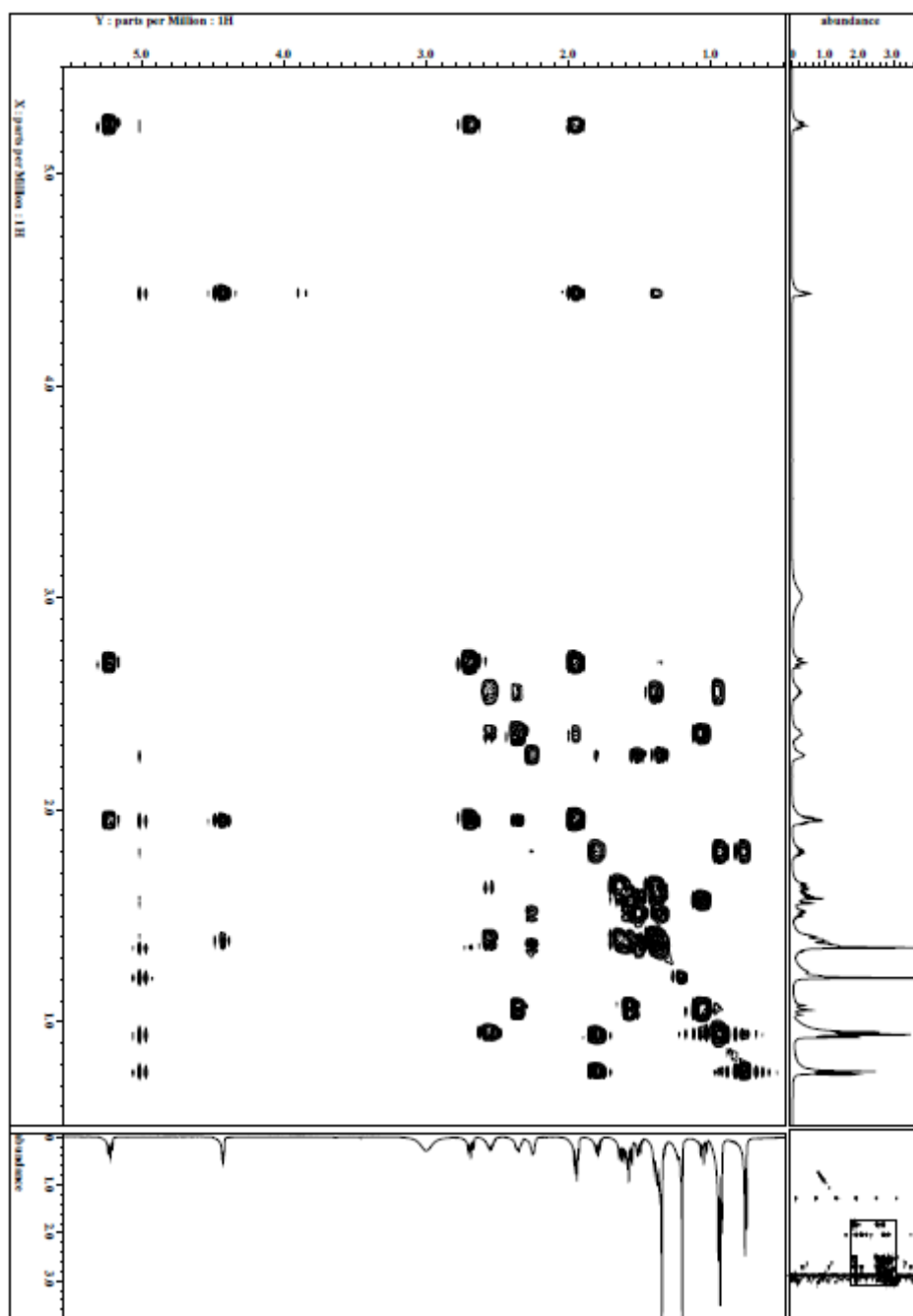
Cycloocta-9-en-7-ol の NOESY データ



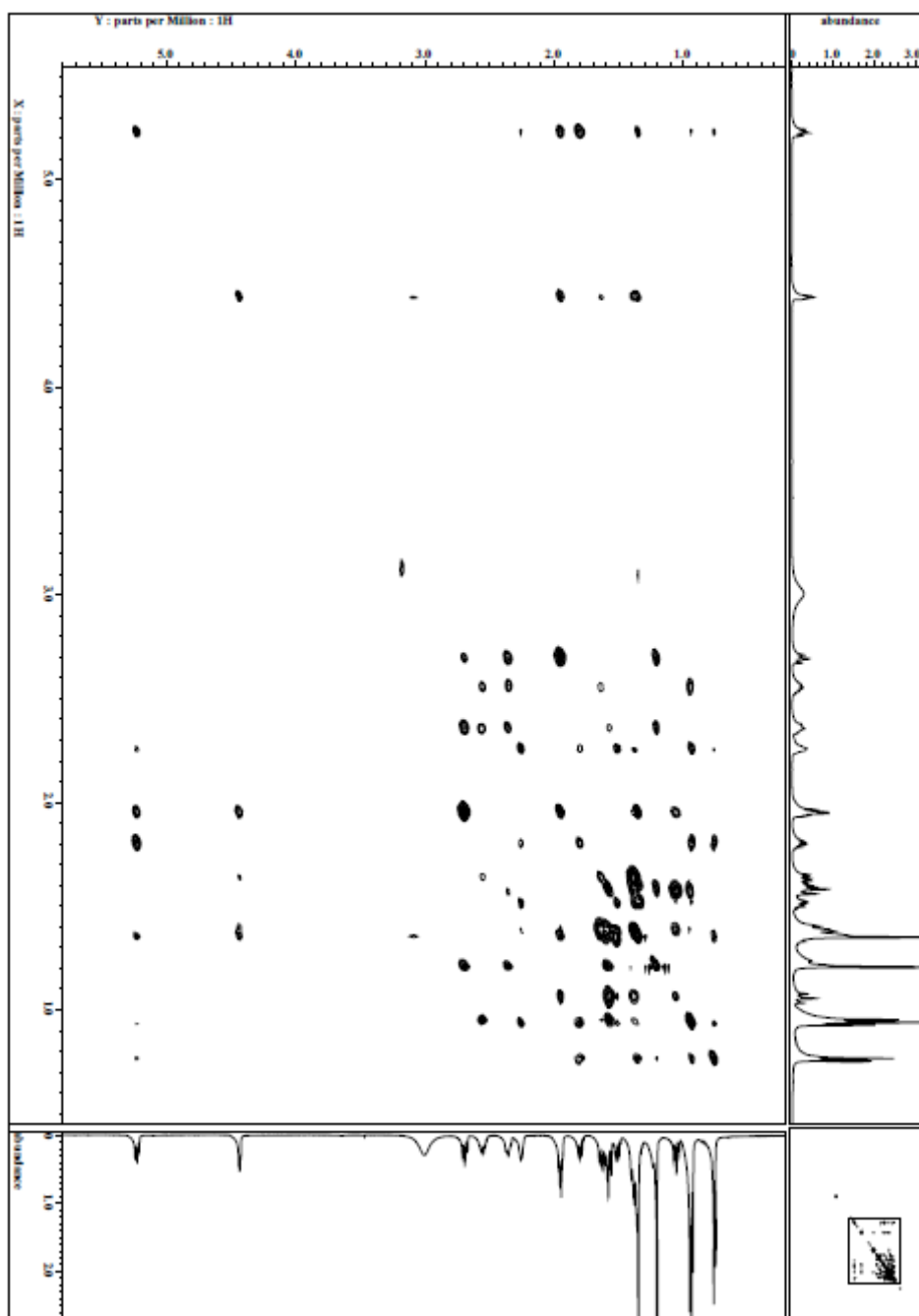
Cycloocta-9-en-5,7-diol の HSQC データ



Cycloocta-9-en-5,7-diol の HMBC データ



Cycloocta-9-en-5,7-diol の COSY データ



Cycloocta-9-en-5,7-diol の NOESY データ

参考文献

1. Sacchettini, J.C., and Poulter, C.D. (1997). Creating isoprenoid diversity. *Science* 277, 1788-1789.
2. Dimster-Denk, D., Rine, J., Phillips, J., Scherer, S., Cundiff, P., DeBord, K., Gilliland, D., Hickman, S., Jarvis, A., Tong, L., and Ashby, M. (1999). Comprehensive evaluation of isoprenoid biosynthesis regulation in *Saccharomyces cerevisiae* utilizing the Genome Reporter Matrix. *Journal of Lipid Research* 40, 850-860.
3. Kuzuyama, T. (2002). Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci Biotechnol Biochem* 66, 1619-1627.
4. Kuzuyama, T., and Seto, H. (2003). Diversity of the biosynthesis of the isoprene units. *Nat Prod Rep* 20, 171-183.
5. Pandian, S., Saengchjan, S., and Raman, T.S. (1981). An alternative pathway for the biosynthesis of isoprenoid compounds in bacteria. *Biochemical Journal* 196, 675-681.
6. Zhou, D., and White, R.H. (1991). Early steps of isoprenoid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical Journal* 273 (Pt 3), 627-634.
7. Seto, H. (1997). [Non-mevalonate pathway. A new pathway for the biosynthesis of isopentenyl diphosphate]. *Tanpakushitsu Kakusan Koso. Protein, Nucleic Acid, Enzyme* 42, 2590-2600.
8. Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., and Sahm, H. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* 295 (Pt 2), 517-524.
9. Lichtenthaler, H.K., Zeidler, J., Schwender, J., and Muller, C. (2000). The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. *Zeitschrift fur Naturforschung. Section C. Biosciences* 55, 305-313.
10. Lichtenthaler, H.K., Schwender, J., Disch, A., and Rohmer, M. (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a

- mevalonate-independent pathway. *FEBS Letters* 400, 271-274.
11. Jomaa, H., Wiesner, J., Sanderbrand, S., Altincicek, B., Weidemeyer, C., Hintz, M., Turbachova, I., Eberl, M., Zeidler, J., Lichtenthaler, H.K., Soldati, D., and Beck, E. (1999). Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science* 285, 1573-1576.
 12. Christianson, D.W. (2006). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chemical Reviews* 106, 3412-3442.
 13. Aoyagi, T., Aoyama, T., Kojima, F., Hattori, S., Honma, Y., Hamada, M., and Takeuchi, T. (1992). Cyclooctatin, a new inhibitor of lysophospholipase, produced by *Streptomyces melanosporofaciens* MI614-43F2. Taxonomy, production, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiot (Tokyo)* 45, 1587-1591.
 14. Aoyama, T., Naganawa, H., Muraoka, Y., Aoyagi, T., and Takeuchi, T. (1992). The structure of cyclooctatin, a new inhibitor of lysophospholipase. *J Antibiot (Tokyo)* 45, 1703-1704.
 15. Toyomasu, T. (2008). Recent advances regarding diterpene cyclase genes in higher plants and fungi. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1168-1175.
 16. Hamano, Y., Kuzuyama, T., Itoh, N., Furihata, K., Seto, H., and Dairi, T. (2002). Functional analysis of eubacterial diterpene cyclases responsible for biosynthesis of a diterpene antibiotic, terpentecin. *J Biol Chem* 277, 37098-37104.
 17. Kawasaki, T., Kuzuyama, T., Kuwamori, Y., Matsuura, N., Itoh, N., Furihata, K., Seto, H., and Dairi, T. (2004). Presence of copalyl diphosphate synthase gene in an actinomycete possessing the mevalonate pathway. *J Antibiot (Tokyo)* 57, 739-747.
 18. Nakano, C., Okamura, T., Sato, T., Dairi, T., and Hoshino, T. (2005). *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv3377c encodes the diterpene cyclase for producing the halimane skeleton. *Chem Commun (Camb)*, 1016-1018.
 19. Toyomasu, T., Tsukahara, M., Kaneko, A., Niida, R., Mitsunashi, W., Dairi, T., Kato, N., and Sassa, T. (2007). Fusicoccins are biosynthesized by an unusual chimera diterpene synthase in fungi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3084-3088.

20. Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., and Hopwood, D.A. (2000). Practical *Streptomyces* Genetics (Norwich, UK: John Innes Foundation).
21. Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E.T., Rao, R.N., and Schonert, B.E. (1992). Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* 116, 43-49.
22. Winter, J.M., Moffitt, M.C., Zazopoulos, E., McAlpine, J.B., Dorrestein, P.C., and Moore, B.S. (2007). Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization: cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster. *J Biol Chem* 282, 16362-16368.
23. Ishikawa, J., and Hotta, K. (1999). FramePlot: a new implementation of the frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G + C content. *FEMS Microbiol Lett* 174, 251-253.
24. Dairi, T., Aisaka, K., Katsumata, R., and Hasegawa, M. (1995). A self-defense gene homologous to tetracycline effluxing gene essential for antibiotic production in *Streptomyces aureofaciens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59, 1835-1841.
25. Dairi, T., Hamano, Y., Kuzuyama, T., Itoh, N., Furihata, K., and Seto, H. (2001). Eubacterial diterpene cyclase genes essential for production of the isoprenoid antibiotic terpentecin. *J Bacteriol* 183, 6085-6094.
26. Christianson, D.W. (2006). Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem Rev* 106, 3412-3442.
27. Davisson, V.J., Woodside, A.B., and Poulter, C.D. (1985). Synthesis of allylic and homoallylic isoprenoid pyrophosphates. *Methods Enzymol* 110, 130-144.
28. Agematu, H., Matsumoto, N., Fujii, Y., Kabumoto, H., Doi, S., Machida, K., Ishikawa, J., and Arisawa, A. (2006). Hydroxylation of testosterone by bacterial cytochromes P450 using the *Escherichia coli* expression system. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70, 307-311.
29. Lin, X., Hezari, M., Koepp, A.E., Floss, H.G., and Croteau, R. (1996). Mechanism of taxadiene synthase, a diterpene cyclase that catalyzes the first step of taxol biosynthesis in Pacific yew. *Biochemistry* 35, 2968-2977.
30. Harp, J.M., Timm, D.E., and Bunick, G.J. (1998). Macromolecular crystal

- annealing: overcoming increased mosaicity associated with cryocrystallography. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 54, 622-628.
31. Yeh, J.I., and Hol, W.G. (1998). A flash-annealing technique to improve diffraction limits and lower mosaicity in crystals of glycerol kinase. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 54, 479-480.
 32. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* 30, 1022-1025.
 33. Terwilliger, T.C., and Berendzen, J. (1997). Automated MAD and MIR structure solution. *Methods Enzymol* 276, 307-326.
 34. Terwilliger, T.C. (2002). Automated structure solution, density modification and model building. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 58, 1937-1940.
 35. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 60, 2126-2132.
 36. Collaborative Computational Project N. (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 50, 760-763.
 37. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., and Dodson, E.J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 53, 240-255.
 38. Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr* 26, 283-291.
 39. Kleywegt, G.J., and Jones, T.A. (1994). Detection, delineation, measurement and display of cavities in macromolecular structures. *Acta Crystallographica. Section D: Biological Crystallography* 50, 178-185.
 40. Holm, L., Kaariainen, S., Rosenstrom, P., and Schenkel, A. (2008). Searching protein structure databases with DaliLite v.3. *Bioinformatics* 24, 2780-2781.
 41. Shishova, E.Y., Di Costanzo, L., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (2007). X-ray crystal structure of aristolochene synthase from *Aspergillus terreus* and

- evolution of templates for the cyclization of farnesyl diphosphate. *Biochemistry* 46, 1941-1951.
42. Caruthers, J.M., Kang, I., Rynkiewicz, M.J., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (2000). Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25533-25539.
 43. Hyatt, D.C., Youn, B., Zhao, Y., Santhamma, B., Coates, R.M., Croteau, R.B., and Kang, C. (2007). Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5360-5365.
 44. Rynkiewicz, M.J., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (2001). Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 13543-13548.
 45. Lesburg, C.A., Zhai, G., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (1997). Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science* 277, 1820-1824.
 46. Shishova, E.Y., Yu, F., Miller, D.J., Faraldos, J.A., Zhao, Y., Coates, R.M., Allemann, R.K., Cane, D.E., and Christianson, D.W. (2008). X-ray crystallographic studies of substrate binding to aristolochene synthase suggest a metal ion binding sequence for catalysis. *Journal of Biological Chemistry* 283, 15431-15439.

謝辞

本研究に取り組むにあたり、懇切丁寧なるご指導、ご鞭撻を賜りました東京大学生物生産工学センター西山真教授に厚く感謝いたします。

研究を行うに当たり、終始、直接丁寧な御助言、御指導を頂きました同研究室葛山智久准教授に心から御礼申し上げます。

結晶構造解析を始めとし、数多くの実験の御指導を頂きました富田武郎助教に深く感謝いたします。

サイクロオクタチン生産菌を分与いただきました微生物化学研究センターの五十嵐雅之博士に深く感謝いたします。

LC-MS の測定で大変お世話になり、実験のアドバイスも頂いた微生物化学研究センターの澤竜一博士に深く感謝いたします。

MS 分析に関する御助言を頂きました醗酵学研究室の鮎信学助教に厚く御礼申し上げます。

NMR の測定と解析において、多大なるご協力を頂きました細胞機能工学研究室趙平研究員に心より感謝申し上げます。

結晶構造解析において、終始、アドバイスを頂きました細胞機能工学研究室博士課程1年吉田彩子氏に深く感謝いたします。

実験を始め、日々の生活において様々な形でご協力、ご援助を頂きました細胞機能工学研究室の皆様へ深く感謝いたします。