

博士論文

糸状菌由来天然物の構造複雑化を担う
分子基盤の解明

松田 侑大

目次

略語一覧.....	3
第1章 序論	5
1-1. 序	5
1-2. 天然物の生合成	6
1-3. 糸状菌メロテルペノイド	10
1-4. 糸状菌メロテルペノイド生合成	12
1-4-1. メロテルペノイド生合成概説	12
1-4-2. ポリケタイド合成酵素	14
1-4-3. プレニル基転移酵素	17
1-4-4. テルペン環化酵素	19
1-4-5. 修飾酵素群	24
1-5. 生合成研究の方法論	27
1-6. 本研究の目的	30
1-7. 本論文の構成	31
第2章 Andrastin A の生合成研究	32
2-1. 背景・目的	32
2-2. Andrastin A 生合成遺伝子クラスターの探索	33
2-3. テルペン環化酵素 AdrI の機能解析	36
2-4. 修飾酵素群の機能解析	39
2-5. 考察	44
第3章 Austinol のスピロラクトン形成機構の解明	45
3-1. 背景・目的	45
3-2. Preaustinoid A3 生合成に関わる候補遺伝子群の探索	46
3-3. 酸化酵素群の機能解析	46
3-5. AusC の反応時期の解明	56
3-6. 考察	58
第4章 Anditomin の生合成研究	63
4-1. 背景・目的	63

4-2. Anditomin 生合成遺伝子クラスターの発見と生物情報学的解析.....	64
4-3. 生合成初期段階の解明	66
4-4. 修飾酵素群の機能予測ならびに生合成中期段階の解明	73
4-5. AndA の <i>in vitro</i> アッセイ	81
4-6. 生合成後期段階の解明	82
4-7. 考察	89
第5章 総括	96
実験の部.....	100
参考文献.....	119
補遺.....	131
謝辞.....	147

略語一覽

5-MOA	5-MethylOrsellinic Acid
ACP	Acyl Carrier Protein
AcT	Acetyl Transferase
AKR	Aldo-Keto Reductase
AT	AcylTransferase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CD	Czapek Dox
cDNA	Complementary DNA
CL	CoA ligase
CLC	CLaisen Cyclase
CoA	Coenzyme A
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DH	DeHydratase
DHDMP	5,7-DiHydroxy-4,6- DiMethylPhtalide
DHMP	5,7-DiHydroxy-4-MethylPhtalide
DMAPP	DiMehtylAllyl PyroPhosphate
DMOA	3,5-DiMethylOrsellinic Acid
DNA	DeoxyRibonucleic Acid
DPY	Dextrin-Polypepton-Yeast extract
ER	EnoylReductase
ESI	ElectroSpray Ionization
FAD	Flavin Adenine Dinucleotide
FMO	FAD-dependent MonoOxygenase
FPP	Farnesyl PyroPhosphate
gDNA	Genomic DNA
GGI	3-GeranylGeranyl Indole
GGPP	GeranylGeranyl PyroPhosphate
GO	Galactose Oxidase
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HPPO	4-Hydroxy-6-(3-Pyridinyl)-2 <i>H</i> -Pyran-2-One

IGP	Indole-3-Glycerol Phosphate
iPKS	Iterative PKS
IPP	Isopentenyl PyroPhosphate
IPTG	IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
KR	KetoReductase
KS	β -Ketoacyl Synthase
LB	Luria-Bertani
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry
MS	Mass Spectrometry
MT	MethylTransferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHI	Non-Heme Iron-dependent enzyme (or dioxygenase)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
NRPS	NonRibosomal Peptide Synthetase
OD	Optical Density
P450	Cytochrome P450 monooxygenase
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Potato Dextrose Agar
PEG	PolyEthylene Glycol
PKS	PolyKetide Synthase
PO	PerOxidase
PrT	Product Template
PT	PrenylTransferase
R	Reductase
SAM	S-Adenosyl Methionine
SAT	Starter AcylTransferase
SDR	Short-chain Dehydrogenase/Reductase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TC	Terpene Cyclase
TE	ThioEsterase
UV	UltraViolet
α-KG	α -KetoGlutarate

第 1 章 序論

1-1. 序

微生物、植物、また動物によって合成される天然有機化合物、いわゆる「天然物」は医薬品を始めとして種々の材料資源として、人類の歴史において重要な役割を果たしてきた。抗生物質 penicillin、高脂血症治療薬 lovastatin、抗マラリア薬 artemisinin、免疫抑制剤 tacrolimus、抗癌剤 taxol などに代表される医薬品が天然物から生み出されていることが示すように、天然物は非常に多岐にわたる生物活性を有しており、これが天然物の持つ大きな特徴であるとともに魅力でもある。他方で、その構造多様性もまた天然物の重要な特性であり、天然物は我々の想像を遥かに凌駕するような分子構造を有することも少なくない。「天然物の特異な分子構造が如何にして合成されるのか」という疑問は古くより多くの化学者を魅了してきたテーマであり、天然物の生合成経路や生合成反応を明らかにすべく数多の研究がなされてきた。

天然物の生合成研究は、1980 年代までは放射性同位体や安定同位体を用いた標識実験によって主に行われてきた。すなわち、生合成の前駆体と考えられる化合物を同位体でラベルした上で、生産者に当該化合物を取り込ませたのち、得られた天然物が同位体で標識されているか、あるいはどの位置が標識されているかを明らかにすることで、生合成経路を推定するというものである。時代が下るにつれて、生合成研究は、反応を担う酵素や生合成酵素をコードする遺伝子へと研究対象の中心を移していった。今日では、天然物生産者のゲノム情報や遺伝子の発現プロファイルなどが非常に容易に入手可能になったことにより、生合成研究は分子レベルで行われることが通例である。しかしながら、同位体を用いた研究はいまだ重要な研究手法であり、生合成中間体のアナログを合成化学的に調製し研究に供することも多い。言うまでもなく、生合成反応のメカニズムの推定や解明には有機化学的な考察が不可欠である。すなわち、現代の天然物生合成研究においては、有機化学と生物学の最先端の知見の融合が非常に重要であると言える。

天然物生合成研究の意義としては、主に以下の二点が挙げられる。第一に、特異な生合成反応ならびに当該反応に関わる酵素の発見に繋がりうること、第二に、有用物質の安定供給に寄与することである。前者に関しては、天然物の中には非常に特異な構造を有するものも多く、その生合成の過程においては奇異な反応が関与しているものと期待される。実際に、天然物の生合成研究を通じて、このようなユニークな反応に関わる酵素が見出されることは少なくない。他方、後者については、非常に有用な生物活性を有する天然物で実際に医薬品

として開発されている化合物であっても、生産量が低いことや培養に長期間を要することなどの理由により安定供給に問題を有するものも存在する。このような天然物生合成の分子基盤を明らかにすることができれば、有用物質の安定供給にも寄与すると期待できる。

本研究では、生合成研究の対象として、糸状菌の産生するメロテルペノイド化合物に着目する。糸状菌メロテルペノイドは、後述するように構造多様性並びに生物活性に富む化合物群であり、その生合成研究は特異な反応を担う酵素の発見や有用物質生産のための基盤の確立などに繋がることが強く期待される。本研究では特に、単純な芳香族化合物である 3,5-dimethylorsellinic acid (DMOA) に由来する一連の化合物を研究対象とし、その生合成分子基盤の網羅的解明を目指した。

1-2. 天然物の生合成

天然物は、その生合成の由来によってポリケタイド、テルペノイド、ペプチド、アルカロイドなどに分類される。加えて、複数の経路に由来するハイブリッド型の化合物も多数存在する。天然物の生合成は、一般に「基本骨格構築」および「修飾反応」の二つのステージに分けられる。前者のステージにおいては、ポリケタイド合成酵素 (PKS)、テルペン環化酵素、非リボソーム依存型ペプチド合成酵素 (NRPS) などの酵素が、それぞれ acetyl-CoA や malonyl-CoA、プレニル二リン酸、各種アミノ酸といった比較的単純な出発単位を用いて天然物の多様な構造の母核を形成する。これらの酵素群が如何にして多様な構造を生み出すかを明らかにすべく、多くの研究者によって詳細な機能解析がなされており、反応メカニズムや酵素の立体構造などに関する知見が多数集積している¹⁻⁸。PKS、テルペン環化酵素、NRPS によって構築された基本骨格は、多くの生合成経路において、酸化酵素、還元酵素、異性化酵素、転移酵素などによって、さらなる修飾反応を受ける。修飾反応もまた、天然物の複雑かつ多様な分子構造の形成において重要な役割を演じており、最近では生合成研究の進歩とも相俟って、多数の奇異な反応を触媒する酵素が見出されている。

重要なことに、このような特異な反応は必ずしも特殊な酵素によって触媒されるわけではなく、ごく一般的な酵素（機能既知の酵素と相同性を有する酵素）がユニークな反応に関与している例も少なくない。特に、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450)、非ヘム鉄依存型ジオキシゲナーゼ (NHI)、FAD 依存型モノオキシゲナーゼ (FMO) などの酸化酵素が特異な反応を担う事例は多数報告されている。たとえば、fumagillin 生合成において多段階の酸化反応と骨格転位を触媒する Fma-P450⁹、spirotryprostatin B 合成においてスピロ環形成を担う

FtmG¹⁰などは特異な反応を担う P450 の代表例である。他方で、NHI の関与する反応の中では、deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS)^{11,12}や stipitatic acid 生合成に関わる TropC¹³の触媒する環拡大反応、あるいは 4'-methoxyviridicatin 合成において AspJ¹⁴が引き起こすキノロン骨格の生成などがユニークな反応として知られる。また、奇異な反応を担う FMO としては、enterocin 生合成において Favorskii 転位様の反応を触媒するとされる EncM¹⁵や cytochalasin E の炭酸エステル形成を担う CcsB¹⁶などが代表的な例である (Figure 1-1)。これらの事例は、酵素のみならず、その基質の分子構造の特殊性もまた奇異な反応が進行する上で重要であることを示している。

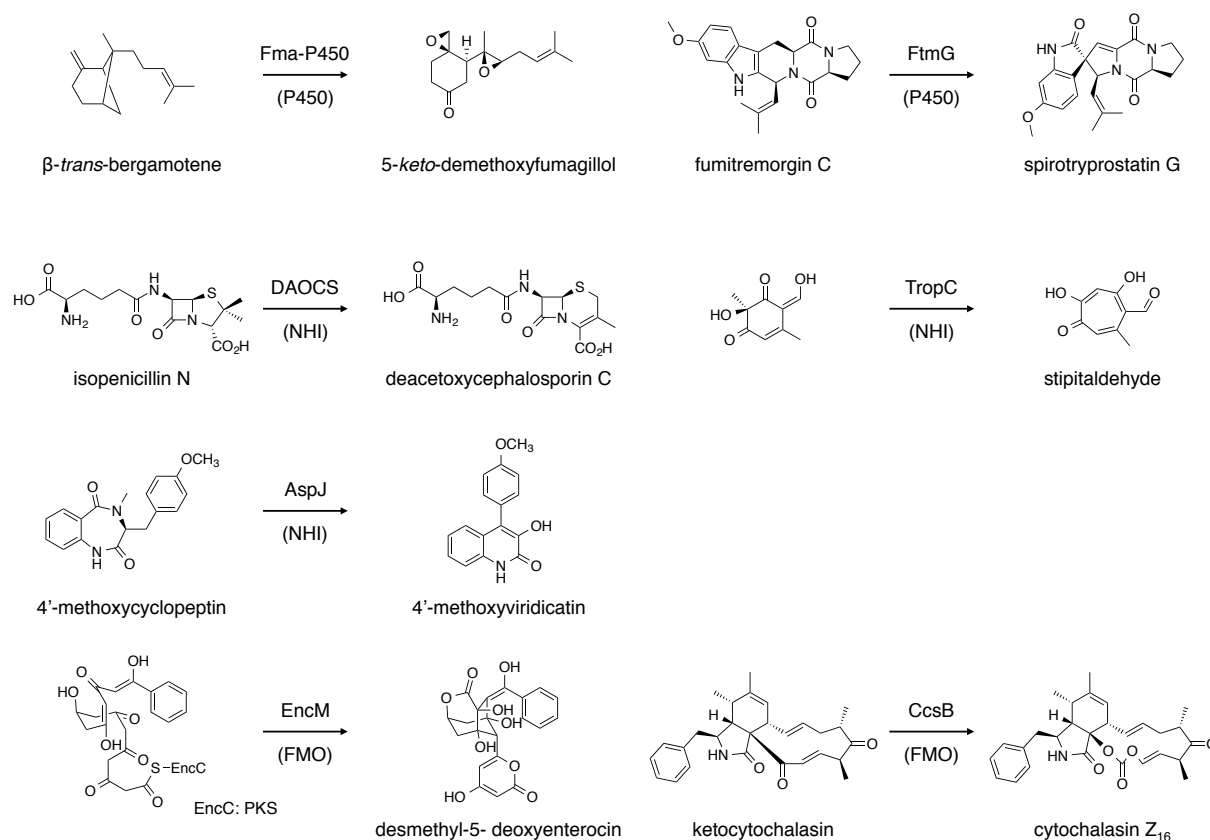


Figure 1-1. Unusual reactions catalyzed or induced by oxidative enzymes.

上述の酸化酵素のみならず、天然物の修飾反応に関わる酸化酵素は一般的に、複雑骨格分子の特定の位置に対して選択的に作用するとともに、多くの場合、不活性な炭素-水素結合の開裂によってその反応を開始する。C-H 活性化は、有機合成化学における重要なトピックのひとつであり^{17, 18}、天然物生合成に関わる酸化酵素は、基質特異性や反応効率などの点で問題を有するものの、C-H 活性化の触媒として応用可能であると考えられる。実際に、複雑な分子の選択的な官能基化のために P450 の変異体を用いられた例などが知られている¹⁹。

他方で、生合成研究を通じて、これまで機能解析された酵素のアミノ酸配列とはほとんど同一性を有さない酵素が見出されるケースも少なからず存在する。最近では、reveromycin の生合成に関与するスピロアセタール環形成酵素 RevJ²⁰ならびに versipelostatin 生合成において [4+2]環化付加反応を担う VstJ²¹などの発見がその好例である (Figure 1-2)。このように、これまで既知の酵素と相同性を有さない新しい酵素が一旦発見されると、そのホモログをデータベース中に検索することで、類似したタンパク質やそれをコードする機能未知の遺伝子クラスターの発見を容易に発見することが可能になる。したがって、全く新規な生合成酵素の発見は、生合成研究全体を大きく進展させるブレークスルーにもなりうる。

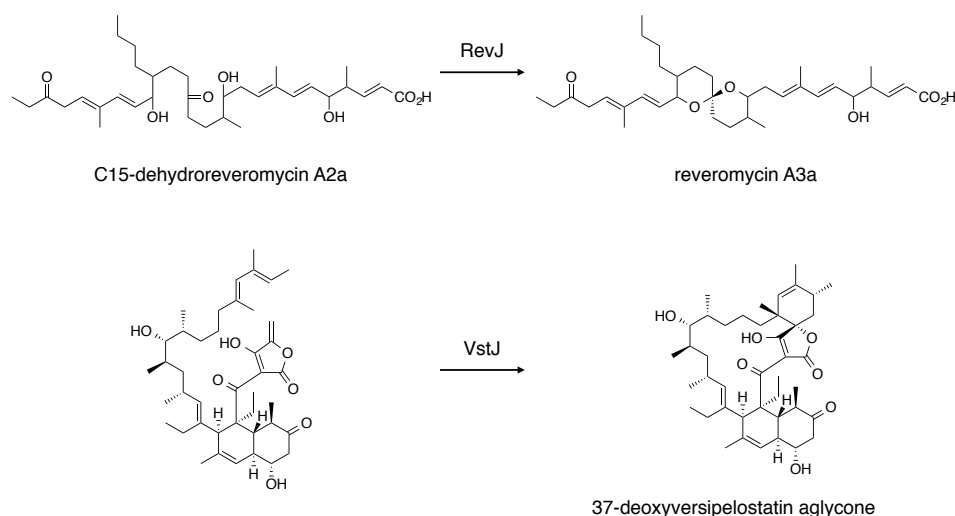


Figure 1-2. Biosynthetic reactions catalyzed by novel family of enzymes.

天然物の生合成を分子レベルで理解することは、有用物質の生産や供給を考える上でも重要である。天然物の生合成研究が有用物質の生産に大きく寄与した例を、以下に紹介したい。第一に、キク科植物クソニンジン (*Artemisia annua*) の産生する artemisin およびその誘導体は、抗マラリア薬として用いられる薬学上非常に重要な化合物である^{22, 23}。その供給は、生産植物からの抽出ならびに半合成によって行われてきたが、当該植物の生育速度が遅いこと、生産量が十分でないことなどの問題点をはらんでおり、安価かつ大量に artemisin を供給する方法を開発することは喫緊の課題であった。この問題を解決するため、より生育の速い微生物の中に、必要な生合成遺伝子を導入することで、目的化合物を得ようとする研究が展開されてきた^{24, 25}。具体的には、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に artemisinic acid 生合成を担う酵素遺伝子群を導入するとともに、これら酵素群の基質を供給する一次代謝系をも改変することで、25 g/L もの収量で artemisinic acid を得ることが可能になっている。なお、artemisinic acid は合成的に容易に artemisinin へと変換可能であり、本法は産業利用されるに至っている

(Figure 1-3)。

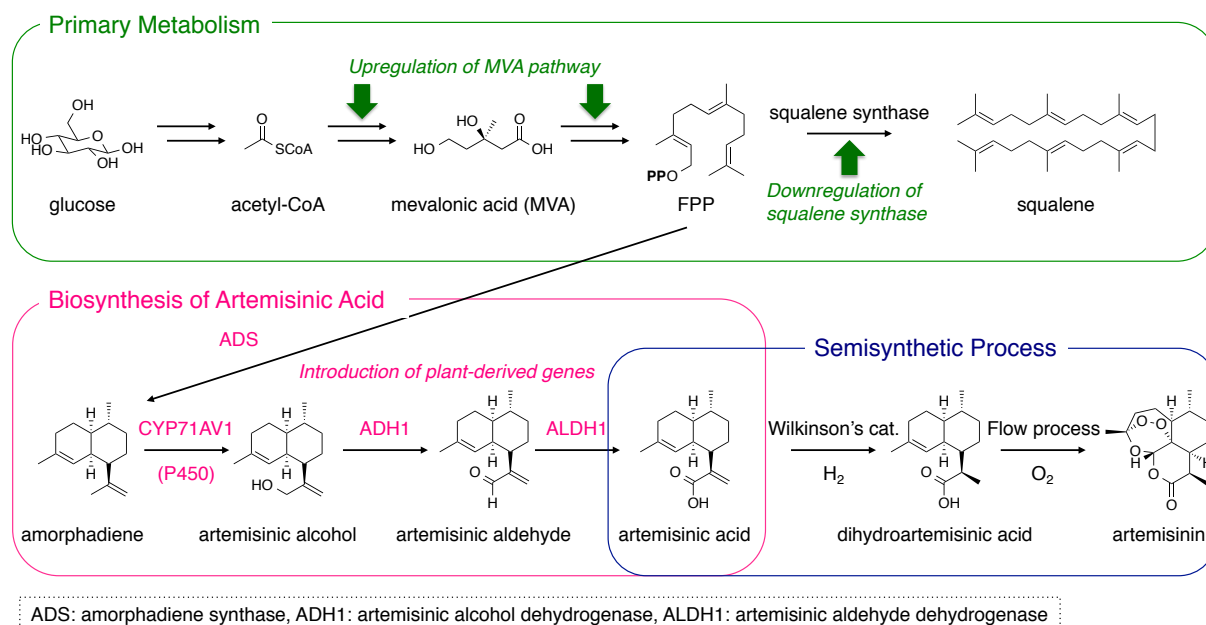


Figure 1-3. Overview of the artemisinin production using the engineered yeast.

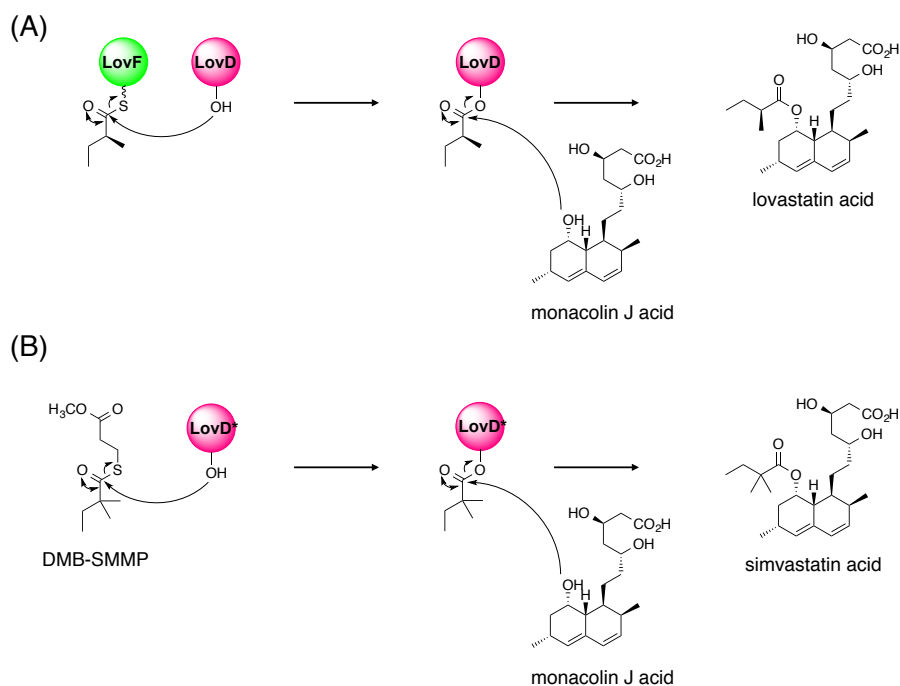


Figure 1-4. (A) Production of lovastatin in the natural biosynthetic pathway and (B) generation of simvastatin with evolved LovD mutant. LovD* indicates the mutated LovD with unnatural catalytic activity.

第二に、糸状菌 *Aspergillus terreus* の産生する lovastatin は高脂血症治療薬として著名な化合物であるが、実際には、その半合成誘導体である simvastatin が汎用されるスタチン類となっている²⁶。なお、両化合物の構造上の違いはアシル側鎖の構造のみである。*A. terreus* においては、PKS である LovF が本酵素に結合した 2-メチルブタン酸中間体を合成し、これをアシル基転移酵素 LovD が別途生合成された monacolin J の水酸基に転移することで、lovastatin の生合成が完了する (Figure 1-4A)²⁷。ここで、人工的に合成した 2,2-ジメチルブタン酸誘導体を本経路に取り込ませることができれば、simvastatin が得られるものと期待される。この目的を達成するため、LovD を進化工学的な手法で改変した結果、得られた LovD 変異体は α -dimethylbutyryl-S-methyl 3-mercaptopropionate (DMB-SMMP) および monacolin J を基質として simvastatin を非常に効率的に生成することが判明しており (Figure 1-4B)、最良の変異体は 75 g/L の monacolin J を 36 時間でほぼ全て simvastatin へと変換する²⁸。このように、有用物質の生合成機構を理解し、生物の物質生産システムを人為的に改変することによって、有用物質を効率的に供給することも可能になる。以上をまとめると、天然物の生合成研究は学術的にも産業上も非常に重要な研究領域であると言えよう。

1-3. 糸状菌メロテルペノイド

メロ (mero-) とは「部分の」「部分的な」といった意味を持った接頭辞であり、メロテルペノイドとは部分的にテルペノイドの構造を有する化合物の総称である²⁹。その定義が示すように、非常に多くの化合物がメロテルペノイドとして分類されうるが、メロテルペノイドはその非テルペノイド部位がポリケタイドに由来するか否かによって、さらに大きく二つのグループに分類できる。なお、本研究では特にポリケタイドとテルペノイドのハイブリッド化合物に着目して研究を行った。

メロテルペノイドは、非テルペノイド部位の構造多様性、テルペノイド部位の鎖長や環化様式の多様性、修飾反応の多様性などの理由によって、非常に多数の分子を含む化合物群である。メロテルペノイドはバクテリアや植物を含め広く分布しているが、とりわけ糸状菌からは多様なメロテルペノイド化合物が報告されている²⁹。加えて、多様な生物活性も、糸状菌メロテルペノイドの持つ大きな特徴のひとつであり、実際に臨床応用された化合物や、有望な創薬リード化合物が多数知られている (Figure 1-5)。例えば、*Penicillium brevicompactum* などの糸状菌が産生する mycophenolic acid は inosine monophosphate dehydrogenase (IMPDH) の強力な阻害剤であり、その誘導体である mycophenolate mofetil が免疫抑制剤として用いら

れている³⁰。また、*Aspergillus fumigatus* より単離された fumagillin は微孢子虫症の治療薬として利用されるほか³¹、methionine aminopeptidase-2 (MetAP2) の阻害能を有することから血管新生阻害剤として開発が進められている³²。同じく *A. fumigatus* の産生する pyripyropene A は acyl-CoA: cholesterol acyltransferase-2 (ACAT2) の強力な阻害剤であり、コレステロール低下剤や脂質異常症予防治療薬として臨床応用が期待される化合物である³³。すでに多数の誘導体が合成され、活性の上昇したアナログが得られているのみならず³⁴、動物実験においても良好な結果が得られている³⁵。他方で *Aspergillus terreus* より単離された territrein B は、pyripyropene A と類似した炭素骨格を有するものの、acetylcholinesterase の強力かつ選択的な阻害剤として知られる³⁶。加えて、*Ascochyta viciae* より見出された ascofuranone は、アフリカトリパノソーマ症（アフリカ睡眠病）の治療薬とすべく、鋭意研究がなされている化合物である³⁷。本化合物は、トリパノソーマ原虫のオルタナティブオキシダーゼ（TAO）を阻害することにより、その機能を発揮する。

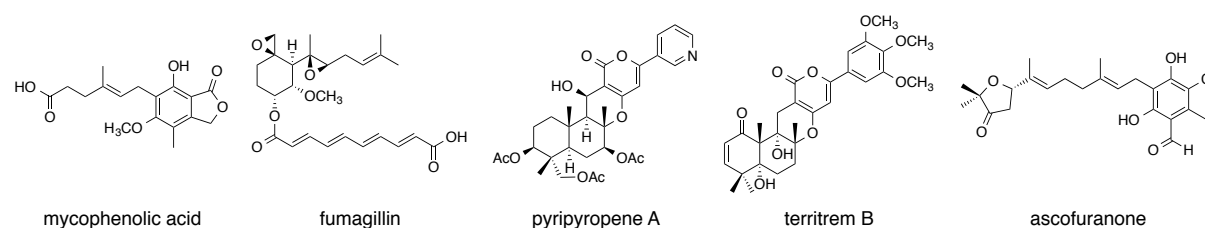


Figure 1-5. Fungal meroterpenoids with significant biological activities.

このように多様な生物活性を示す糸状菌メロテルペノイドであるが、先述のとおり、その構造多様性も本化合物群の大きな特徴である。糸状菌メロテルペノイドのうち、非テルペノイド部位が芳香族ポリケタイド 3,5-dimethylorsellinic acid (DMOA) に由来する化合物群は、とりわけ構造多様性に富むのみならず、非常に特異な分子構造を有するものが少なくない (Figure 1-6)。Austinol や andibenin B の有するスピロラクトン骨格^{38, 39}、anditomin や andibenin B に見られる分子内架橋構造^{39, 40}、novofumigatonin のオルトエステル⁴¹、tropolactone A のトロポン骨格⁴² などが奇異な構造の例として挙げられる。これらの分子構造の生成メカニズムやその合成に関与する酵素はいずれも未解明のままであり、如何にしてこのような複雑な構造が形成されるのかについて非常に興味を持たれる。DMOA 由来メロテルペノイド化合物のなかには、合成研究の標的となっているものも存在するが、その構造の複雑さ故か、未だ全合成が達成された化合物は存在しない。したがって、これら一連のメロテルペノイド生合成分子基盤を解明することができれば、特異な反応を触媒する酵素の発見に繋がるのみならず、複雑な構造を有する天然物やその類縁体を効率的に供給するシステムの構築にも寄与する。

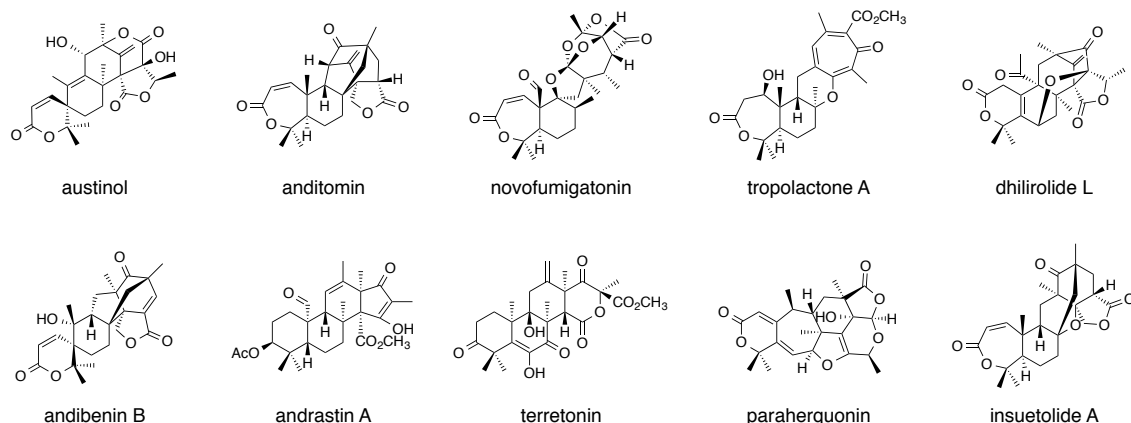


Figure 1-6. Representative DMOA-derived meroterpenoids.

1-4. 糸状菌メロテルペノイド合成

1-4-1. メロテルペノイド合成概説

メロテルペノイドは、非常に多岐にわたる化合物を含むため、その全ての生合成を一般化することは困難である。本研究では、ポリケタイドとテルペノイドのハイブリッド型化合物を研究対象とすることから、このタイプのメロテルペノイドの一般的な生合成機構について、すでに生合成の全容が明らかにされている pyripyropene A をモデル化合物として取り上げ、以下にその概要を述べる (Figure 1-7)。なお、pyripyropene A の生合成遺伝子群は、*A. fumigatus* Af293 株のゲノムデータベース中に見出されたほか、*Penicillium coprobium* PF1169 株からも同定されている⁴³⁻⁴⁵。また、糸状菌を含む微生物においては、一般に、ある天然物の生合成に関わる一連の遺伝子群は染色体上にまとまって存在しており、これを遺伝子クラスターと呼ぶ。

生合成の第一段階では、ポリケタイド合成酵素 (PKS) によってポリケタイド化合物が生成する。一般的に、PKS の基質は acetyl-CoA や malonyl-CoA であることが多いが、pyripyropene A 生合成においては、nicotinic acid が CoA リガーゼ Pyr1/Ppb1 によって nicotinyl-CoA に変換され、これが PKS である Pyr2/Ppb2 の開始基質となる。Pyr2/Ppb2 によって、2 分子の malonyl-CoA が縮合した後、ラクトン化によって閉環することで 4-hydroxy-6-(3-pyridinyl)-2H-pyran-2-one (HPPO) を与える。つづいて、HPPO はプレニル基転移酵素 Pyr6/Ppb7 によってファルネシル化を受け farnesyl-HPPO へと変換される。本化合物の末端二重結合は、次いで FAD 依存型のエポキシダーゼ Pyr5/Ppb6 によってエポキシ化された後、テルペン環化酵素 Pyr4/Ppb5 がこのエポキシドのプロトン化を起点とするテルペノイド部位の閉環反応を触媒

することで、環化産物 deacetyl-pyripyropene E が生成する。後述する fumagillin のような例外も存在するものの、ポリケタイド合成→プレニル化→エポキシ化→環化という一連のプロセスは、ポリケタイド由来のメロテルペノイド生合成の初期段階において一般的なものであると考えられ、ここまでで最終産物の基本骨格が構築されることが多い。ただし、上記の生合成過程の途中で他の反応（メチル化など）が関与することもある。加えて、mycophenolic acid のようにエポキシ化→環化を経ない化合物も存在する。

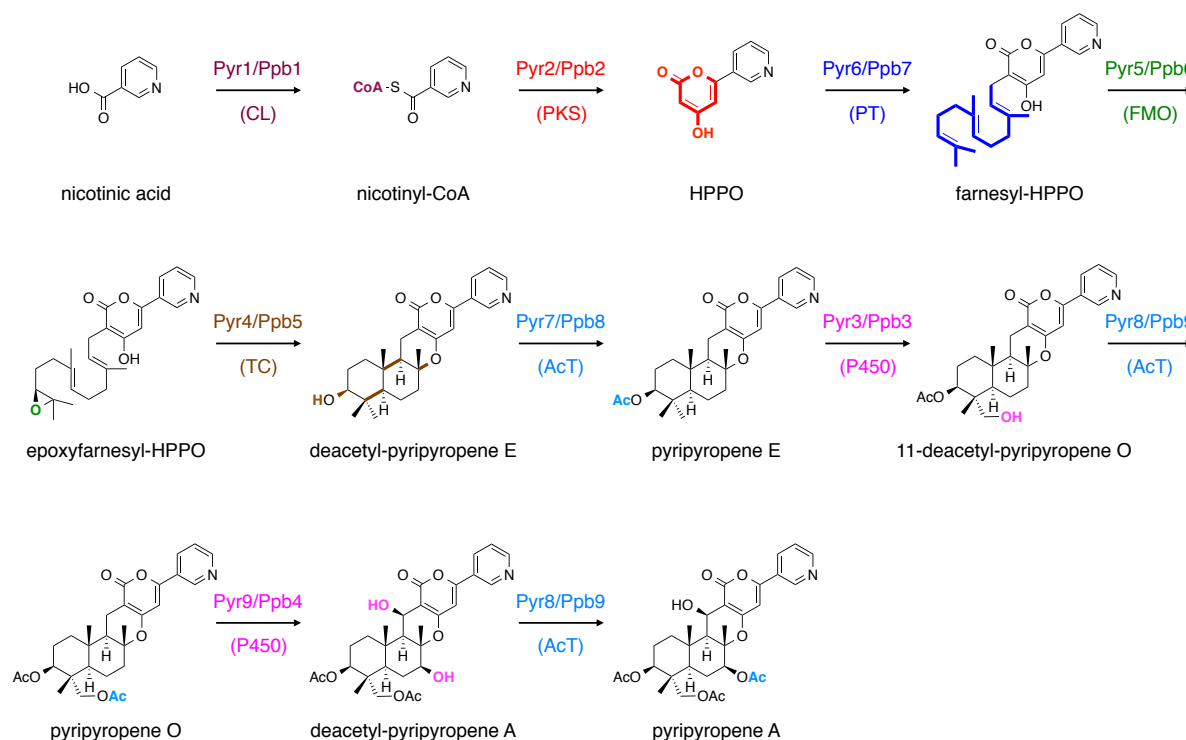


Figure 1-7. Biosynthetic pathway of pyripyropene A.

次いで、テルペン環化酵素によって生じた環化中間体は種々の修飾反応を受ける。Pyripyropene A 生合成においては、deacetyl-pyripyropene E はアセチル基転移酵素 Pyr7/Ppb8 によって pyripyropene E となったのち、P450 である Pyr3/Ppb3 によって水酸化体 11-deacetyl-pyripyropene O へと変換される。続いて、Pyr7/Ppb8 とは異なるアセチル基転移酵素 Pyr8/Ppb9 が本化合物をアセチル化することで pyripyropene O を与え、これが P450 である Pyr9/Ppb4 によって水酸化を受けることによって、deacetyl-pyripyropene A が生じる。最後に、アセチル基転移酵素 Pyr8/Ppb9 が再び本化合物をアセチル化することで pyripyropene A が得られる。本生合成における修飾酵素はアセチル基転移酵素と P450 のみであり、反応自体も比較的単純であるが、修飾反応や修飾酵素は非常に多様であり、酵素のアミノ酸配列からだけではその機能を予測することが困難なケースも多い。

以上をまとめると、生合成の初期段階に関与する酵素を推定することは比較的容易であるが、修飾反応を担う酵素の探索や機能解析に関しては、個々の生合成経路に応じた研究を行う必要があると言える。以下に、メロテルペノイド生合成に関与する鍵酵素の機能やこれまでに得られた知見について詳述する。

1-4-2. ポリケタイド合成酵素

ポリケタイド合成酵素 (PKS) は Type-I、Type-II、Type-III の 3 つに大別される。Type-I PKS とは複数の触媒ドメインを有する多機能型の酵素であり、Type-II PKS は異なる触媒機能を有する複数のポリペプチドが複合体を形成して機能するサブユニット型の酵素である。一方で、Type-III PKS は、炭素鎖の伸長を担う β -ketoacyl synthase (KS) ドメインのみを有する酵素である。なお、Type-I PKS はさらに 2 つに分類される。一つは各触媒ドメインを有するポリペプチドが複数個生合成に関与するとともに、各ドメインが生合成反応において原則一回のみ機能するモジュラー型 PKS であり、他方は同一のポリペプチド上の各触媒ドメインが繰り返し機能する繰り返し型 PKS (iterative PKS: iPKS) である。

糸状菌からは少数の Type-III PKS の報告もあるものの、糸状菌由来の PKS はそのほとんどが Type-I iPKS である。これまでに糸状菌メロテルペノイド生合成への関与が知られる PKS は、いずれも Type-I iPKS であることから、本項では Type-I iPKS について詳述する。iPKS が持ちうるドメインは starter acyltransferase (SAT)、acyltransferase (AT)、acyl carrier protein (ACP)、 β -ketoacyl synthase (KS)、keto reductase (KR)、dehydratase (DH)、enoyl reductase (ER)、methyltransferase (MT)、product template (PrT)、thioesterase (TE)、Claisen cyclase (CLC)、reductase (R) ドメインである。

上記の各ドメインのうち、炭素鎖の伸長に必須となるのは、AT、ACP、KS ドメインの 3 つである。まずは、これらのドメインが如何にして炭素鎖 (β -ポリケトメチレン鎖) の伸長を担うかについて述べる (Figure 1-8A)。初めに AT が開始基質となるアシル CoA のアシル基を ACP 上にロードし、次いで KS が acyl-ACP からエステル転移によってアシル基を受け取る。開始基質は一般的に acetyl-CoA であることが多いが、pyripyropene A 生合成で見られるようにそれ以外の出発物質が用いられるケースも存在する。次いで、AT は伸長鎖基質 (通例では manonyl-CoA) のアシル基を ACP と結合したホスホパンテテイン基にロードする。さらに、伸長鎖 (マロニル基) の脱炭酸を伴う縮合反応により炭素鎖の伸長が起こった後、伸長したアシル鎖は再度 KS ドメインへと戻ることによって一回の反応サイクルが終了する。再び AT により

伸長鎖基質が ACP にロードされ、同様の縮合反応が進行することでさらに炭素差が伸長し、同様のサイクルを繰り返すことでβ-ポリケトメチレン鎖が合成されていく。また、伸長の過程で aldol 反応による閉環反応が生じることも多い。

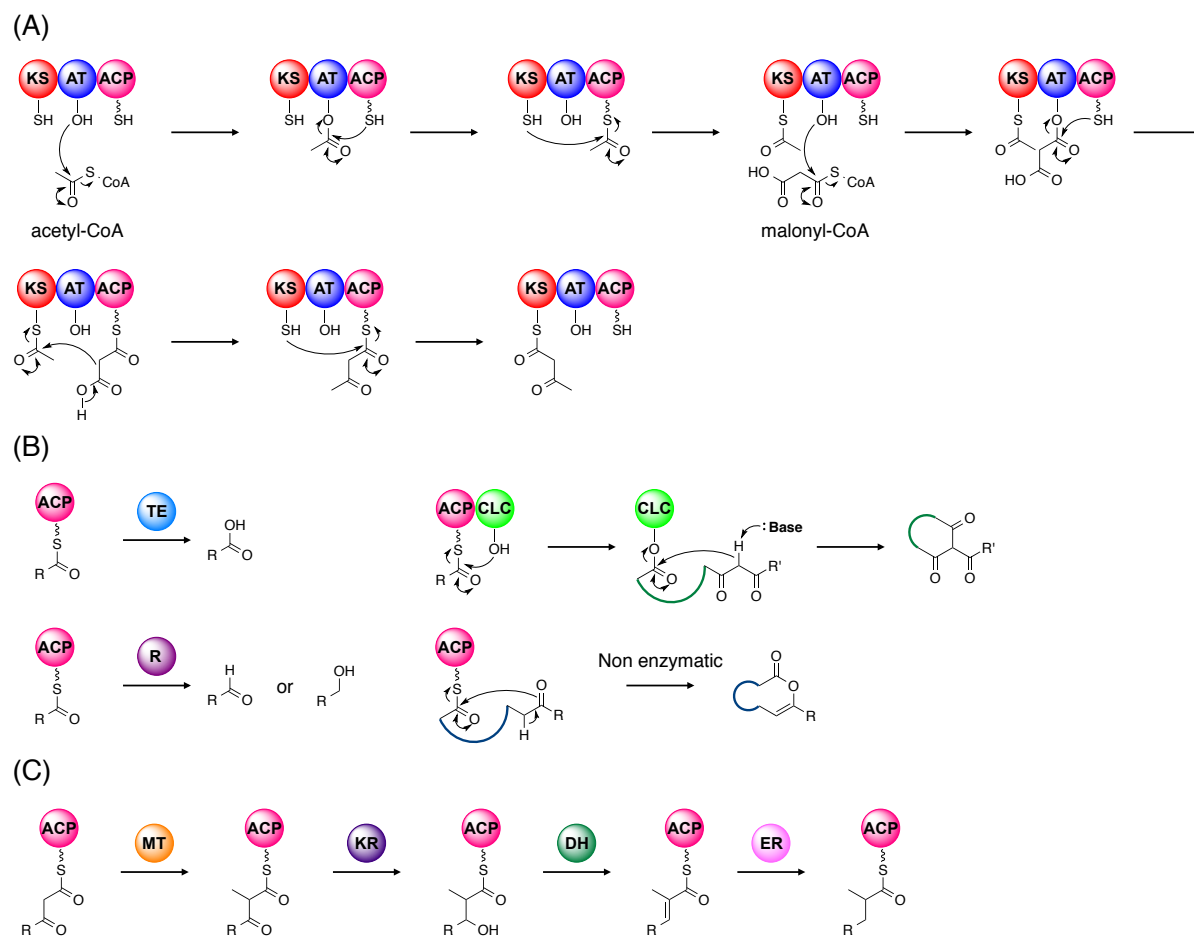


Figure 1-8. General mechanism of iPKS reactions. (A) Reaction mechanism of the chain elongation. (B) Release mechanisms from iPKSs. (C) Reactions catalyzed by MT, KR, DH, and ER domains.

最終的な反応の終結にあたっては、何らかの形で合成された炭素鎖が酵素より解離する必要があるが、そのメカニズムについてはいくつか知られている (Figure 1-8B) ⁴⁶。TE ドメインが存在する場合は、チオエステル結合を加水分解し、カルボン酸を与えることで反応が終結する。CLC ドメインは TE ドメインと触媒的に類似したドメインであるが、CLC が存在する場合は、まず CLC の活性部位のセリン残基がチオエステル結合のカルボニルを攻撃し、酵素に結合した中間体を与えた後、クライゼン反応を触媒することで環化ならびに酵素からの解離へと導く。R ドメインを有する場合には、チオエステル結合は還元的に開裂し、アルデヒドまたはアルコール体が生じる。また、特定のドメインの寄与なくラクトン化が進行し、

酵素から解離する例も一般的である。興味深いことに、PKS のポリペプチド鎖上に解離用のドメインを有さないものの、PKS とは別にコードされた単独の TE や AT が、チオエステル結合の加水分解、あるいは他の PKS や低分子への転移を担うケースも少なからず存在する。

PKS 中に、KR、DH、ER、MT ドメインが存在する場合、伸長の過程において β -ポリケトメチレン鎖はさらなる変換反応を受ける。KR は β -ケト基の水酸基への還元を、DH は脱水反応による二重結合の形成を、ER は共役二重結合の還元を、MT ドメインは α 位のメチル化をそれぞれ触媒する (Figure 1-8C)。重要なことに、たとえこれらのドメインを有していたとしても、各反応サイクルにおいて必ずしも全てのドメインがその触媒能を発揮するわけではない。例えば、KR、DH、ER のドメインを有する PKS であっても、ある反応サイクルにおいては ER が機能せず、炭素-炭素二重結合を残したまま、次の反応サイクルへと移行することもありうる。また、PKS とは別個にコードされた ER や MT が PKS と協調して一連の伸長反応を担う例も知られている^{47, 48}。

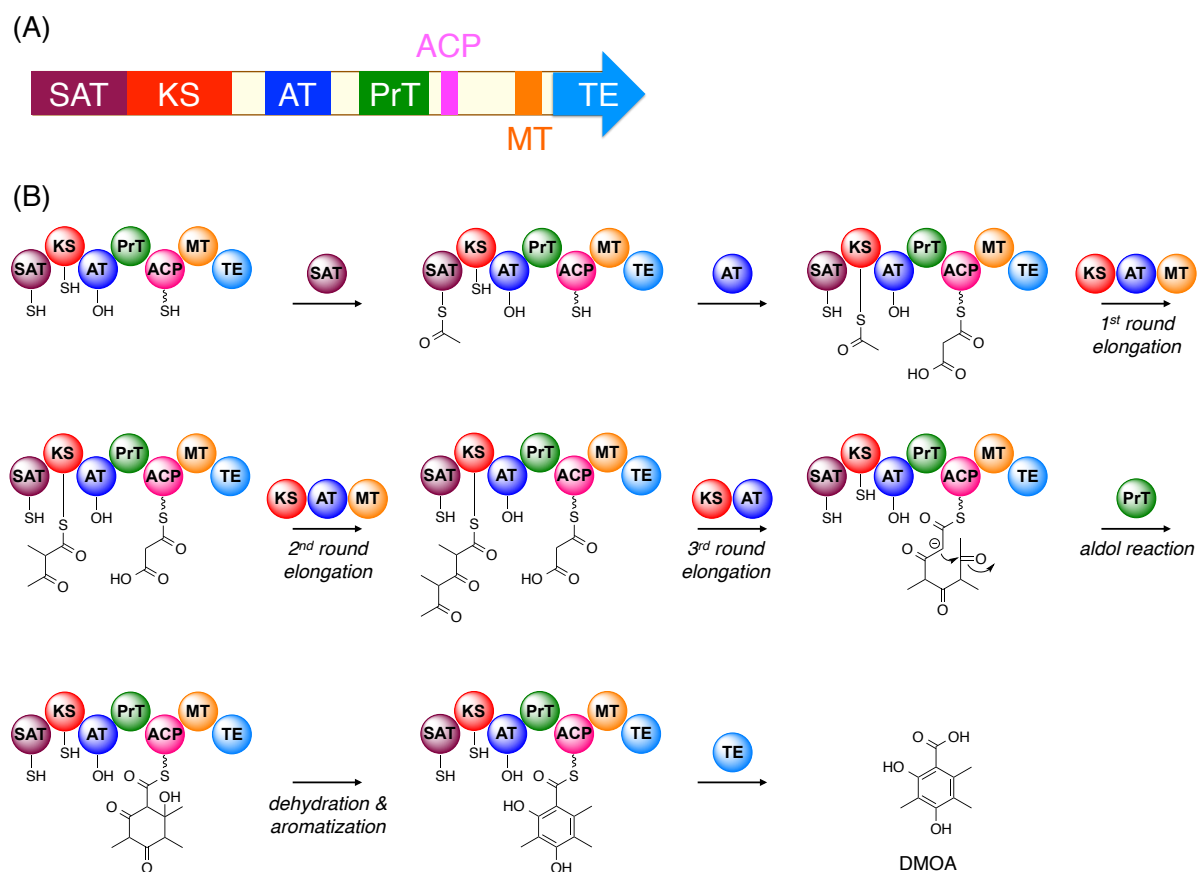


Figure 1-9. (A) Domain architecture of DMOA synthase. (B) Mechanism of the DMOA formation by DMOA synthase.

iPKS はさらに、非還元型 (non-reducing: NR)、部分還元型 (partially reducing: PR)、高度還元型 (highly reducing: HR) の 3 種に分類される。NR-iPKS とは KR、DH、ER のいずれも有さないもの、PR-iPKS とは ER は有さず KR、DH の両方または KR のみを有するもの、HR-iPKS とは KR、DH、ER の全てを有するものを指す。本研究で研究対象とする DMOA は NR-iPKS によって合成される。NR-iPKS には、上述のドメインに加えて SAT および PrT ドメインが含まれる点で特徴的である^{49, 50}。PR-iPKS や HR-iPKS の反応においては、開始基質も伸長鎖基質も同一の AT によってロードされるが、NR-iPKS の場合は、SAT ドメインが開始基質のロードを担っている。また、PrT ドメインは鎖長や環化様式の制御に関与することが知られている。DMOA 合成酵素のドメイン構造は SAT-KS-AT-PrT-ACP-MT-TE であり (Figure 1-9A)、acetyl-CoA を開始基質として 3 分子の malonyl-CoA が縮合するが、本酵素は、伸長反応の過程で 2 度のメチル化も触媒する。アルドール反応による閉環反応後、脱水、芳香化を経て、最終的に TE ドメインの働きを受けて酵素より解離し DMOA を生じるものと考えられる (Figure 1-9B)。

糸状菌由来 iPKS に関しては、各ドメインの X 線結晶構造解析なども含め、すでに多くの研究がなされているが、伸長回数の多寡、あるいは各触媒サイクルにおいて機能するドメインを決定する因子については未だ明確な解は得られておらず、今後のさらなる解析が待たれている。

1-4-3. プレニル基転移酵素

プレニル基転移酵素 (PT) は、その機能に応じていくつかのグループに大別される。ひとつは、ゲラニル二リン酸 (GPP)、ファルネシル二リン酸 (FPP)、ゲラニルゲラニル二リン酸 (GGPP) などの直鎖状ポリプレニル二リン酸の合成を担う酵素である。また、タンパク質やペプチドの側鎖のプレニル化を触媒する酵素も広く知られている。加えて、プレニル基受容体の水酸基、カルボキシル基、アミノ基に対してプレニル基を導入する酵素も存在する。芳香環にプレニル基を導入する aromatic prenyltransferase は、特に二次代謝産物の生合成に広く関与しており、天然物の構造多様化に大きく寄与している酵素である⁵¹。糸状菌メロテルペノイドの生合成においては、aspermidine A 生合成に関わる *O*-farnesyltransferase (PkfE) の様な例も存在するものの⁵²、多くの場合において aromatic prenyltransferase によってプレニル基が導入されるものと考えられる。以下では、これまでに機能解析がなされている糸状菌メロテ

ルペノイド生合成に関与する PT の例を挙げながら、その機能や特徴について述べる。

Pyrripyropene A 生合成においては、Pyr6 が HPPO のファルネシル化を触媒する (Figure 1-10A) ⁴³。本反応においては、FPP の二リン酸基が脱離することでアリルカチオンを生じた後、これが HPPO の芳香環を求電子攻撃することで炭素-炭素結合が形成され、最終的に脱プロトン化によって反応が完結する。本酵素は 9 回膜貫通型タンパク質と予想されており、ユビキノン生合成に関わる UbiA (Figure 1-10B) と相同性を有する ⁵³。Pyr6 のホモログは、DMOA 由来メロテルペノイドの生合成にも関与することが知られており、terretonin および austinol の生合成においてはそれぞれ Trt2 または AusN が、同様の反応によって DMOA のファルネシル化を担うことが知られている (Figure 1-10C) ^{54,55}。しかしながら、Trt2/AusN の反応においてはファルネシル化によって基質の芳香族性が失われるという点で Pyr6 とは異なっている。この結果、反応産物には不斉炭素が生じるが、その立体化学の直接的な証明はなされていない。しかしながら、後続の生合成中間体の絶対立体配置を踏まえ、この位置の立体化学は *R* であると推定されている ⁵⁶。他方で、mycophenolic acid 生合成においてファルネシル化を担うとされる MpaA もまた UbiA タイプの PT であり、本酵素は PKS により生じた 5-methylorsellinic acid (5-MOA) に由来するフタリド化合物を基質とするが、この場合には芳香族性が喪失することはない (Figure 1-10D) ⁵⁷。

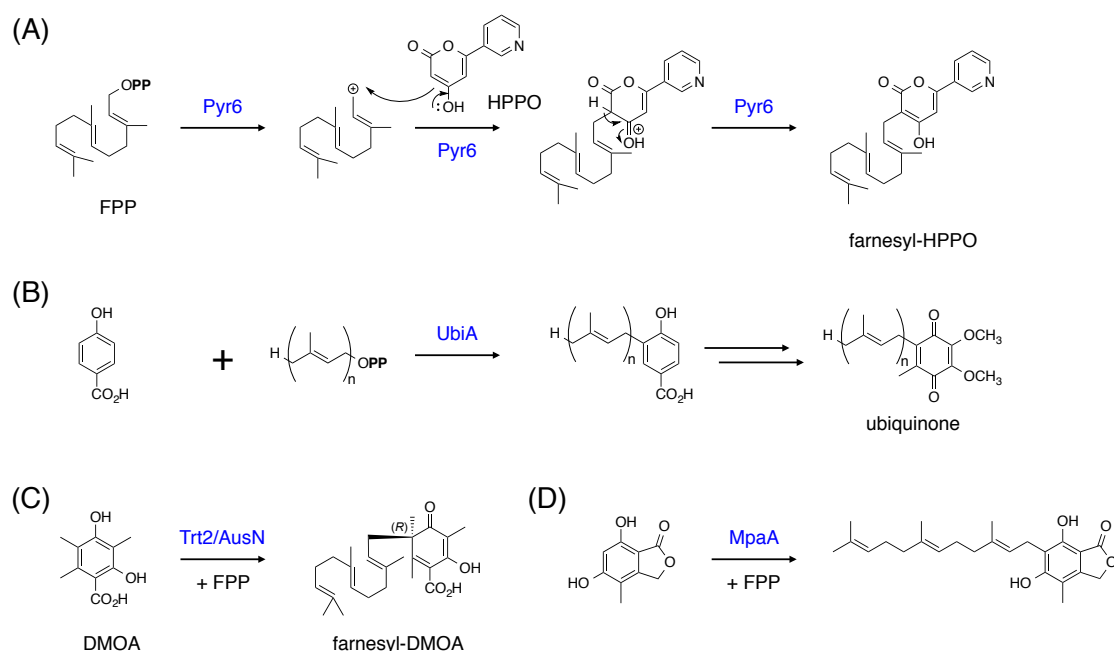


Figure 1-10. (A) Prenylation reactions catalyzed by (A) Pyr6, (B) UbiA, (C) Trt2 or AusN, and (D) MpaA.

つづいて、インドールジテルペンの生合成に関わる PT について述べる。インドールジテルペンとは 3-geranylgeranyl indole (GGI) に由来する一連の化合物群であり paxilline⁵⁸、afatrem⁵⁹、lolitrem B⁶⁰、penitrem A⁶¹ などが代表的な化合物として知られる (Figure 1-11)。非テルペノイド部位はポリケタイドに由来しないものの、その生合成において、プレニル化→エポキシ化→環化というプロセスを経る点では、上述のポリケタイド由来メロテルペノイドの生合成とよく類似している。GGI を合成する PT として知られる PaxC は indole-3-glycerol phosphate (IGP) と GGPP を基質として GGI を合成する (Figure 1-12)⁶²。PaxC は上記の UbiA タイプの PT とは相同性を有さない可溶性のタンパク質であるが、反応機構としては同様にニリン酸基の脱離によって開始するものと考えられる。なお、afatrem の構造に見られるように、インドールジテルペンの中にはインドール環にジメチルアリルニリン酸 (DMAPP) に由来する C-5 単位が付加した化合物も存在する。この C-5 単位の導入もまた PT によって触媒される反応であるが、本反応は生合成の中後期に起こる反応であり、基本骨格を構築する PT とはその性格を異にする⁶³。

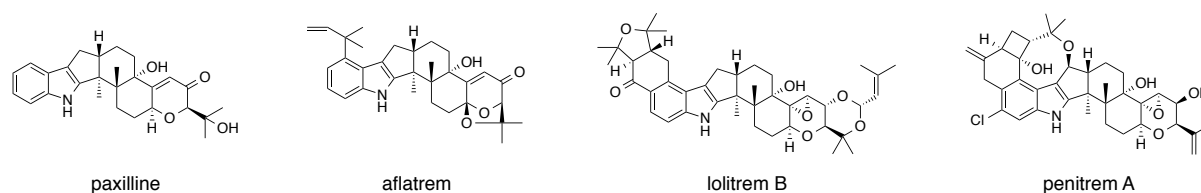


Figure 1-11. Representative fungal indole-diterpenoids.

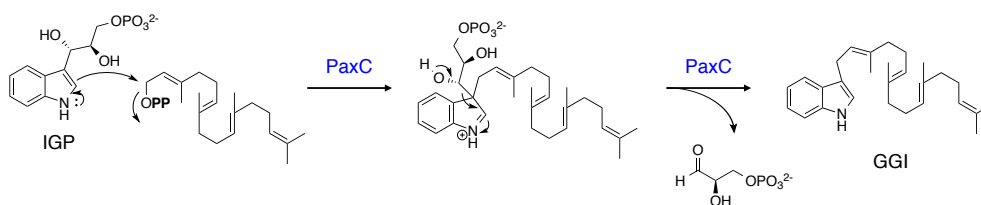


Figure 1-12. Proposed reaction mechanism of the PaxC-catalyzed geranylgeranylation.

1-4-4. テルペン環化酵素

糸状菌メロテルペノイド生合成において PT によって導入されたプレニル基は、多くの生合成経路においてテルペン環化酵素による閉環反応を受ける。テルペン環化酵素は直鎖状の基質を用いて、多数の炭素-炭素結合ならびに不斉中心を一挙に構築するという、酵素反応の中

でも最も複雑な反応を触媒する酵素である⁶。したがって、メロテルペノイドの構造多様性を生み出す上でも、テルペン環化酵素は重要な役割を果たしていると考えられる。

テルペン環化酵素は、その反応開始様式に応じて Class I と Class II の二つに大別される。Class I テルペン環化酵素は、プレニル二リン酸の二リン酸基の脱離に伴うアリルカチオンの生成を反応の基点とする酵素であり、artemisinin 生合成に関わる amorphaadiene synthase⁶⁴ や taxol 生合成における taxadiene synthase⁶⁵ などが代表的な例である (Figure 1-13A, B)。Class II テルペン環化酵素は、二重結合やエポキシドのプロトン化によって環化反応を引き起こす酵素であり、*ent*-copalyl pyrophosphate synthase⁶⁶ や lanosterol synthase⁶⁷ などが知られる (Figure 1-13C, D)。テルペノイドは 50000 以上の分子種が知られる極めて巨大な化合物群であり、したがって、その生合成に関わるテルペン環化酵素については、すでに多数の酵素が同定、機能解析されるとともに、反応機構や酵素の立体構造などに関しても広く研究がなされてきた。以下では、糸状菌メロテルペノイド生合成に参与するテルペン環化酵素について述べる。

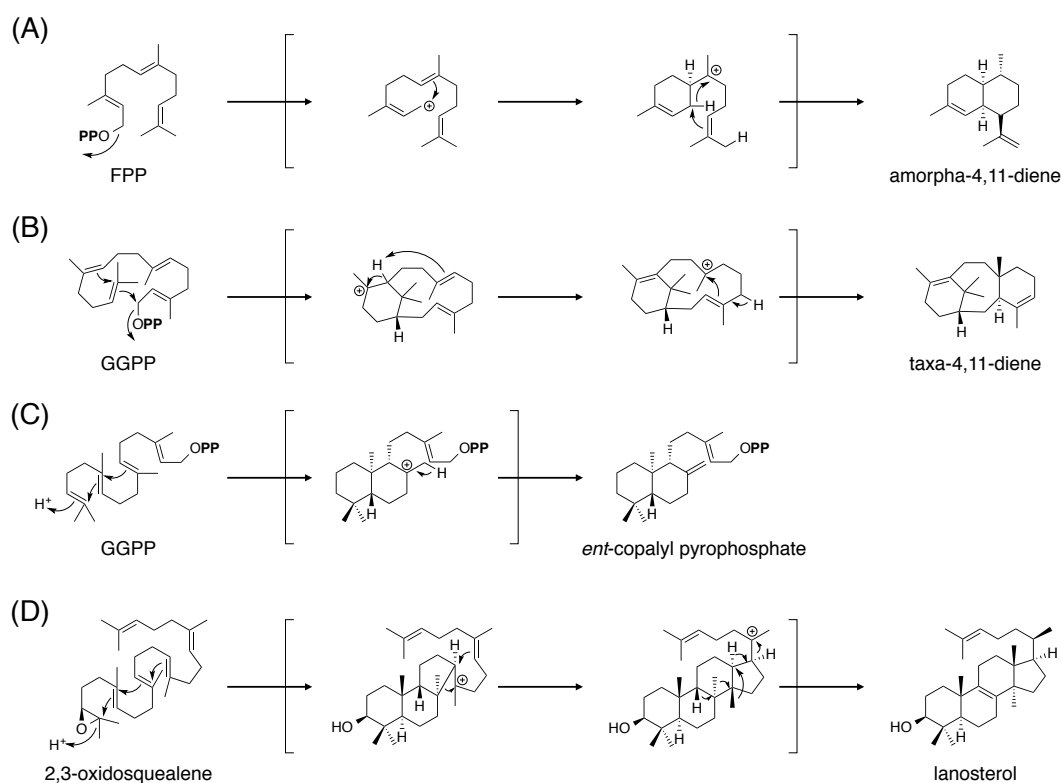


Figure 1-13. Terpene cyclization reactions catalyzed by (A) amorphaadiene synthase, (B) taxadiene synthase, (C) *ent*-copalyl pyrophosphate synthase, and (D) lanosterol synthase.

先述の pyripyropene A 生合成においては、テルペン環化酵素 Pyr4 はエポキシドへのプロトン化によって反応を開始すると考えられており、lanosterol synthase と類似した Class II テルペン環化酵素に分類される (Figure 1-14) ⁴³。しかしながら、興味深いことに Pyr4 は 7 回膜貫通型タンパク質と予想され、これまで広く研究されてきた Class II テルペン環化酵素とは全く配列同一性を示さないことから、新規テルペン環化酵素として同定された。

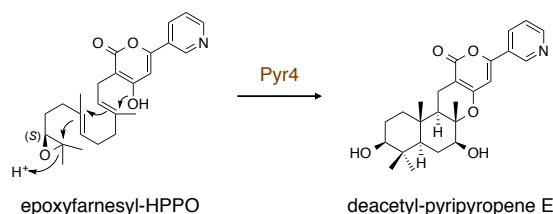


Figure 1-14. Reaction catalyzed by seven-transmembrane terpene cyclase Pyr4

Pyr4 のホモログは DMOA 由来メロテルペノイド生合成にも関与することが判明しており、terretonin 生合成においては Trt1 が austinol 生合成においては AusL が、いずれも同一の基質である epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester を閉環し、Trt1 は preterretonin A を AusL は protoaustinoid A をそれぞれ与える (Figure 1-15) ⁵⁶。両酵素の反応特異性の違いは、反応終結の際の脱プロトン化の位置に起因すると考えられる。ここで Trt1 や AusL とは異なり、C-11 位のプロトンが引き抜かれて反応が終結すれば、andrastin A などの天然物の生合成前駆体が生じるものと期待されるが、このような酵素は未同定である。重要なことに、Trt1 および AusL の環化反応が進行するためには、ファルネシル化の後に DMOA に由来するカルボキシル基がメチル基転移酵素 Trt5 によってメチル化される必要があり、メチルエステルを有さない基質アナログは環化酵素の基質とならないことが明らかにされている ⁵⁶。なお、エポキシドは FMO である Trt8 により導入される。これら 3 つのテルペン環化酵素の基質中のエポキシドの立体化学に関しては直接の決定はなされていないが、後続の生合成中間体の構造を基に、Pyr4 の基質は *S* 体である一方で Trt1 および AusL の基質は *R* 体であると推定されている ⁵⁶。

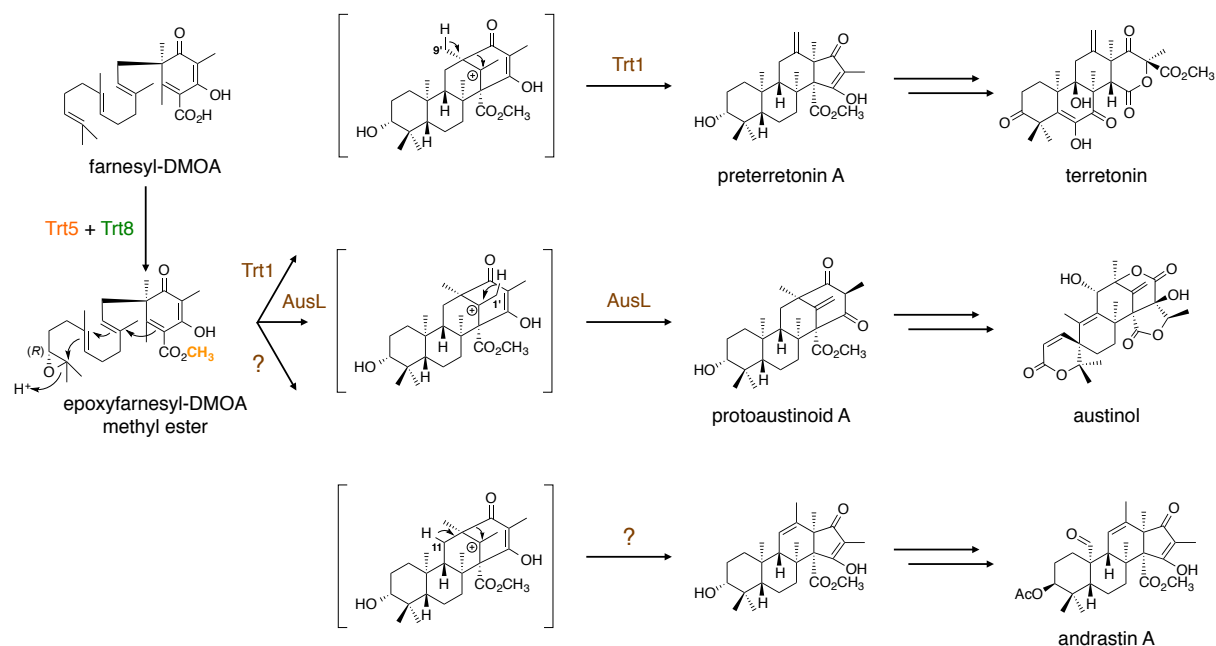


Figure 1-15. Terpene cyclases involved in the biosynthesis of DMOA-derived meroterpenoids.

加えて、Pyr4 に類似したテルペン環化酵素はインドールジテルペンの生合成にも関与しており、特に paxilline 生合成に関わる PaxB に関しては詳細な機能解析がなされている⁶²。本生合成においては、まず GGI のゲラニルゲラニル基の末端から二番目の二重結合が FMO (PaxM) によってエポキシ化を受けたのち、PaxB が環化反応を触媒し、五環性の中間体 emindole SB を与える。本化合物は、同一のエポキシダーゼによって再度エポキシ化を受け、これを PaxB が閉環することで最終的に六環性の paspaline が生成する (Figure 1-16)。

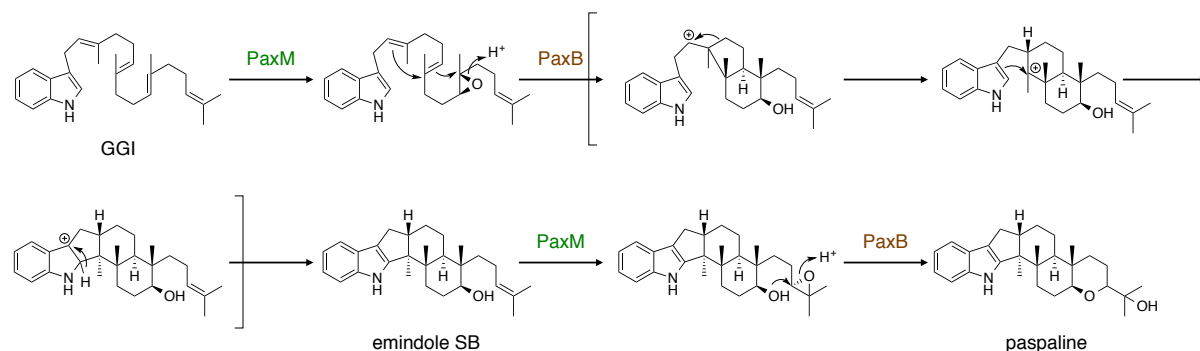


Figure 1-16. Reactions catalyzed by PaxM and PaxB.

他方で、Class I テルペン環化酵素が糸状菌メロテルペノイドの生合成に関与する例も知られている。Fumagillin は pyripyropene A などと同様にポリケタイドとテルペノイドに由来するメロテルペノイドであるが、その生合成機構は大きく異なっている。本生合成においてテルペン環化酵素 Fma-TC は、FPP を基質として環化反応を触媒し β -trans-bergamotene を合成する

(Figure 1-17) ⁶⁸. 本化合物は種々の修飾反応を受けて fumagillol へと変換されたのち、別途 PKS によって合成されたドデカペンタエン酸と縮合して fumagillin の生合成前駆体 prefumagillin を与える。興味深いことに、Fma-TC は 6 回膜貫通型タンパク質と予想されており、Pyr4 を含めこれまで既知のテルペン環化酵素とは配列相同性を有さない新規のテルペン環化酵素である。

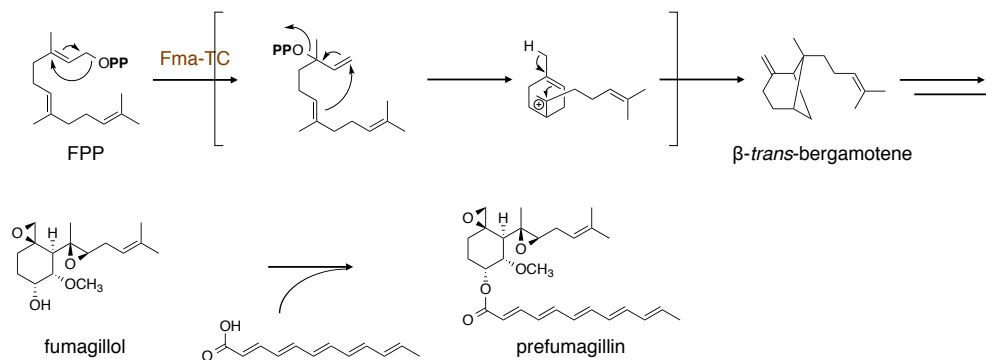


Figure 1-17. Cyclization reaction catalyzed by Fma-TC and biosynthetic pathway leading to prefumagillin.

その他特殊な例として、viridicatumtoxin 生合成におけるゲラニル基の閉環反応は P450 (VrtK) によって触媒されることが知られている ⁶⁹. 本反応は、水素原子の引き抜きによって開始すると推定されており (Figure 1-18)、反応機構の面でも他のテルペン環化酵素とは大きく異なっている。

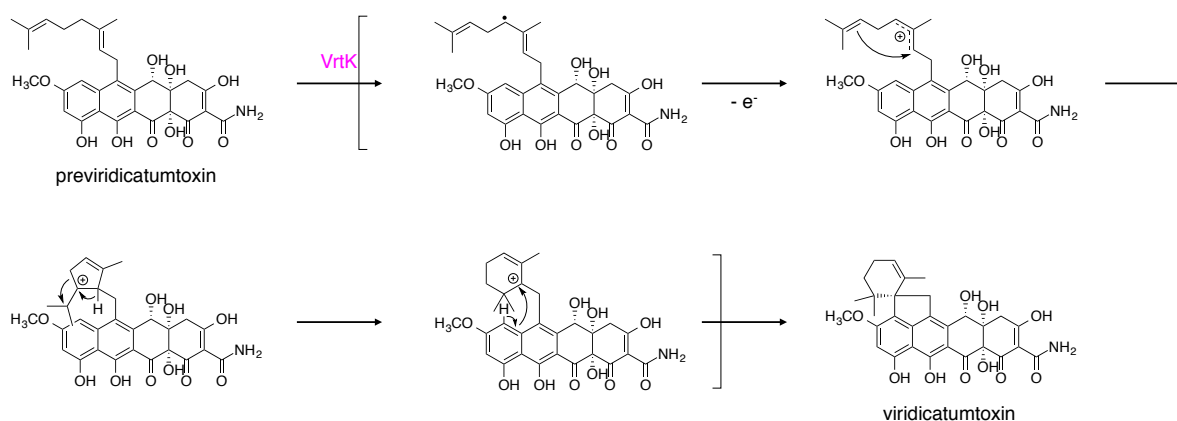


Figure 1-18. VrtK-catalyzed cyclization of the geranyl moiety in the viridicatumtoxin biosynthesis.

1-4-5. 修飾酵素群

糸状菌メロテルペノイド生合成の中後期段階においては、通常、種々の修飾酵素が機能することで基本骨格の官能基化や骨格変換が行われる。修飾反応に関しては、個々の生合成経路における多様性が非常に大きいため、本項では、DMOA 由来メロテルペノイドのうち terretonin および austinol に関して、すでに得られている知見を述べることで、修飾反応の多様性を紹介することとしたい。

Terretonin の生合成遺伝子クラスター(*trt* クラスター)は全 10 遺伝子からなり (Figure 1-19)⁷⁰、そのうち 5 遺伝子が環化中間体 preterretonin A の生合成に関与することが明らかにされている⁵⁶。したがって、残りの 5 つの遺伝子が修飾酵素をコードするものと考えられる。これらの機能については遺伝子破壊実験を通じて研究がなされており、以下のような経路が提唱されている⁷⁰。まず、preterretonin A の 3 位水酸基が短鎖型脱水素酵素/還元酵素 (SDR) Trt9 によって酸化され preterrenoid となったのち、FMO である Trt3 による水酸化を受けて terrenoid へと変換される (Figure 1-20)。Terrenoid は P450 をコードする *trt6* を破壊した際に蓄積することが判明しており、terrenoid は Trt6 によってさらに酸化されることが期待されるが、その生成物は明らかにされなかった。また、NHI をコードする *trt7* を破壊した場合には、一切の生合成中間体が蓄積しなかったことから、その機能は不明なままであった。興味深いことに、*trt14* 破壊株からは terretonin が検出されなかったものの、terretonin のメチルエステル基を欠いた terretonin C が得られることが判明している (Figure 1-20)。Trt14 はこれまでに酵素学的レベルで機能解析がなされたタンパク質とはほとんど配列相同性を示さないタンパク質であるが、この結果を踏まえると、Trt14 は何らかの形で terretonin のメチルエステル形成に寄与するものと考えられる。

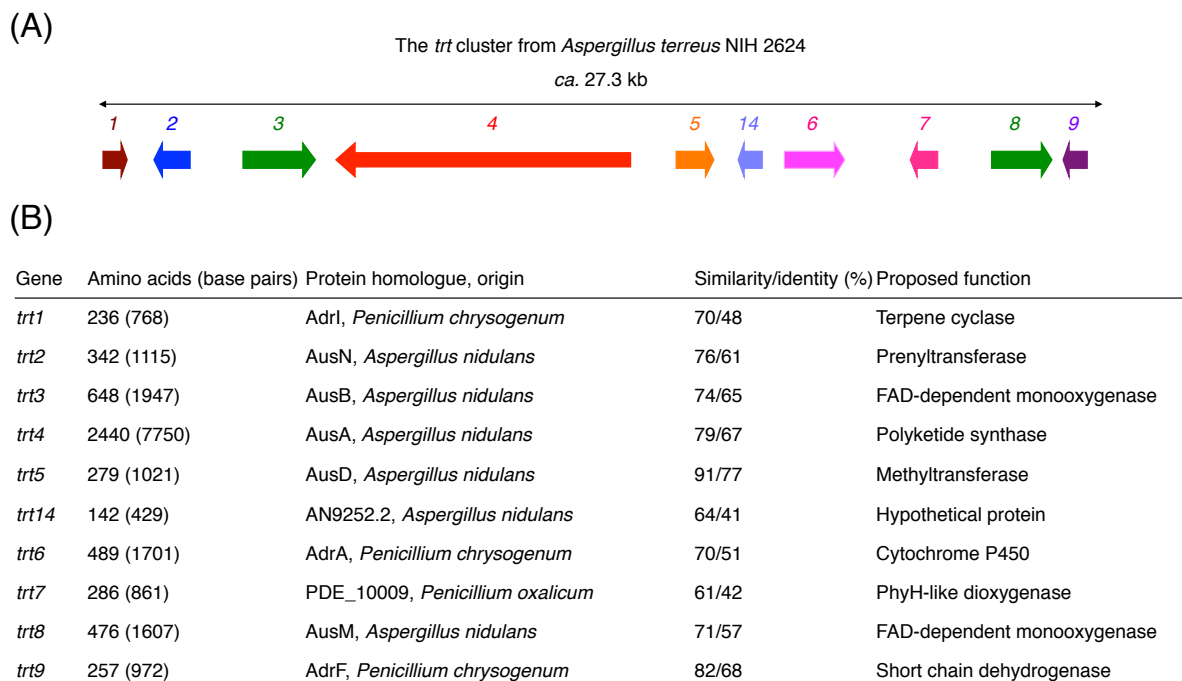


Figure 1-19. (A) Schematic representation of the *trt* cluster. The direction of the arrow indicates the direction from the start to the stop codon. (B) Annotation of each protein in the *trt* cluster. The deduced function of each open reading frame (ORF) and the amino acid sequence similarity/identity, as compared with the homologues found by a BLAST search at NCBI, are shown.

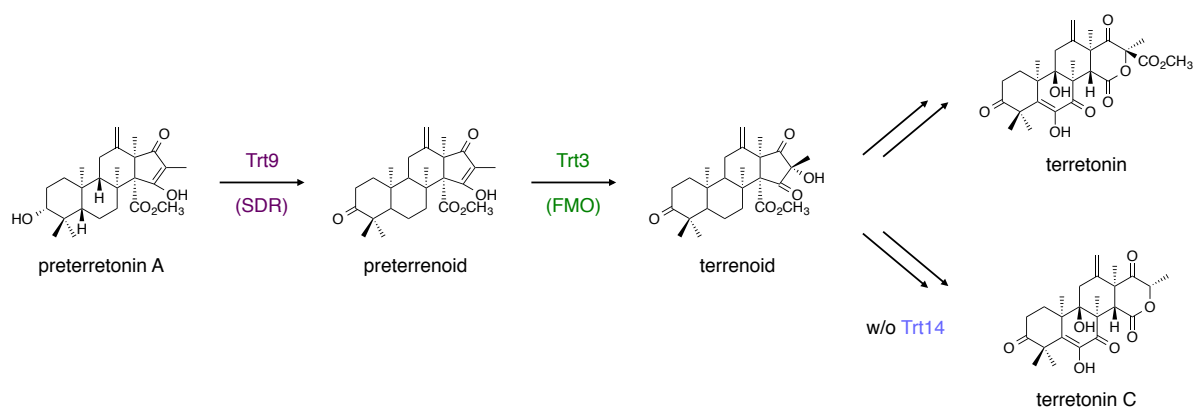


Figure 1-20. Mid-stage biosynthesis of terretonin.

Austinol の生合成遺伝子群は *Aspergillus nidulans* の染色体上で二カ所に分かれて存在することが知られており、少なくとも 14 個の遺伝子とその生合成に関与することが判明している (Figure 1-21) ⁵⁵。本生合成経路においても、terretonin 生合成と同様に 5 つの酵素が最初の環化中間体 protoaustinoid A の生合成を担っている ⁵⁶。Austinol 生合成の中後期段階も遺伝子破壊実験による解明が試みられている ⁵⁵。その結果として、protoaustinoid A が、スピロラクトンを有する preaustinoid A3 へと変換されることが示唆されているが、その変換に関わる酵素群については、FMO をコードする *ausB* を破壊した際に protoaustinoid A が蓄積することが知られるのみであり、その他の酵素や詳細な変換反応のメカニズムについては未だ不明のままである。

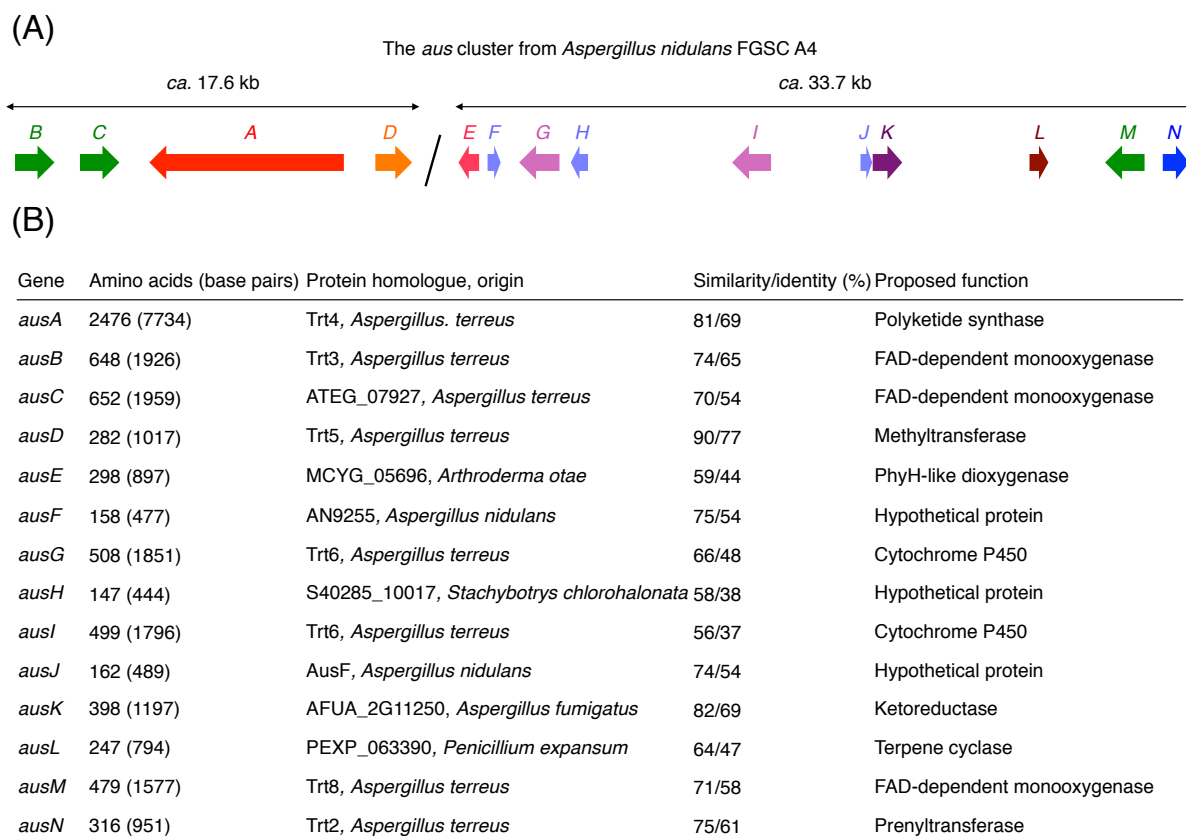


Figure 1-21. (A) Schematic representation of the *aus* cluster. The direction of the arrow indicates the direction from the start to the stop codon. (B) Annotation of each protein in the *aus* cluster. The deduced function of each open reading frame (ORF) and the amino acid sequence similarity/identity, as compared with the homologues found by a BLAST search at NCBI, are shown.

Preaustinoid A3 は先述した Trt14 のホモログである AusJ による異性化反応を経て preaustinoid A4 へと変換される。本化合物は続いて、アルドケト還元酵素 (AKR) AusK および、やはり Trt14 のホモログである AusH の共反応によって γ -ラク톤を有する isoaustrinone となる。本化合物はさらに二つの P450 (AusI および AusG) による Baeyer-Villiger 酸化ならびに水酸化を受けて austinol へと変換される (Figure 1-22)。なお、*A. nidulans* は austinol の脱水素体である dehydroaustinol も生産することが知られるが、austinol を dehydroaustinol へと変換する酵素は明らかになっていない⁵⁵。このように、austinol 生合成はその大部分が明らかにされているが、preaustinoid A3 の合成経路やスピロラク톤の形成機構は不明のままであり、その解明が待たれている。

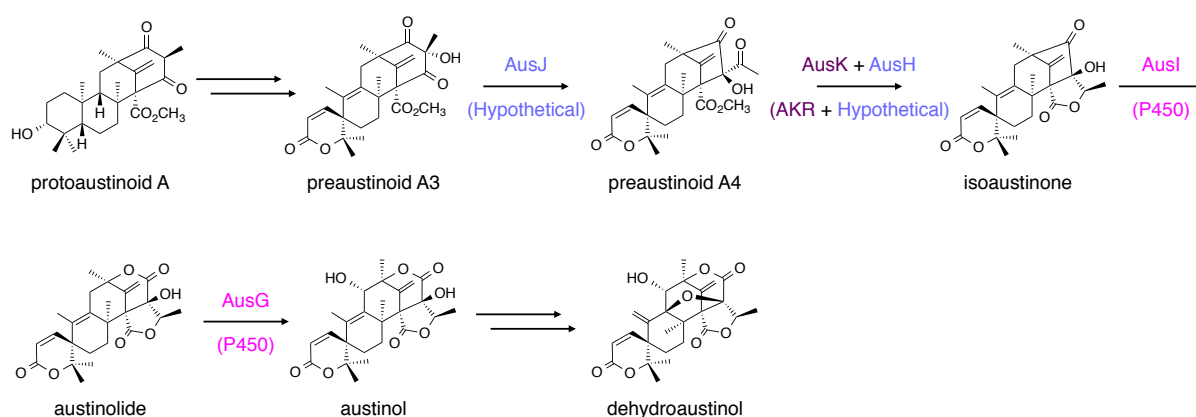


Figure 1-22. Late-stage biosynthesis of austinol and dehydroaustinol.

1-5. 生合成研究の方法論

天然物の生合成研究には先述のとおり、同位体の取り込み実験が広く行われてきたが、近年では天然物の生産者のゲノム情報を比較的容易に入手できることから、生合成研究は酵素・遺伝子レベルで行われることが多い。本項では、酵素・遺伝子レベルでの糸状菌由来天然物の生合成研究の方法論についてまとめる。

最初の段階として、標的化合物の生合成遺伝子クラスターの情報を入手する必要がある。研究対象とする生物のゲノム情報が公開データベース中に存在する場合はその中に候補遺伝子群を探索するが、ゲノム情報が公開されていない生物を扱う場合は、研究に先立ってゲノムシーケンス解析を実施するか、当該生物のゲノムライブラリーを調製する。ただし、以前はゲノムライブラリーから目的の遺伝子クラスターを探索することも広く行われていたが、今日ではゲノムシーケンス解析のコストが安価になったため、ゲノムシーケンス解析が実施

されることが多くなっている。ゲノム情報が入手できれば、つづいて目的の遺伝子クラスターをゲノム中に探索する。標的化合物の分子構造をもとに、どのような生合成遺伝子が関与するかを予想し、その基準に一致する遺伝子クラスターを検索する。たとえば、本研究で対象とするメロテルペノイド化合物の場合、その生合成には PKS、PT、テルペン環化酵素が関与することが推定される。したがって、これらの酵素群をコードする遺伝子がまとまって存在する領域を探すことによって、推定生合成遺伝子クラスターを見出すことができる。

標的化合物の生合成に関与すると思われる遺伝子クラスターが発見されれば、引き続いて、その機能解析を実施する必要がある。機能解析の方法論は、①遺伝子破壊実験、②異種発現系構築、③精製酵素を用いた実験、の大きく三つに分けられる。以下に、各方法論について詳述する。

第一に、遺伝子破壊実験とは、クラスター中に存在する遺伝子をそれぞれ破壊した際の表現型の変化を精査することで、各遺伝子の機能や生合成経路を推定するというものである。すなわち、ある遺伝子を破壊した際に、研究対象とする化合物が生成しない代わりに野生型では見られない化合物が蓄積したならば、その化合物は破壊した遺伝子のコードする酵素の基質である可能性が高い。このように、各遺伝子を順次破壊した際に蓄積する化合物を網羅的に明らかにすることで、生合成経路全体を推定することも可能になる。本法は、事前にほとんど生合成経路を予想できないような場合でも、遺伝子を順次破壊するという単純な手法によって、各遺伝子の機能や生合成経路の推定を行える点で、非常に強力な手法であると言える。しかしながら、本法にはいくつかの問題点も存在する。ひとつは、遺伝子破壊の結果、一切の生合成中間体が蓄積しないケースが少なからず存在することである。先述した *terretonin* や *austinol* の生合成研究においても、遺伝子破壊を行った際に中間体の蓄積が見られなかった酵素遺伝子がいくつか存在しており^{55,70}、全生合成経路の解明には至っていない。また、糸状菌においては通常、遺伝子破壊の効率が非常に低いことも問題点である。遺伝子破壊は、一般的には DNA の相同組換えを用いて行われるが、糸状菌の場合は相同組換えよりも非相同組換えが優先するため、目的の破壊株を得るために多数の形質転換体を精査する必要があることもある。なかには、遺伝子破壊の成功率が 0.1% という例も存在する⁷¹。この問題を解決するための手法として、あらかじめ相同組換えに関与する酵素遺伝子を破壊した株が用いられる場合も多いが、いずれにしても最初の遺伝子破壊の成功率が低いという問題点は残されたままである。

第二の手法として、異種発現系の構築が挙げられる。これは、単独あるいは複数の生合成遺伝子を適当な異種宿主に導入し、新たに生成する代謝物を明らかにすることで、導入した

遺伝子の機能を推定しようとするものである。この際、生合成遺伝子クラスター全体を導入することもある。異種宿主としては、大腸菌、酵母、糸状菌などが用いられる。本法の利点としては、適切な宿主や遺伝子発現システムを利用することで、生産菌では生産量が低い化合物であっても、高収量で獲得することができる点が挙げられる。遺伝子破壊実験では明らかにされなかった生合成経路が、異種発現系構築を通じて確立された例も知られており⁶²、生合成中間体を大量に調製可能という点において優れた手法であると言える。糸状菌由来の生合成遺伝子を扱う場合の異種宿主としては、酵母のほか⁷²、糸状菌 *Aspergillus oryzae*⁷³⁻⁷⁵ や *Aspergillus nidulans*^{76,77} などが汎用されており、すでに多数の成功例が報告されている。当研究室においても、*A. oryzae* を用いた生合成研究をすでに複数報告している^{43, 54, 56}。

本手法の欠点としては、導入すべき遺伝子の選択ならびに異種宿主での遺伝子発現の二点に関する問題が挙げられる。異種発現系構築に際しては、どの遺伝子を発現させるのかを決定する必要があるが、仮にある遺伝子を発現させたとしても、その遺伝子産物の基質が異種宿主内で供給されなければ、表現型（代謝物プロファイル）には変化が生じず、その遺伝子の機能を明らかにすることもできない。すなわち、発現系構築の前段階として、生合成経路や生合成酵素の働く順番などについて、ある程度予想可能である必要がある。しかしながら、特に生合成の中後期段階については、経路の予測が容易ではないことも多く、この点で困難を生じうる。また、たとえ適当な遺伝子を導入したとしても、異種宿主の中で発現しないケースも存在する。例えば、クラスターの全体や一部をインタクトな状態で異種宿主に導入する場合、導入遺伝子の発現はネイティブプロモーターが異種宿主内で機能するか否かに依存する。したがって、異種宿主内にネイティブプロモーターを認識する転写因子が存在しない場合、当該遺伝子は発現しない。また、スプライシング機構の相違が問題になるケースも存在する。これらの問題点の解決策としては、強力なプロモーターの下流に目的遺伝子のコーディング領域を導入する、遺伝子クラスター内に転写因子がコードされている場合は当該転写因子を異種宿主内で過剰発現させる⁷⁷、糸状菌二次代謝のグローバルな制御因子として知られる *laeA* を過剰発現させる⁷³、イントロンフリーの cDNA を調製した上で異種宿主に導入する、などの手法がとられることが多い。しかしながら、あらゆる糸状菌の生合成遺伝子の効率的発現に適したホストは未だ存在せず、今後のさらなる発展が望まれている。

第三の手法は、精製酵素を用いた実験である。目的の酵素タンパク質を適切な異種宿主にて大量発現させたのちに精製するか、あるいは当該酵素の生産者より直接精製することで、標的タンパク質を得て、これを用いた *in vitro* のアッセイを実施する。目的の酵素の遺伝子配列が既知の場合には、一般的に前者の手法がとられる。異種宿主としては、大腸菌が用いら

れることが多いが、発現させるタンパク質の特性に応じて酵母などが用いられることもある。本法の利点としては、まず酵素機能の証明が可能になることが挙げられる。上述の遺伝子破壊や異種発現系構築は、いずれも生合成経路の推定における強力な手法ではあるが、あくまで、破壊あるいは導入した遺伝子がある化合物の生成に何らかの形で関与することを示すのみであり、酵素機能の完全な証明とはならない。精製酵素を用いた実験により、他の生体内分子の存在を排除した上である反応が進行することを確認できれば、当該酵素が真にその反応を担うという証明となる。また、精製酵素を用いることで、速度論的パラメーターの取得や基質特異性の検討など、酵素の生化学的な性状を明らかにすることもできる。加えて、酵素の立体構造を明らかにすべく X 線結晶構造解析を実施する場合には、高度に精製された酵素の調整が必須である。以上のように本手法は、酵素自体に焦点を当てた研究を実施する上では非常に重要であるが、研究に先立って、酵素反応の基質を調製する必要がある。遺伝子破壊や異種発現系構築によって得られた生合成中間体を用いることができるが、その場合はこれらの実験も同時に行う必要がある。また、基質と考えられる化合物が合成化学的に調製されることもあるが、複雑な天然物が基質となる場合、その合成には困難が伴う可能性が高い。加えて、酵素の反応性や基質の入手しやすさなどにも依存するが、一般的に、本法は大量合成には適さない。

以上の三つの手法はそれぞれ一長一短であり、生合成研究においては複数の手法が用いられることが多い。なお、本研究では、異種発現系構築と精製酵素の利用によって、天然物生合成経路の解明を試みる。

1-6. 本研究の目的

本研究は、DMOA 由来メロテルペノイド化合物に着目し、その生合成分子基盤を網羅的に解明するとともに、構造多様性が生じる機構についての知見を得ることを目的とする。特に、andrastin A、austinol、anditomin の三つの化合物を研究対象とし (Figure 1-23)、その生合成の全容を明らかにする。Andrastin A 生合成には、先述のとおり既知の酵素とは機能 (生成物) を異にするテルペン環化酵素の関与が示唆されており、当該環化酵素を同定できれば、「テルペノイド部位の環化反応」というメロテルペノイドの構造多様化における重要な因子に関する新たな知見が得られるものと考えられる。また、austinol と anditomin はそれぞれ、スピロラクトンならびに分子内架橋構造という非常に特異な分子骨格を有しており、これら両化合物の生合成研究は、ユニークな反応を触媒する酵素の発見に繋がるものと期待される。さら

に、一連の研究を通じて DMOA 由来メロテルペノイド生合成遺伝子群の情報が蓄積することで、糸状菌が如何にして単純なビルディングブロックから複雑な分子を構築するかについての理解が深まるはずである。ひいては、「異なる糸状菌に由来する生合成経路（遺伝子群）を再構成し、人工的な代謝経路を創出することで新規有用物質を獲得する」という将来的な研究の足掛かりにもなるものと期待される。上記の理由から、新奇酵素の発見ならびに有用物質生産への応用を目指して、研究を開始するに至った。

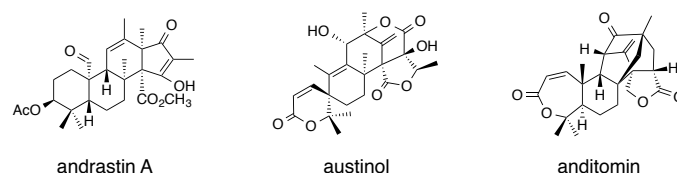


Figure 1-23. Fungal meroterpenoids studied in this study.

1-7. 本論文の構成

第2章では、*Penicillium chrysogenum* のゲノムデータベース中に andrastin A 生合成遺伝子クラスターを同定するとともに、生合成の全容を解明した。その過程で、新規テルペン環化酵素 AdrI を見出し、本酵素が TrtI や AusL と同一の基質を受容しながらも異なる閉環産物を与えることを明らかにした。

第3章では、*Aspergillus nidulans* に由来する austinol 生合成に関与する三つの酸化酵素の機能解析を行い、遺伝子破壊実験では明らかにされなかった protoaustinoid A から preaustinoid A3 に至る生合成経路を解明した。本経路においてジオキシゲナーゼ AusE が、多段階の酸化反応を触媒するとともに、スピロ環形成を担うことを見出した。

第4章では、*Emericella varicolor* のゲノム中に anditomin 生合成遺伝子クラスターを見出すとともに、全生合成経路の解明に成功した。その結果として、ジオキシゲナーゼ AndA が非常に奇異な骨格変換を行うことで anditomin の分子内架橋構造が生成することが判明した。

第5章では、本研究を総括するとともに、今後の展望などについても述べる。

第2章 Andrastin A の生合成研究

2-1. 背景・目的

Andrastin A-D (1-4, andrastin 類) は、糸状菌 *Penicillium* sp. FO-4259 より Ras ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤として単離されたメロテルペノイドであり⁷⁸⁻⁸⁰、複数の *Penicillium* 属糸状菌により産生されることが知られる (Figure 2-1A)⁸¹。がん遺伝子産物 Ras の活性化にはそのファルネシル化が必須であることから⁸²、andrastin 類は新規抗がん剤のリード化合物として期待されている。さらに、andrastin A はおそらく P 糖タンパク質を阻害することで、抗がん剤 vincristine 耐性細胞の薬剤耐性を克服する作用を有している⁸³。このような特異な生物活性と分子構造ゆえに、すでに合成研究もなされているが⁸⁴、現在のところ andrastin 類の全合成の報告はない。また、同位体標識化合物を用いた生合成研究は行われているが⁸⁵、andrastin 類の生合成遺伝子も未だ報告例がない。したがって、andrastin 類の生合成分子基盤を解明できれば、生合成酵素を利用した andrastin 類ならびにその類縁体の合成なども可能となる。

加えて、第一章にて述べた通り andrastin 類は、terretonin や austinol と同じく epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester (5) を中間体として生合成される一方で、両化合物生合成に関わるテルペン環化酵素とは機能を異にする酵素が関与することで、共通のカチオン中間体 6 を経て異なる閉環産物 7 が生じるものと予想される (Figure 2-1B)。したがって、andrastin 類の生合成研究は、新規機能を有するテルペン環化酵素の同定のみならず、これまで既知の環化酵素との比較解析による反応多様性創出機構の解明にも繋がることが期待される。以上のことを踏まえ、andrastin 類の生合成全容解明を目指すこととした。

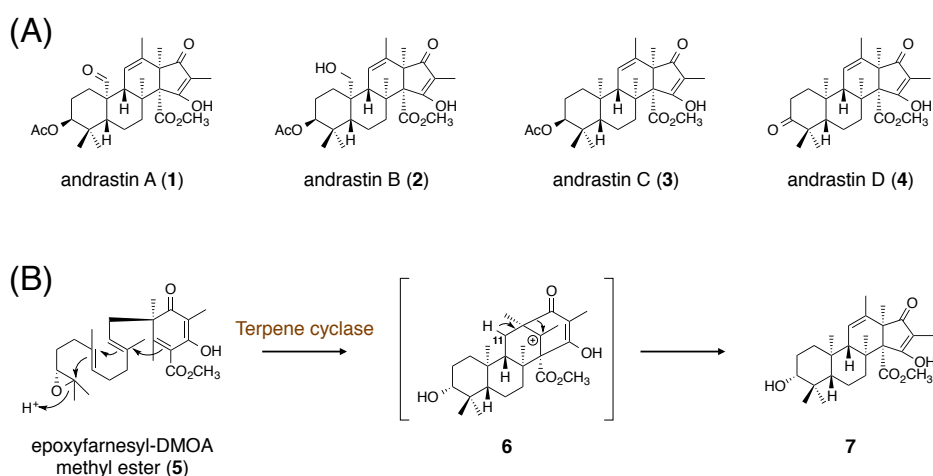


Figure 2-1. (A) Structures of andrastins A-D and (B) proposed reaction mechanism of the terpene cyclase involved in the formation of the andrastin scaffold.

2-2. Andrastin A 生合成遺伝子クラスターの探索

本研究では andrastin 類を生産することが知られる *Penicillium* 属糸状菌のうち、ゲノムシーケンスが公開されている *Penicillium chrysogenum* に着目し⁸⁶、そのゲノムデータベース中に推定生合成遺伝子群を探索することとした。先述の通り、andrastin 類は epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester (**5**) を経て生合成されると考えられることから、terretonin 生合成において **5** の生合成に関わる酵素群と高い同一性を有する酵素群が andrastin 類の生合成にも関与するものと推定される。そこで、これら一連のタンパク質と高い同一性を示すタンパク質をコードする DNA 領域をゲノムデータベース中に検索したところ、該当する箇所がただ一つ見出されたことから、これを andrastin 類生合成遺伝子クラスターであると予想し (Pc22g22820 - Pc22g22920 の遺伝子領域)、*adr* クラスターと命名した (Figure 2-2)。

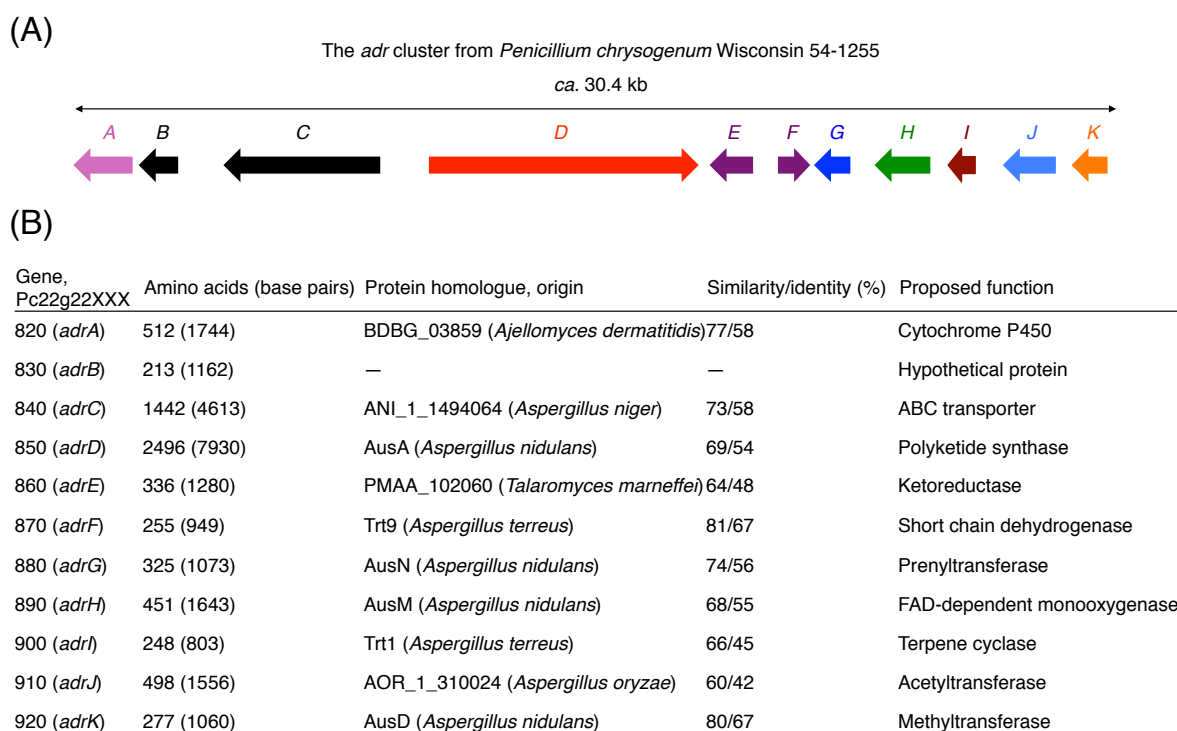


Figure 2-2. (A) Schematic representation of the *adr* cluster. The direction of the arrow indicates the direction from the start to the stop codon. (B) Annotation of each protein in the *adr* cluster. The deduced function of each open reading frame (ORF) and the amino acid sequence similarity/identity, as compared with the homologues found by a BLAST search at NCBI, are shown.

本クラスターは 11 個の遺伝子から構成されるが、このうち *adrD*、*adrG*、*adrK*、*adrH* と命名した遺伝子がそれぞれポリケタイド合成酵素 (PKS)、プレニル基転移酵素 (PT)、メチル基転移酵素 (MT)、FAD 依存型モノオキシゲナーゼ (FMO) をコードしており、**5** の生合成

に關与するものと強く示唆された。なお、PKS をコードする *adrD* の遺伝子産物は National Center for Biotechnology Information (NCBI) のデータベース上では全く異なるタンパク質であるとアノテーションされていたが (Pc22g22850、アクセッション番号：XP_002566179)、遺伝子配列をもとに PKS であると決定し、その遺伝子産物の配列を予想した (Figure 2-3)。加えて、本クラスターはテルペン環化酵素と予測される AdrI をコードしていたが、本タンパク質のデータベース上の配列 (Pc22g22900、アクセッション番号：XP_002566184) は、ホモログタンパク質である TrtI や AusL と比べて C 末側が短かった。これは、イントロンの予測の誤りに起因すると考えられたことから、配列を修正した上で以後の実験に用いることとした (Figure 2-4)。

```
MVDLSQTSPPGRPVCLVFGPQIAEIDESLFYISRNIDENPALHFLKDVLRRLPSLWSTISDTWAPLSSIPGAAQLTALADCVQGGPI
ATHENPTNVLTLPLTVIRQIIDAWKFKEKSQNKCRIMDAQGFCVGFLLAAVAVACSNDKEFADIASTMVRLAVCIGTAVDLGDISH
GQARSVAVRWKSASENEQLNRLLTSSSTAYVSCFTDNTSATVTVAEADVDLIKELGSHGLSVKIIDLKGRFHHASHITAVQYLS
SLCDTDDRLRLAGTGTCVPLPLRSNVDGHLIGKISDIHIALESILTQPSQWAMTVSAAVEHSRETNDDLSLAAIGTGQFVPRVLR
NRVLDHTNNSLWDTKHMLPNIHKSFPTESMQSTNMAAMAGTATPIAITGMGCRYAQADSPEQLWEMLELGQCGVSALP
NERFKMDKLRREP KGPFWGNLANPDVDFHRFFGISAREADAMPQQRLLQVGYEAMESAGYGLRNPVPTDIGCYVG
VGSDDYTENVGSTHANAFSATGTLQAFCTGRLSHYFGWTGPSVVVDTACSSAAVSIHLACKALQTNECSIAVAGGVNVMTP
RVTQNLAASFLSPTGASKAFDATANGYCRGEGAGLVLRPLADAIRNGDPILAVIGGSANVQGSNCSPITVPDSNSQRSYRK
ALLASGIPPEDVTYVEAHGTGTQVGDPIEFDSIRKAFGGPGRSEKLHVSGIKDNIGHTETASGVAGLLKTVLMMQKQIPKQAN
FVQLNPKIPALDDAEIAIPTKSIHWPSAATSSSNAMVNTYGAAGSNAAVLVKYKAPSEPSNRASLLPSEVPILAAANSVESLR
SYCKVLLPSVRNAQLGSCQDIAYNLAVKQSRDMYISTLTPADQPNELIAKLESMSTETTNPKKQPSRLPVILCFGGQNGNE
TTLSEDLFNQCELLQYHLMCEKVCRTDLPSLFPRIFQTGPIEDTVSLHCILFSIQYASAMSWISSGLQVDRIIGHSFGQLTGL
CVAGGLNLSDALYLVSERARMIQSMWGSERGA MLLVEGTEADVQSLNLRATQQMADAADVACVNGPRNIIAGDERSLQMI
QKLSAETPSILRTKRLKNTHAFHSRLVDSIVPSLSKVAQQLQYTPLSIPLEACWQDGDWSFVSPDKIVAHSRGRVDFQTAVERV
AQRIQGPAILWEAGSASPIPLVRRVIDTVTASSKDHLYQSLDLGGPQGGKNLSQATCNLWSRGAKVQFWQFHGSQAQSYNWI
NLPPYQFAQTRHWIAYDPNAFAPLPEDKPTVPSSGGPKFVQLLTQKPTCEVFAINTKDHLQYECTQGHAVLDQNLCPASLYF
EVIVRAAGLVREPNDTSPSPMHLQNLAIASAPLVNPTGNVLLSLTRARAGDSPWSFSLYTREPNTNLVTTHATGEISLHPFGQN
TPLFVRLHSMNRLIDSSRVDSIANSRESSGLKGFVYQAFRRVYNYADCYRGVERVFATEHEAAGIVNLLSSKTKDAACDPML
VDNFIQVAGIHVNCLSETNEDEVFVCTGVGEILIGAFMTRDPKSSRSWGVYSNMDSVKNKIACDTFVLDRGTGLAVTILSA
EFTSVSIAGLARVLKLLNNQADDEKASPDLSLRNDSKVDVNPTQNTAPVVPTRQAAAEPGYFVVVQEMLCDLLGIVSEELL
PSSNLEEIGVDSLMTREVLVEIKKRFNVSIDASTLTEIPNIQALVQTIFPDAAAPLTHGVHPSLEIETDVPDSENTHVIPTPISD
ADVHGLIDIAPTLFTDIQRSTSHSEMTQWNGFCESVYPKQMALVTAYVVEAFKSLGVSLDKFEAEGVIPQVPVLKQHGKVRNQ
LYSILEFSNLIRATDRGFVRTTIPVPTISSDVLHEEIRLYPQHRSEHLLKTTGSRLSDCLSGAADPLSLLFQDAEARRLMEDVY
TNAPMFKGATNHLAQYLVNLLGRMDTTREINILEGGGTGGTTKALLNQLTAVPGLRFQYTFDLSSGLLTARKKFKHYNFMK
YQVLNVEQTPTPDMVGQYDIILSSNCVHATRNLVQSCSNINKLLRPDGILCLIELTRNLFWFDLVFGLLEGWWLFEDGRQHALA
TEHMKWQTLVQSGFQWVDWTHNDSEESNVLRVITASPTSAVILPPTPGSPLRMNEETVPYKNGAVELSADIYYPRDLQPI
GKPRPIALLIHGGGHIMLSRRDVRSKQVKMLLDAGFLPVSDYRLCPEVSLSEGPMHVDVCDALSWARNVLPKLSLCRPDIQSD
GTQVVAVGWSTGAHLAMTLAWTAEQRGIEPPQAILAFYGPTDYEDPFWSKPNFPYKSAASPEMSYNLWEGMHETPITAYNP
PANQNALGGWMSPADPRSRIALHMNWKQSLPMLLHGGHFWSAHKDGDGCELDLPVPTLKEIQAVSPLAQIRNGCYKTPTFII
HGTLDLIPVEQAQRTSQELVTKGVEVELRIVDKAVHLFDIYPGFEDHAAAQAVQDGYEFLRDHVRY
```

Figure 2-3. Deduced amino acid sequence of AdrD (Pc22g22850).

Revised sequence	ATGGAGAAATCGACTTTGCTCTCCGCAGTCCTGAAGCATCGAGATGCCTTGGCGTCGGTC	60
Database sequence	ATGGAGAAATCGACTTTGCTCTCCGCAGTCCTGAAGCATCGAGATGCCTTGGCGTCGGTC	60
Revised sequence	GCGGAATTTCTCCGAATTCTAGCTGGAATTTGCTGGACTTTGAACTATTTACAGCATGTTG	120
Database sequence	GCGGAATTTCTCCGAATTCTAGCTGGAATTTGCTGGACTTTGAACTATTTACAGCATGTTG	120
Revised sequence	CGCACTTCGCAAAAAGACAAGATCCCCAGCACAGGTATCTTCCCCCTCTGCAATGACATT	180
Database sequence	CGCACTTCGCAAAAAGACAAGATCCCCAGCACAGGTATCTTCCCCCTCTGCAATGACATT	180
Revised sequence	GGGTGGGAGTTTATCTATGCCTTTATCTACCCAAAGGCGAGTGCCCATTTGGAAGGAGGA	240
Database sequence	GGGTGGGAGTTTATCTATGCCTTTATCTACCCAAAGGCGAGTGCCCATTTGGAAGGAGGA	240
Revised sequence	GTTTCGAGTCTGGTTTTTGGTCCATTGCATCGTCATCTTCTTTATCATCAAAAATGCGCAC	300
Database sequence	GTTTCGAGTCTGGTTTTTGGTCCATTGCATCGTCATCTTCTTTATCATCAAAAATGCGCAC	300
Revised sequence	AATGAGTGGGACTATTTCCCCCTCATTCAACGAAACCTTTACTTCCTCTATGGAATAGTG	360
Database sequence	AATGAGTGGGACTATTTCCCCCTCATTCAACGAAACCTTTACTTCCTCTATGGAATAGTG	360
Revised sequence	ACTATTGGCTTTGCCATCGGTCAATATTCGTTTGCGCGGGAGGTTGGGCCTGACTTGGGG	420
Database sequence	ACTATTGGCTTTGCCATCGGTCAATATTCGTTTGCGCGGGAGGTTGGGCCTGACTTGGGG	420
Revised sequence	TTTTTCTATGGGGGTGTGCTATGCCAGACACTGGCGAGTCTTGGGCCAATTGCTCAGATT	480
Database sequence	TTTTTCTATGGGGGTGTGCTATGCCAGACACTGGCGAGTCTTGGGCCAATTGCTCAGATT	480
Revised sequence	CTTTCCCGCAATAGTACCCGCGGTGCTTCCTT	540
Database sequence	CTTTCCCGCAATAGTACCCGCGGTGCTTCCTT	525
Revised sequence	ACTTCATTTTCGTGAGGCTGACATGGCAGAAG	600
Database sequence	Stop codon of the database sequence	600
Revised sequence	GATTTCATTAAGTTGACTATCTACTACCTCACTGGCAATGCTGCAGGACCTTGTTTGAGA	660
Database sequence	-----	660
Revised sequence	GCCCTATGTGCAAGTTCTACATCGGGTTGACCTTGATTCTTGATTTTACCTATCCGATCT	720
Database sequence	-----	720
Revised sequence	GCTACTACGTGATTGCGCGTCAGGAGTTGGTCAATGACGAGGGAGACAAAAAGAAAAAGA	780
Database sequence	-----	780
Revised sequence	CAAAGTCAGGAAAGGCAGCTTGA	803
Database sequence	-----	803

Figure 2-4. Comparison of the revised DNA sequence of *adrI* with the original database sequence. Highlighted in magenta are the region predicted for an intron in this study.

本クラスターはさらに、閉環反応後の修飾反応に関与すると予想される4つの遺伝子(*adrF*、*adrE*、*adrJ*、*adrA*)を含んでいた。短鎖型脱水素酵素/還元酵素(SDR)と推定される *AdrF* は terretonin 生合成に関わる Trt9 と高い配列同一性(67%)を示すこと、また、Trt9 は環化中間体 preterretonin A の C-3 α 水酸基のケトンへの酸化を担うことを踏まえると(Figure 1-19)⁷⁰、本酵素は *AdrI* による閉環産物 7 の C-3 位の水酸基を酸化し、andrastin D (4) を与えることが示唆される。つぎに、andrastin A-C の C-3 アセトキシ基が β 配向であることを考慮すると、4 の C-3 ケトンが立体選択的に還元され、C-3 β 水酸基が生じる必要がある。この変換反応は、アルドケト還元酵素のホモログである *AdrE* によって触媒され则认为するのが最も合理的であろう。本変換産物 8 は、さらにアセチル基転移酵素 *AdrJ* によって andrastin C (3) となったのち、最終的に、シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ *AdrA* が C-23 位のメチル基をアル

デヒドへと二段階酸化することで andrastin B (2) ならびに andrastin A (1) へと変換されるものと推定される (Figure 2-5)。

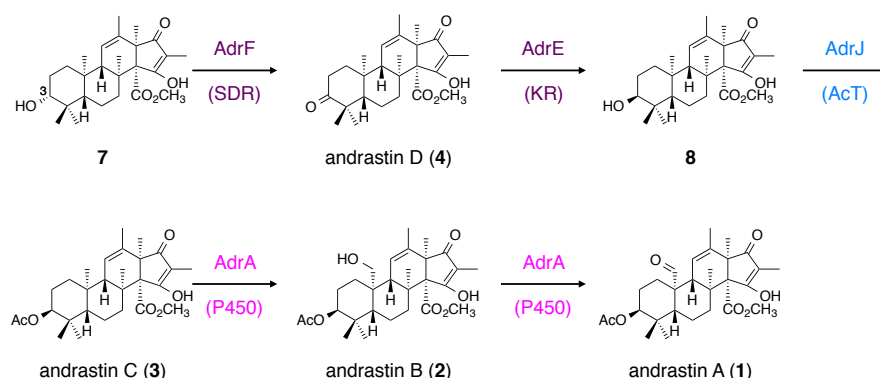


Figure 2-5. Predicted biosynthetic pathway of andrastin A based on the bioinformatic analysis.

2-3. テルペン環化酵素AdrIの機能解析

テルペン環化酵素 AdrI の機能解析にあたっては、他のテルペン環化酵素 Trt1 や AusL の際と同様に、本環化酵素遺伝子を基質と考えられる 5 の生合成に関与する四つの遺伝子 (*trt4*、*trt2*、*trt5*、*trt8*) とともに異種糸状菌 *Aspergillus oryzae* NSAR1 株⁸⁷にて共発現させることとした。得られた *A. oryzae* 形質転換体を誘導培養後、その培養上清抽出物を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析に供した (Figure 2-6A)。その結果、MT 遺伝子 *trt5* を含まない 4 遺伝子発現系では、DMOA (9) および環化反応が進行せずエポキシドが加水分解を受けた dihydroxyfarnesyl- DMOA (10) (Figure 2-6B) が検出された一方で、5 遺伝子発現系においては特異的な代謝物として化合物 7 の生成が確認された。高分解能質量分析により、7 の分子式は $C_{26}H_{38}O_5$ と決定されたことから、環化反応の進行が強く示唆された。単離精製後、各種 NMR 分析に供することで、本化合物が andrastin 類と同一の四環性骨格を有する新規化合物であると決定し、これを andrastin E と命名した (Table 2-1)。なお、7 の絶対立体配置はすでに絶対立体配置が報告されている andrastin 類や preterretonin A のそれらを基にして決定した。また、C-15 および C-17 に対応する二つの ^{13}C シグナル(それぞれ 183.0 ppm および 197.4 ppm) は ^{13}C -NMR スペクトル上では観測されなかったが、これはケト-エノール互変異性に起因するものと考えられる。実際に、他の andrastin 類の NMR スペクトル上でも同様の現象が観察されている^{80, 85}。

本研究において、閉環産物 7 がメチル基転移酵素 Trt5 の存在下においてのみ得られたことを踏まえると、テルペン環化酵素 AdrI は Trt1 や AusL と同一の基質特異性を有しており、カ

ルボキシシル基のメチル化が環化反応の進行に必須であると言える。一方で、AdrI は TrtI や AusL とは異なり、カチオン中間体 **6** の C-11 位メチレン炭素からプロトンを引き抜くことで反応を完結させるとともに、andrastin 類の基本骨格を構築することが明らかとなった (Figure 2-1)。

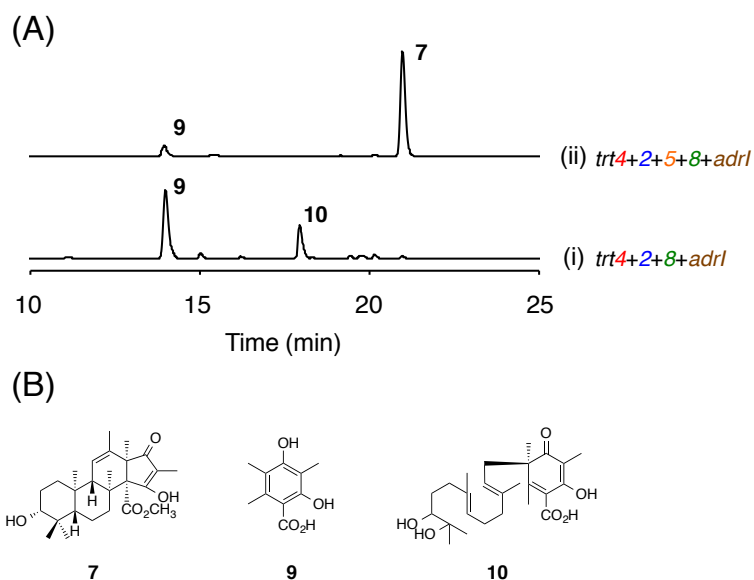
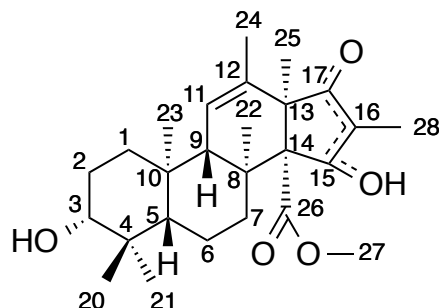


Figure 2-6. Functional analysis of the terpene cyclase AdrI. (A) HPLC profiles of culture supernatant extracts from *A. oryzae* transformants harboring (i) *trt4*, *trt2*, *trt8*, and *adrI*; (ii) *trt4*, *trt2*, *trt5*, *trt8*, and *adrI*. (B) Structures of compounds **7**, **9**, and **10**. The chromatograms were monitored at 254 nm.

Table 2-1. NMR data for andrastin E (7). Two carbons indicated by * were identified in HMBC spectra.



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	38.2	1.78 (α)	1H	m		H-1β, H-2α	
		0.82 (β)	1H	m		H-1α, H-2α	H-3
2	27.0	1.62 (α)	1H	m	1, 3	H-1α, H-2β, H-3	
		1.54 (β)	1H	m	3	H-2β	H-3
3	77.8	3.11	1H	dd (<i>J</i> = 11.3, 4.5 Hz)	20, 21	H-2α, H-2β	H-1β, H-2β, H-5, H-20
4	38.7						
5	54.2	0.87	1H	m	6, 21	H-6	H-3, H-7β
6	17.9	1.55	2H	m	5, 8	H-5, H-7α, H-7β	
7	33.1	2.08 (α)	1H	m		H-6, H-7β	H-22
		2.75 (β)	1H	m	6, 8	H-6, H-7α	H-5, H-9
8	41.8						
9	53.4	1.73	1H	brs	5, 8, 10, 14, 22	H-11	H-7β, H-23
10	36.8						
11	124.6	5.38	1H	brs	9, 10, 13, 24	H-9	H-1α, H-23, H-24
12	135.3						
13	56.8						
14	67.3						
15	183.0*						
16	113.2						
17	197.4*						
20	27.7	0.97	3H	s	3, 4, 5, 21		H-3, H-21
21	15.0	0.77	3H	s	3, 4, 5, 20		H-20
22	17.2	1.29	3H	s	7, 8, 9, 14		H-7α, H-23, H-28
23	16.7	0.90	3H	s	1, 5, 9		H-11, H-22
24	19.1	1.76	3H	s	11, 12, 13		H-25
25	15.4	1.15	3H	s	12, 13, 14, 17		H-22, H-27
26	170.7						
27	51.0	3.54	3H	s	26		H-25
28	5.9	1.57	3H	s	15, 16, 17		

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in acetone-*d*₆)

2-4. 修飾酵素群の機能解析

つづいて、*adr* クラスターのコードする 4 つの推定修飾酵素群の機能解析に着手した。その機能解析にあたっては、予想された生合成経路に沿って 4 つの遺伝子を順次 *A. oryzae* NSAR1 株に導入し、得られた形質転換体に基質として環化中間体 **7** を与えたときの代謝物を分析することとした。

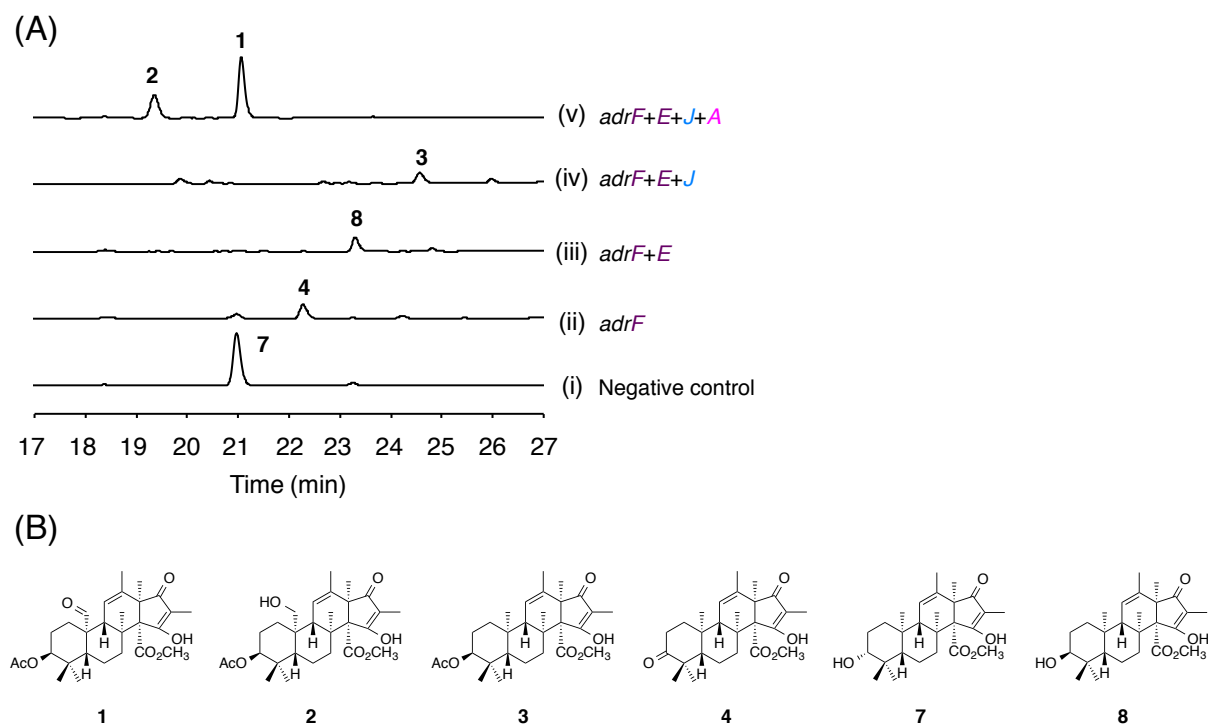
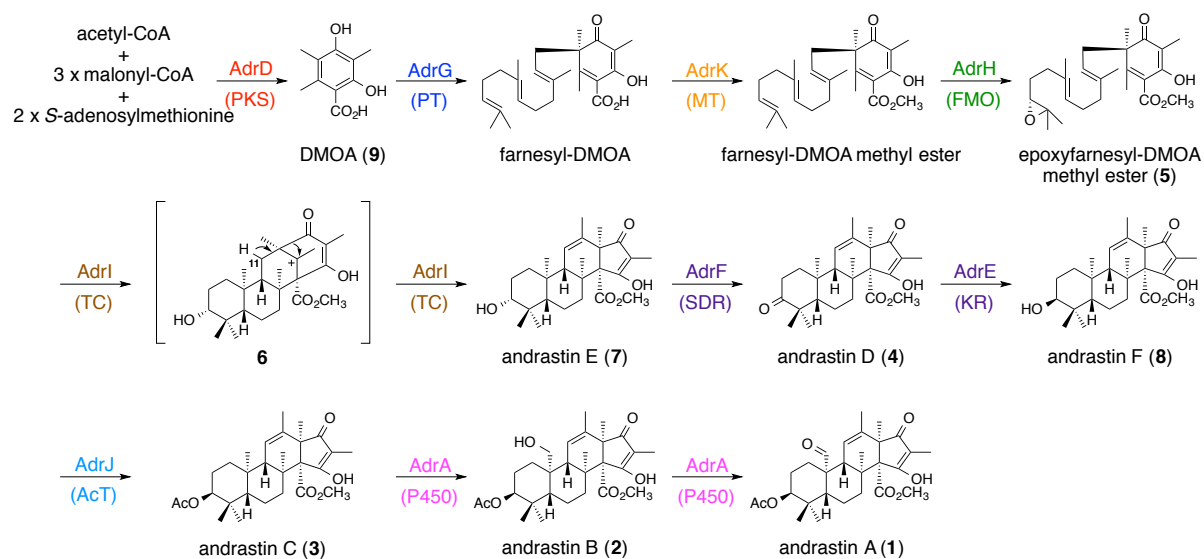


Figure 2-7. Functional analysis of the tailoring enzymes in the andrastin A pathway. (A) HPLC profiles of culture supernatant extracts incubated with **7**: transformant that harbors (i) empty vectors; (ii) *adrF*; (iii) *adrF* and *adrE*; (iv) *adrF*, *adrE*, and *adrJ*; (v) *adrF*, *adrE*, *adrJ*, and *adrA*. (B) Structures of compounds **1-4**, **7**, and **8**. The chromatograms were monitored at 254 nm.

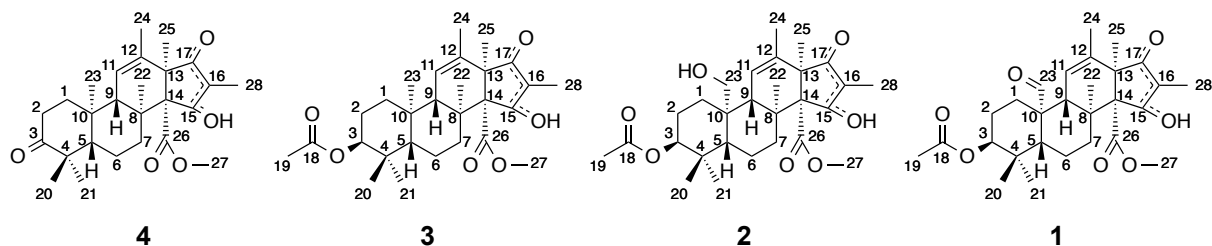
まず、SDR 遺伝子 *adrF* の単独発現系において **7** は、空ベクターのみを有するネガティブコントロールでは見られない化合物 **4** へと変換されることが判明した (Figure 2-7, レーン i および ii)。単離精製後、**4** を各種 NMR、MS 分析に供したところ、期待通り andrastin D であると同定されたことから (Table 2-2, 2-3)、AdrF は terretonin 生合成に関わる Trt9 と同様に C-3 水酸基をケトンへと酸化する酵素であると明らかになった。次いで、アルドケト還元酵素遺伝子 *adrE* を *adrF* と共発現させた系に **7** を与えたところ、新たに化合物 **8** へと変換された (Figure 2-7, レーン iii)。高分解能質量分析の結果、**8** の分子式は $C_{26}H_{38}O_5$ であり、**8** は化合物 **7** の異性体であると判明した。**8** の 1H -NMR スペクトルは **7** のそれとよく類似していたが、3.34 ppm

のオキシメチンシグナルがトリプレット ($J=2.8$ Hz) として観測された点で異なっており、このことは、C-3 β 水酸基の存在を示唆している。さらに、 ^{13}C -および二次元 NMR 分析に供することで、**8** が **7** の C-3 エピマーであると決定し、本化合物を andrastin F と命名した (Table 2-4)。このように、AdrE は andrastin D (**4**) の C-3 カルボニルを立体選択的に還元し、C-3 β 水酸基を与える酵素であることが明らかとなった。さらに、アセチル基転移酵素遺伝子 *adrJ* を加えた三遺伝子共発現系においては、**7** は化合物 **3** へと変換され (Figure 2-7, レーン iv)、予想されたとおり、**3** は **8** のアセチル化体である andrastin C と決定された (Table 2-2, 2-3)。したがって、AdrJ は andrastin F (**8**) の C-3 β 水酸基をアセチル化する酵素であると判明した。最後に、P450 遺伝子 *adrA* を含む 4 遺伝子発現系を構築したところ、本形質転換体は **7** を 2 つの代謝物 **1** および **2** へと変換した (Figure 2-7, レーン v)。期待されたとおり、化合物 **1** は andrastin A、化合物 **2** は andrastin B であると決定することができたことから (Table 2-2, 2-3)、AdrA は C-23 メチルに対する二段階の酸化反応を触媒し、アルコールおよびアルデヒドを与える酵素であると明らかになった。以上の結果より、andrastin A (**1**) に至る全生合成系を明らかにするとともに (Scheme 2-1)、本化合物の異種糸状菌での生産にも成功した。



Scheme 2-1. Complete biosynthetic pathway of andrastin A (**1**).

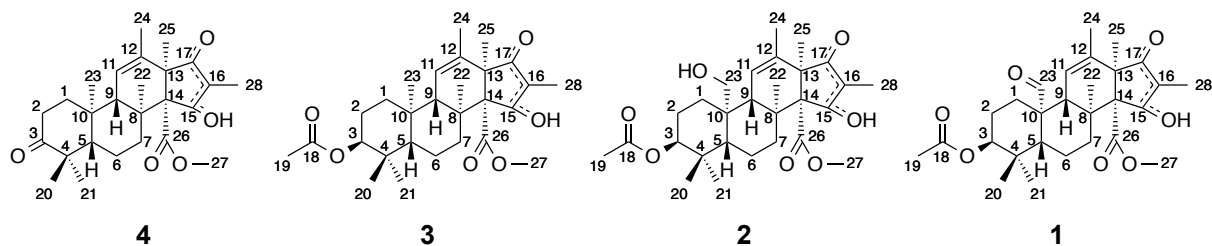
Table 2-2. ^1H NMR data for andrastin A-D (**1**, **2**, **3**, and **4**).



δH (J in Hz)				
position	4	3	2	1
1	1.30, m	1.12, m	1.05, m	0.98, m
2	2.07, ddd (3.4, 6.8, 13.0)	1.59, m	2.07, m	2.27, m
3	2.35, ddd (3.4, 6.8, 15.9)	1.58, m	1.54, m	1.59, m
4	2.64, ddd (7.4, 11.3, 15.9)	2.01, m	2.24, m	2.05, m
5	—	4.63, brs	4.66, t (2.8)	4.62, t (2.3)
6	1.45, dd (2.3, 12.5)	1.43, dd (2.3, 11.3)	1.55, m	1.84, dd (2.3, 12.9)
7	1.54, m	1.52, m	1.50, m	1.70, m
8	1.71, qd (3.4, 13.0)	2.04, m	2.10, m	2.07, m
9	2.14, dt (3.4, 13.6)	2.10, m	2.10, m	2.25, m
10	2.78, td (3.4, 13.0)	2.78, td (4.5, 12.5)	2.93, m	3.02, td (3.9, 12.9)
11	1.81, brs	1.81, brs	1.95, brs	2.13, brs
12	5.43, brs	5.40, brs	5.65, brs	5.38, brs
13	—	2.03, s	2.05, s	2.05, s
14	1.09, s	0.88, s	0.89, s	0.95, s
15	1.06, s	0.92, s	0.99, s	0.87, s
16	1.34, s	1.31, s	1.32, s	1.24, s
17	1.07, s	0.95, s	3.77, d (11.8) 3.91, d (11.8)	10.18, s
18	1.81, brs	1.79, brs	1.78, brs	1.75, brs
19	1.20, s	1.18, s	1.17, s	1.16, s
20	3.57, s	3.56, s	3.54, s	3.58, s
21	1.57, s	1.60, s	1.57, s	1.59, s

^1H NMR: 500 MHz (in CD_3OD)

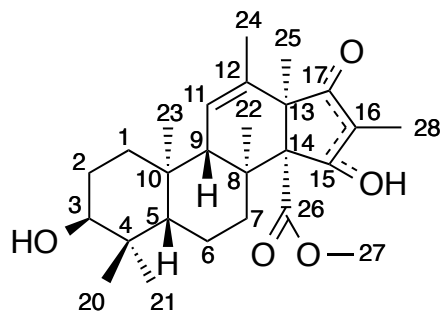
Table 2-3. ^{13}C NMR data for andrastin A-D (**1**, **2**, **3**, and **4**). Carbons indicated by * were identified in HMBC spectrum.



δC				
position	4	3	2	1
1	39.9, CH ₂	34.4, CH ₂	30.2, CH ₂	28.9, CH ₂
2	34.9, CH ₂	23.5, CH ₂	25.7, CH ₂	24.3, CH ₂
3	219.7, C	79.6, CH	80.0, CH	79.1, CH
4	48.6, C	37.7, C	37.4, C	38.0, C
5	55.6, CH	49.5, CH	50.3, CH	49.9, CH
6	20.2, CH ₂	18.8, CH ₂	18.4, CH ₂	17.9, CH ₂
7	33.6, CH ₂	34.0, CH ₂	34.1, CH ₂	33.5, CH ₂
8	37.7, C	38.1, C	42.9, C	42.9, C
9	54.0, CH	54.4, CH	54.9, CH	54.8, CH
10	43.1, C	43.4, C	43.2, C	53.5, C
11	125.7, CH	126.1, CH	126.4, CH	123.4, CH
12	137.0, C	136.4, C	135.4, C	137.1, C
13	58.1, C	58.1, C	58.5, C	57.8, C
14	68.9, C	68.8, C	68.8, C	68.8, C
15	187.1, C*	187.0, C*	191.2, C*	188.8, C*
16	114.5, C	114.4, C	113.4, C	114.2, C
17	201.2, C*	201.6, C*	202.4, C*	200.5, C*
18	—	172.4, C	172.7, C	172.3, C
19	—	21.2, CH ₃	21.2, CH ₃	21.1, CH ₃
20	26.5, CH ₃	28.2, CH ₃	28.4, CH ₃	27.1, CH ₃
21	21.6, CH ₃	22.0, CH ₃	21.5, CH ₃	21.5, CH ₃
22	18.0, CH ₃	18.2, CH ₃	18.1, CH ₃	19.8, CH ₃
23	16.7, CH ₃	17.3, CH ₃	62.7, CH ₂	207.0, CH
24	20.2, CH ₃	19.9, CH ₃	20.1, CH ₃	20.0, CH ₃
25	16.2, CH ₃	16.1, CH ₃	16.1, CH ₃	16.1, CH ₃
26	171.9, C	172.0, C	172.6, C	172.2, C
27	52.1, CH ₃	52.0, CH ₃	51.8, CH ₃	52.1, CH ₃
28	6.3, CH ₃	6.4, CH ₃	6.6, CH ₃	6.5, CH ₃

^{13}C NMR: 125 MHz (in CD_3OD)

Table 2-4. NMR data for andrastin F (**8**). Two carbons indicated by * were identified in HMBC spectrum.



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	33.9	1.48 (α)	1H	m		H-1β, 2α, 2β	H-11
		1.24 (β)	1H	td (<i>J</i> = 3.4, 13.6 Hz)	2, 10	H-1α, 2α, 2β	H-9
2	26.0	1.98 (α)	1H	tt (<i>J</i> = 2.8, 14.2 Hz)	1	H-1α, 1β, 2β, 3	H-3, 21, 23
		1.53 (β)	1H	m		H-1α, 1β, 2α, 3	H-3
3	76.7	3.34	1H	t (<i>J</i> = 2.8 Hz)	1, 5, 21	H-2α, 2β	H-2α, 2β, 20, 21
4	38.1						
5	48.8	1.48	1H	m	6, 21		H-9
6	18.9	1.48	2H	m			
7	34.2	2.06 (α)	1H	dt (<i>J</i> = 2.8, 13.0 Hz)	5, 8, 9	H-6, 7β	H-22
		2.79 (β)	1H	td (<i>J</i> = 5.1, 12.5 Hz)		H-6, 7α	H-9
8	43.4						
9	54.5	1.81	1H	t (<i>J</i> = 1.7 Hz)	8, 10, 14	H-11	H-1β, 5, 7β
10	38.4						
11	126.5	5.40	1H	brs	8, 9, 10, 12, 24	H-9	H-1α, 23, 24
12	136.1						
13	58.0						
14	68.9						
15	187.5*						
16	114.3						
17	202.3*						
20	28.8	0.94	3H	s	3, 4, 5, 21		H-3
21	22.4	0.84	3H	s	3, 4, 5, 20		H-2α, 3
22	18.2	1.29	3H	s	7, 8, 9, 14		H-7α, 23, 25
23	17.5	0.92	3H	s	1, 9, 10		H-2α, 11, 22
24	19.9	1.79	3H	brs	11, 12, 13		H-11, 25
25	16.1	1.17	3H	s	12, 13, 14, 17		H-22, 24, 27
26	172.2		3H				
27	51.9	3.55	3H	s	26		H-25
28	6.4	1.57	3H	s	15, 16, 17		

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CD₃OD)

2-5. 考察

第2章においては、andrastin A の生合成遺伝子クラスターを *P. chrysogenum* のゲノムデータベースから同定するとともに、andrastin A に至る全生合成経路を解明した (Scheme 2-1)。本研究では既知化合物 andrastin A-D (1-4) のみならず、新規 andrastin 類縁体として andrastin E (7) ならびに andrastin F (8) の取得にも成功した。過去の研究においては、7 ではなく 8 がテルペン環化酵素の産物であるとも予想されていたが^{85, 88}、本研究によって、この仮説を否定することができた。

テルペン環化酵素 AdrI は、先に同定された Trt1 や AusL と同じく epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester (5) を基質として受容する一方で、これら両酵素とは異なる生成物を与える酵素であると判明した。アミノ酸配列上で生成物特異性に寄与する領域を探索すべく、3 つのテルペン環化酵素の配列比較を実施したが、残念ながら各酵素間の配列同一性は 40% 程度であり、単純な配列比較からでは活性に重要な役割を果たす領域を推定することは困難であった。今後のメロテルペノイド生合成研究の中で、アミノ酸配列は異なるものの同一の活性を有するテルペン環化酵素が見出されれば、配列比較をもとに生成物特異性に関わる領域を予測することも可能になるかもしれない。

興味深いことに、andrastin 類と同様な炭素骨格を有する化合物は citreohybridone 類⁸⁸⁻⁹⁰、isocitreohybridone 類^{88, 90-92}、citreohybriddione 類^{91, 93}、atlantinone A⁹⁴ など多数存在しているが (Figure 2-8)、これら化合物群の生合成酵素や遺伝子に関する報告は現在のところ一切なされていない。Andrastin 類との構造類似性を考慮すると、これらの生合成においても 7 が共通の生合成中間体となっていることが強く示唆される。また、これら化合物群の生合成遺伝子クラスターは *adr* クラスターと高度に類似していると予想されることから、本研究は一連のメロテルペノイド群の生合成遺伝子の発見に寄与するものと期待される。さらに、7 のみならず 1-4 および 8 もまた、上述の化合物群の生合成中間体である可能性は高く、今回構築された異種発現系は、類縁化合物の生合成遺伝子の機能解析を実施する上で、有用な研究基盤になることが考えられる。

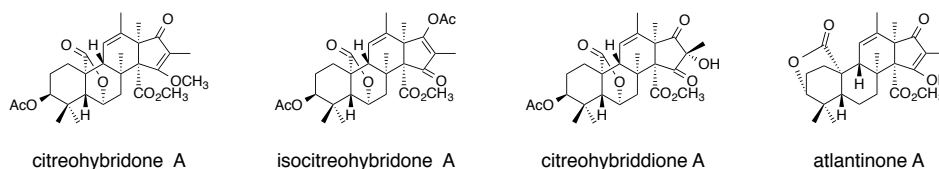


Figure 2-8. Fungal meroterpenoids predicted to be derived from andrastin E (7).

第3章 Austinol のスピロラクトン形成機構の解明

3-1. 背景・目的

Austinol (11) ならびに dehydroaustinol は、糸状菌 *Aspergillus nidulans* より単離されるメロテルペノイドであり⁹⁵、特徴的なスピロラクトン構造を有する (Figure 3-1)。第1章でも述べたとおり、両化合物の生合成遺伝子クラスターはすでに *A. nidulans* のゲノムデータベースより同定されており⁵⁵、生合成経路解明のため遺伝子破壊実験も実施されている^{55,96}。その結果として、四環性中間体 protoaustinoid A (12) に至る生合成経路、ならびにスピロラクトンを有する preaustinoid A3 (17) から 11 に至る経路についてはよく理解されているが、一方で 12 から 17 への経路については、遺伝子破壊実験では一切中間体が蓄積しなかったために、不明なままであった (Figure 3-1)。特に、スピロラクトン形成機構には非常に興味を持たれる。このスピロ環形成については、その反応機構が提唱されているものの (Figure 3-2)⁹⁷、実験的な根拠は存在しない。そこで本研究では、12 から 17 に至る生合成経路の解明ならびに本経路に関わる生合成酵素の同定、ひいてはスピロラクトン形成のメカニズム解明を目指すこととした。

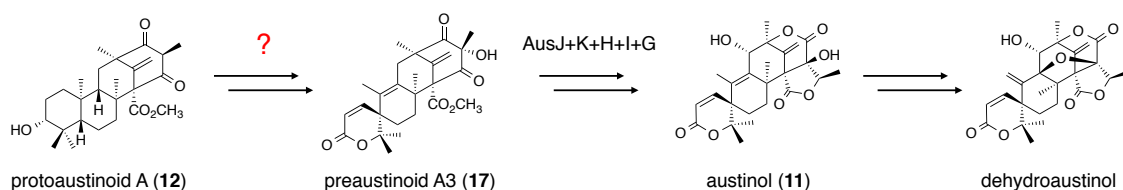


Figure 3-1. Biosynthesis of austinol (11) and dehydroaustinol.

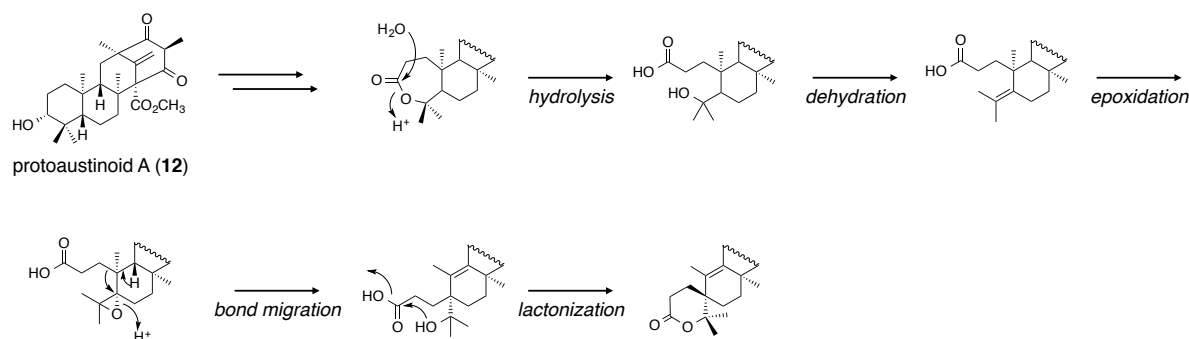


Figure 3-2. Proposed mechanism of the spiro-lactone formation in the austinol biosynthesis.

3-2. Preaustinoid A3生合成に関わる候補遺伝子群の探索

遺伝子破壊実験の結果、FAD 依存型モノオキシゲナーゼ (FMO) をコードする *ausB* を破壊した際に protoaustinoid A (**12**) が蓄積することが判明しており⁵⁵、したがって AusB は **12** を酸化する酵素であると推定されるが、その生成物は明らかになっていない。他方で、やはり FMO をコードする *ausC* ならびに Fe(II)および α -ケトグルタル酸 (α -KG) 依存型ジオキシゲナーゼをコードする *ausE* を破壊した際にも、それぞれ austinol (**11**) が生成しなくなることが判明しているが、両遺伝子の破壊株においては一切の生合成中間体が蓄積しなかったことから、AusC および AusE の基質ならびに生成物はいずれも不明のままである⁵⁵。Preaustinoid A3 (**17**) が **12** より生合成されるためには、水酸化反応や脱水素反応を含む多段階の酸化反応が要求されることを踏まえ、機能未知の3つの酸化酵素 AusB、AusC、AusE が本生合成経路に関与するものと仮定し、その機能解析を実施することとした。

3-3. 酸化酵素群の機能解析

上記の酸化酵素群の機能解析にあたっては、その異種発現系を糸状菌 *A. oryzae* NSAR1 株⁸⁷にて構築し、そこに基質として **12** を与えた際の代謝物を分析することで酵素機能を解明することとした。発現系構築に先立って、*ausB* および *ausC* のデータベース中の配列 (それぞれ AN8379.4 および AN8381.4) には、いずれも誤って予測されたと考えられるイントロン配列が含まれていたことから、これらを修正した上で以後の機能解析に用いることとした (Figure 3-3)。

まず、AusB の単独発現株においては、基質である **12** は消失し、新たに化合物 **13** を与えることが判明した (Figure 3-4、レーン i および ii)。大量培養後、**13** を各種 NMR および MS 分析に供したところ、本化合物は C-5'位に水酸基を有する berkeleyone A⁹⁸ であると同定された (Table 3-1, 3-2)。したがって、AusB は **12** の C-5'位を酸化し、水酸化体への変換を担う酵素であると明らかになった。なお、以前の研究においては、AusB は Baeyer-Villiger 酸化によって七員環ラク톤の形成に関与することが予想されていたが⁵⁵、そのような化合物は検出されなかった。さらに、**13** は AusB および AusC の共発現系においても検出されたことから (Figure 3-4、レーン iii)、AusC は **13** を基質として受容しないことが強く示唆される。

(A)			
Database sequence	ATGCCAAGGTAATGTCACGCACCCATTATCGCCAGTGCAATACACGGGCATTCTCAAT	60	
Revised sequence	-----		
Database sequence	ACTTTGGCGGTAAATTAGCGATGTCATGGAACTACTGGATGGACGATAAATTTGTTACCA	120	
Revised sequence	-----		
Database sequence	GTTGTA CTACATGCCTTACATTTTCAATGAAGGAATGCCCTTGCCTCCGGTCCTCCAAC	180	
Revised sequence	-----		
Database sequence	ACTCCCGGAAGACTTTACACCCGAGAAATCTGGATTCAGGGTACTTGTGAGGTTCCGGCG	240	
Revised sequence	-----		
Database sequence	AATGAAAGGACATTTTCCAGCTCAGAAATGGCGAAAAAGGAATCAGGAATGGCAGTGCAT	300	
Revised sequence	-----		
Database sequence	CAATAATGAAACACTACTCCCTGACCACGTAAGGAACGGGCACCTTGCCAAGAACGTGCC	360	
Revised sequence	-----		
Database sequence	CTACCGTCCATACCGTCCAGTATATGTCCTTTTG	420	
Revised sequence	-----GTCAGTTCAGACCTGTGAGACTGTT		
Database sequence	TTGGCAAGTTTGAATTTGCACTGAACCGGCAAAAGCATATACTACTTTGGCTAAAAGTC	480	
Revised sequence	-----		
Database sequence	CTAAACCTCTTGTACTTTCTCCTGGAATGGTGTGTCGCTATACTTGGGTGCCACCAACA	540	
Revised sequence	-----		
Database sequence	ACCAACAACAGCTATGACTGTGAGCCCTACCACAGACGCTATGGGCACCTCTGAAGAAAC	600	
Revised sequence	-----ATGGGCACCTCTGAAGAAAC	20	
Database sequence	ACGATCCAAACAAACCAAAGGGTCAAACGACGATATTTTGAGCGCGAAGATAGCTGGAAG	660	
Revised sequence	ACGATCCAAACAAACCAAAGGGTCAAACGACGATATTTTGAGCGCGAAGATAGCTGGAAG	80	
Database sequence	AGTTGCTCGCCCCGTTTATCACTGCACAAGCGCACGGCTCCATGACCTAGCCTACGACCC	720	
Revised sequence	AGTTGCTCGCCCCGTTTATCACTGCACAAGCGCACGGCTCCATGACCTAGCCTACGACCC	140	
(B)			
Database sequence	ATGTATGCATCGAATAAGACGTATCCGTCTTCTAGGGCGCTCCCTTGCCTCGTTGAGAAG	60	
Revised sequence	-----		
Database sequence	GTCGAGGCACAACACGTTGACGGGGCGATTAGAGTAAGGATCACAACGCTGGAGCAGAGT	120	
Revised sequence	-----		
Database sequence	ACGCGTCGTAAACCATCCCGAGCAGATTATCTATACTTTTGTGAAGCCTTTGAGCTTTTG	180	
Revised sequence	-----		
Database sequence	AACACCTTGAGGTGTTCTCAGTACGGATTTGCCAGTATGACTATTACACCCAACATTCT	240	
Revised sequence	-----ATGACTATTACACCCAACATTCT	23	
Database sequence	AGAAGACTGGCGTCAAGCCAAAGCCGCCGCTGTTGAAGCCAAATACGAAGCGGAACGCGA	300	
Revised sequence	AGAAGACTGGCGTCAAGCCAAAGCCGCCGCTGTTGAAGCCAAATACGAAGCGGAACGCGA	83	
Database sequence	GATCCAACCTTCGAGCTCACGGAAACGTGAAAGACATTGAAATCACCCGCGAGTCAGCCTT	360	
Revised sequence	GATCCAACCTTCGAGCTCACGGAAACGTGAAAGACATTGAAATCACCCGCGAGTCAGCCTT	143	

Figure 3-3. Comparison of the revised 5'-terminal DNA sequences of (A) *ausB* and (B) *ausC* with the original database sequences. The regions highlighted in magenta are predicted introns in the database. “ATG”s in red indicate the start codons.

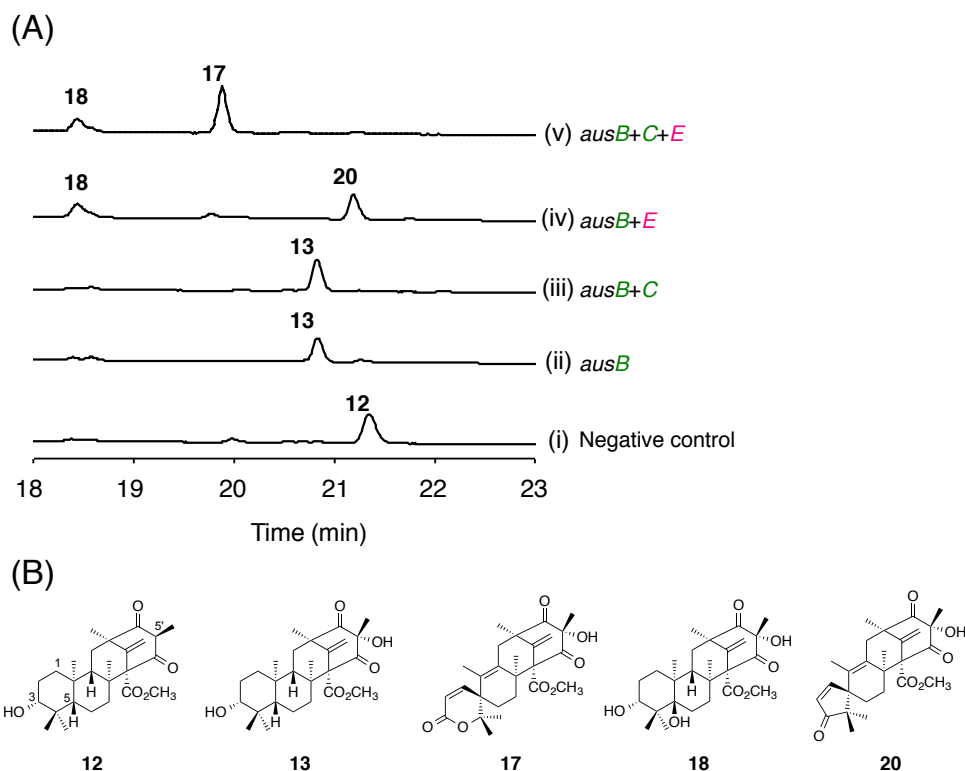


Figure 3-4. (A) HPLC profiles of culture supernatant extracts from each transformant incubated with **2**: transformant that harbors (i) only empty vectors; (ii) *ausB*; (iii) *ausB* and *ausC*; (iv) *ausB* and *ausE*; (v) *ausB*, *ausC*, and *ausE*. (B) Structures of compounds **12**, **13**, **17**, **18**, and **20**. The chromatograms were monitored at 190 nm.

一方で、Fe(II)/ α -KG 依存型ジオキシゲナーゼ AusE を AusB と共発現させた際には、**12** は新たに 2 つの主要な代謝産物 **18** および **20** へと変換された (Figure 3-4、レーン iv)。加えて、微量ながら **20** の近傍に 2 つの化合物 **14** および **19** も検出された (Figure 3-5)。これら 4 つの化合物の単離精製後、構造解析を行ったところ、**14** は **13** の C-3 水酸基がケトンへと酸化された既知化合物 preaustinoid A⁹⁹ であると判明したが (Table 3-1, 3-2)、**18**、**19**、**20** はいずれも新規化合物であった。**18** は **12** の C-5 位が水酸化を受けた化合物であり、5-hydroxyberkeleyone A と命名した (Table 3-3)。次いで、**19** は C-1、C-2 間に二重結合を有する化合物であり、**14** の脱水素化により生成したものと考えられる (Table 3-4)。興味深いことに、**20** は特異なスピロ-シクロペンテノン骨格を有しており、**19** の酸化的転位反応により生じたものと推定される (Table 3-5)。なお、化合物 **19** および **20** はそれぞれ preaustinoid C ならびに austinoid C と命名した。以上のことを踏まえると、AusE は多段階の酸化反応を担うとともに、スピロ環構築にも関わる多機能酵素であることが強く示唆される。

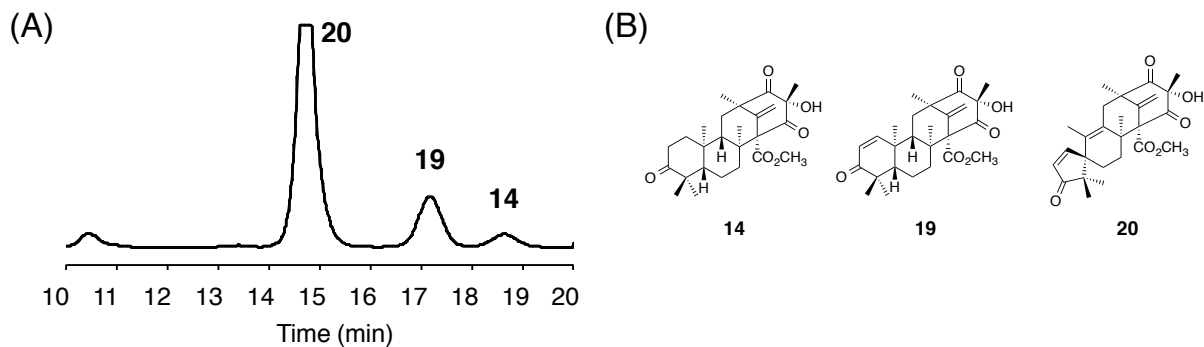


Figure 3-5. Production of the minor products, **14** and **19**. (A) HPLC analyses of the fractions containing **20** after silica gel chromatography. (B) Structures of compounds **14**, **19**, and **20**. The chromatograms were monitored at 190 nm.

最後に、3つの酸化酵素を全て含む系においては、主要な代謝産物として新たに化合物 **17** が生成した (Figure 3-4、レーン v)。また、AusB、AusE 共発現系の場合と同様に、微量な代謝物 **16** の生成も確認された (Figure 3-6)。構造解析の結果、**17** は preaustinoid A3¹⁰⁰ であると判明したことから (Table 3-1, 3-2)、AusC は Baeyer-Villiger 酸化により C-3、C-4 間に酸素原子を挿入する酵素であると考えられる。また、これにより、これまで明らかではなかった **12** から **17** への変換を担う酵素群の同定に成功した。他方で、微量生成物 **16** は七員環ラクトンを有する既知天然物 preaustinoid A2¹⁰¹ であると決定された (Table 3-1, 3-2)。

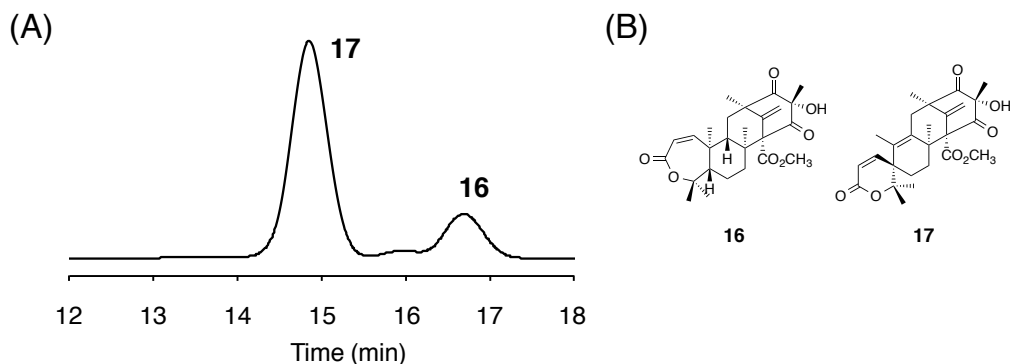
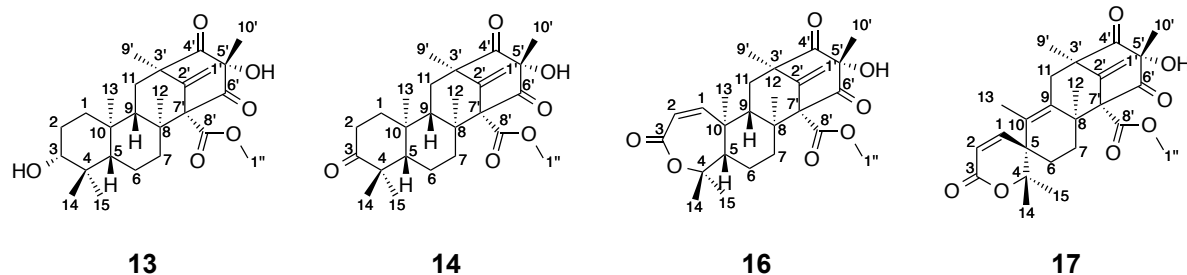


Figure 3-6. Production of the minor product **16**. (A) HPLC analyses of the fractions containing **17** after silica gel chromatography. (B) Structures of compounds **16** and **17**. The chromatograms were monitored at 190 nm.

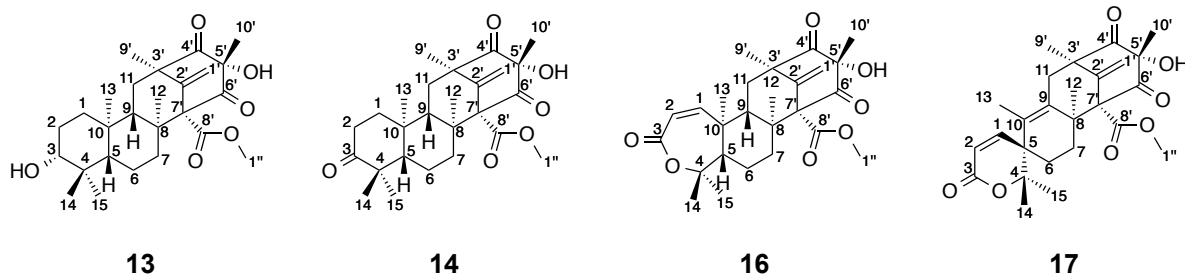
Table 3-1. ^1H NMR data for berkeleyone A (**13**), preaustinoid A (**14**), preaustinoid A2 (**16**), and preaustinoid A3 (**17**).



δH (ppm)								
position	13		14		16		17	
1	1.56 (a)	m	1.77 (a)	m	6.04	d ($J = 11.9$ Hz)	6.35	d ($J = 9.6$ Hz)
	0.61 (b)	m	1.09 (b)	m				
2	1.51 (a)	m	2.38 (a)	m	5.81	d ($J = 11.9$ Hz)	6.02	d ($J = 9.6$ Hz)
	1.51 (b)	m	2.38 (b)	m				
3	3.09	dd ($J = 11.3, 4.0$ Hz)						
4								
5	0.50	m	1.22	m	1.78	m		
6	1.40 (a)	m	1.53 (a)	m	1.50 (a)	m	1.40 (a)	m
	1.60 (b)	m	1.53 (b)	m	1.50 (b)	m	1.60 (b)	m
7	2.20 (a)	dt ($J = 13.6, 3.4$ Hz)	2.25 (a)	dt ($J = 13.6, 3.4$ Hz)	2.23 (a)	dt ($J = 13.6, 2.8$ Hz)	2.03 (a)	dt ($J = 14.7, 3.4$ Hz)
	2.02 (b)	td ($J = 13.6, 4.0$ Hz)	2.02 (b)	m	1.87 (b)	td ($J = 13.6, 2.8$ Hz)	2.65 (b)	td ($J = 14.7, 3.4$ Hz)
8								
9	0.50	m	0.59	dd ($J = 13.6, 2.8$ Hz)	0.64	dd ($J = 13.6, 2.3$ Hz)		
10								
11	1.60 (a)	m	1.63 (a)	t ($J = 13.0$ Hz)	1.76 (a)	m	2.20 (a)	dd ($J = 15.3, 1.7$ Hz)
	1.92 (b)	dd ($J = 13.0, 3.4$ Hz)	1.93 (b)	dd ($J = 13.0, 2.8$ Hz)	2.00 (b)	dd ($J = 13.6, 2.3$ Hz)	2.94 (b)	d ($J = 15.3$ Hz)
12	1.21	s	1.25	s	1.32	s	1.21	s
13	0.77	s	0.85	s	1.17	s	0.77	s
14	0.94	s	1.05	s	1.41	s	0.94	s
15	0.72	s	1.00	s	1.39	s	0.72	s
1'	4.85 (a)	brs	4.88 (a)	brs	4.92 (a)	brs	5.00 (a)	brs
	5.36 (b)	brs	5.39 (b)	brs	5.45 (b)	brs	5.48 (b)	brs
2'								
3'								
4'								
5'								
6'								
7'								
8'								
9'	1.45	s	1.48	s	1.51	s	1.45	s
10'	1.37	s	1.37	s	1.36	s	1.37	s
1''	3.71	s	3.73	s	3.73	s	3.75	s
OH			3.24	brs	3.24	brs	2.90	brs

^1H NMR: 500 MHz (in CDCl_3)

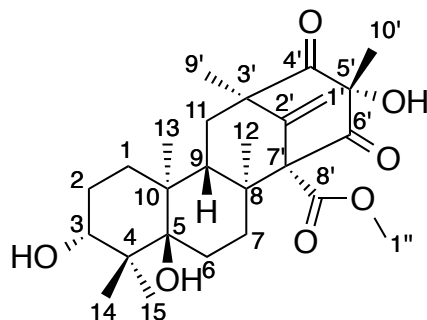
Table 3-2. ^{13}C NMR data for berkeleyone A (**13**), preaustinoid A (**14**), preaustinoid A2 (**16**), and preaustinoid A3 (**17**).



position	δC			
	13	14	16	17
1	38.5 (CH ₂)	39.1 (CH ₂)	157.4 (CH)	146.0 (CH)
2	26.9 (CH ₂)	33.6 (CH ₂)	122.6 (CH)	119.8 (CH)
3	78.3 (CH)	217.0 (C)	167.7 (C)	164.0 (C)
4	38.8 (C)	47.1 (C)	85.7 (C)	85.8 (C)
5	54.8 (CH)	53.9 (CH)	56.1 (CH)	45.6 (C)
6	18.3 (CH ₂)	19.7 (CH ₂)	23.4 (CH ₂)	26.2 (CH ₂)
7	33.0 (CH ₂)	32.3 (CH ₂)	31.6 (CH ₂)	24.7 (CH ₂)
8	48.0 (C)	47.8 (C)	47.4 (C)	47.1 (C)
9	52.8 (CH)	52.0 (CH)	49.5 (CH)	136.3 (C)
10	37.8 (C)	37.3 (C)	43.3 (C)	132.0 (C)
11	39.1 (CH ₂)	39.3 (CH ₂)	40.1 (CH ₂)	41.2 (CH ₂)
12	17.3 (CH ₃)	16.9 (CH ₃)	16.7 (CH ₃)	26.0 (CH ₃)
13	15.9 (CH ₃)	16.1 (CH ₃)	14.8 (CH ₃)	15.6 (CH ₃)
14	27.9 (CH ₃)	27.1 (CH ₃)	27.3 (CH ₃)	23.0 (CH ₃)
15	15.6 (CH ₃)	21.0 (CH ₃)	32.7 (CH ₃)	26.0 (CH ₃)
1'	112.5 (CH ₂)	112.8 (CH ₂)	113.2 (CH ₂)	114.0 (CH ₂)
2'	145.7 (C)	145.6 (C)	145.5 (C)	143.0 (C)
3'	51.1 (C)	51.1 (C)	51.2 (C)	51.2 (C)
4'	208.0 (C)	207.9 (C)	208.1 (C)	206.2 (C)
5'	80.0 (C)	80.2 (C)	80.7 (C)	78.2 (C)
6'	204.2 (C)	204.0 (C)	203.5 (C)	203.7 (C)
7'	72.6 (C)	72.5 (C)	72.3 (C)	71.6 (C)
8'	168.7 (C)	168.6 (C)	168.3 (C)	168.9 (C)
9'	22.2 (CH ₃)	22.2 (CH ₃)	22.1 (CH ₃)	22.9 (CH ₃)
10'	15.3 (CH ₃)	15.2 (CH ₃)	15.0 (CH ₃)	16.7 (CH ₃)
1''	52.6 (CH ₃)	52.7 (CH ₃)	52.8 (CH ₃)	52.7 (CH ₃)

^{13}C NMR: 125 MHz (in CDCl_3)

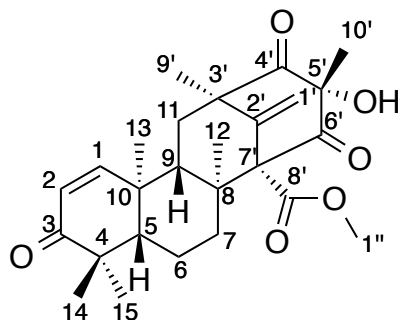
Table 3-3. NMR data for 5-hydroxyberkeleyone A (**18**).



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	31.8	1.27 (α) 1.16 (β)	1H 1H	m m	10	H-1β, H-2α, H-2β H-1α, H-2α, H-2β	H-3
2	27.0	1.61 (α) 1.50 (β)	1H 1H	m m	4 3	H-1α, H-1β, H-2β, H-3 H-1α, H-1β, H-2α, H-3	H-3
3	73.6	3.75	1H	dd (<i>J</i> = 11.9, 5.1 Hz)	4, 14, 15	H-2α, H-2β	H-1β, H-2β, H-14
4	43.7						
5	77.6						
6	23.7	1.86 (α) 1.53 (β)	1H 1H	td (<i>J</i> = 13.9, 4.5 Hz) m	7 8	H-6β, H-7α, H-7β H-6α, H-7α, H-7β	H-12, H-13, H-15 H-14
7	26.0	1.96 (α) 2.53 (β)	1H 1H	m td (<i>J</i> = 13.9, 4.5 Hz)	5, 6, 8, 9, 12 6, 8, 12, 7'	H-6α, H-6β, H-7β H-6α, H-6β, H-7α	H-12 H-9
8	46.4						
9	43.9	1.58	1H	m	8, 9, 10, 11, 13	H-11β	H-7β
10	41.2						
11	39.0	1.58 (α) 1.78 (β)	1H 1H	m m	8, 9, 10, 3' 8, 9, 10, 2', 4'	H-11β H-9, H-11α	H-12, H-13, H-9', H-1''
12	17.6	1.22	3H	s	7, 8, 9, 7'		H-6α, H-7α, H-11α, H-13, H-1''
13	18.7	0.90	3H	s	1, 5, 9, 10		H-2α, H-6α, H-11α, H-12, H-15
14	22.6	0.97	3H	s	3, 4, 5, 15		H-3, H-6β
15	17.1	0.86	3H	s	3, 4, 5, 14		H-2α, H-6α, H-13
1'	112.7	4.84 (a) 5.35 (b)	1H 1H	brs brs	2', 3', 7' 2', 3'	H-1'b H-1'a	H-12, H-1'' H-9'
2'	145.5						
3'	51.1						
4'	207.9						
5'	79.4						
6'	204.4						
7'	72.4						
8'	169.0						
9'	22.0	1.45	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-11α, H-1'b
10'	15.7	1.40	3H	s	4', 5', 6'		H-9
1''	52.5	3.70	3H	s	8'		H-11α, H-12, H-1'a
OH		3.11	1H	brs			

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

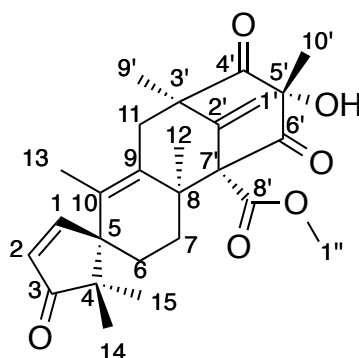
Table 3-4. NMR data for preaustinoid C (**19**).



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	156.6	6.79	1H	d (<i>J</i> = 10.2 Hz)	3, 5	H-2	H-2, H-9, H-11β
2	126.5	5.77	1H	d (<i>J</i> = 10.2 Hz)	10	H-1	H-1
3	204.7						
4	44.6						
5	52.7	1.38	1H	dd (<i>J</i> = 11.9, 2.8 Hz)	6, 14, 15		H-14, H-7β, H-9
6	19.6	1.56 (α)	1H	m		H-5, H-7α, H-7β	
		1.56 (β)	1H	m		H-5, H-7α, H-7β	
7	32.5	2.29 (α)	1H	dt (<i>J</i> = 13.6, 3.4 Hz)		H-6α, H-6β, H-7β	H-12
		2.06 (β)	1H	td (<i>J</i> = 13.6, 4.0 Hz)		H-6α, H-6β, H-7α	H-5
8	47.9						
9	46.7	0.73	1H	dd (<i>J</i> = 13.6, 2.8 Hz)	13	H-11α, H-11β	H-1, H-5, H-11β, H-10'
10	39.8						
11	38.6	1.70 (α)	1H	t (<i>J</i> = 13.0 Hz)	9, 3', 4'	H-9, H-11β	H-12, H-13, H-9'
		2.11 (β)	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 2.8 Hz)	8, 2'	H-9, H-11α	H-9, H-9'
12	17.6	1.29	3H	s	7, 8, 9, 7'		H-7α, H-11α, H-13, H-1"
13	19.4	0.99	3H	s	1, 5, 9, 10		H-11α, H-12, H-15
14	28.1	1.09	3H	s	3, 4, 5, 15		H-5, H-15
15	21.5	1.06	3H	s	3, 4, 5, 14		H-13, H-14
1'	113.0	4.91 (a)	1H	brs	3', 7'	H-1'b	H-12, H-1"
		5.42 (b)	1H	brs	3', 7'	H-1'a	H-9'
2'	145.4						
3'	51.0						
4'	207.7						
5'	80.5						
6'	203.7						
7'	72.3						
8'	168.5						
9'	22.1	1.52	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-1'b, H-11α, H-11β
10'	15.1	1.35	3H	s	4', 5', 6'		
1"	52.8	3.74	3H	s	8'		H-1'a
OH		3.26	1H	brs			

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

Table 3-5. NMR data for austinoid C (**20**).



position	¹³ C	¹ H					
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	163.3	6.97	1H	d (<i>J</i> = 5.9 Hz)	2, 3, 4, 5	H-2	H-2, H-6β, H-7β
2	131.1	6.15	1H	d (<i>J</i> = 5.9 Hz)	1, 3, 4, 5	H-1	H-1
3	214.5						
4	51.9						
5	56.1						
6	24.8	1.63 (α)	1H	m	8	H-7α, H-7β	H-7α, H-14
		1.57 (β)	1H	m	7, 10	H-7α, H-7β	H-1, H-14
7	27.2	1.93 (α)	1H	m	6	H-6α, H-6β, H-7β	H-6α, H-12
		2.72 (β)	1H	m	6	H-6α, H-6β, H-7α	H-1
8	45.9						
9	134.4						
10	132.9						
11	42.0	2.22 (α)	1H	dd (<i>J</i> = 12.3, 1.1 Hz)	9, 3', 4'	H-11β, 13	H-12
		2.86 (β)	1H	d (<i>J</i> = 12.3 Hz)	8, 9, 2', 3', 4'	H-11α	H-13
12	24.8	1.47	3H	s	7, 8, 9, 7'		H-7α, H-11α
13	16.9	1.11	3H	d (<i>J</i> = 1.1 Hz)	5, 9, 10	H-11α	H-11β, H-15
14	27.2	0.99	3H	s	3, 4, 5, 15		H-6α, H-6β, H-15
15	18.8	0.87	3H	s	3, 4, 5, 14		H-13, H-14
1'	113.7	4.98 (a)	1H	brs	3', 7'	H-1'b	H-1''
		5.47 (b)	1H	brs	3', 7'	H-1'a	H-9'
2'	144.7						
3'	51.3						
4'	206.7						
5'	78.4						
6'	203.9						
7'	72.0						
8'	169.2						
9'	21.5	1.48	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-1'b
10'	16.4	1.25	3H	s	4', 5', 6'		
1''	52.6	3.76	3H	s	8'		H-1'a
OH		2.91	1H	brs			

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

3-4. AusE の *in vitro* アッセイ

A. oryzae を用いた *in vivo* の試験の結果、ジオキシゲナーゼ AusE が多段階の酸化ならびにスピロ環形成反応を担うものと考えられた。本酵素が一連の反応を単独で触媒するか否かを明らかにするとともに、より詳細な酵素機能の解明を目指して、精製酵素を用いた *in vitro* の試験を実施することとした。AusE を大腸菌にて His タグ融合型のタンパク質として大量発現後、Ni-NTA アフィニティーカラムにて精製し、さらに濃縮したのちに酵素反応に供した。

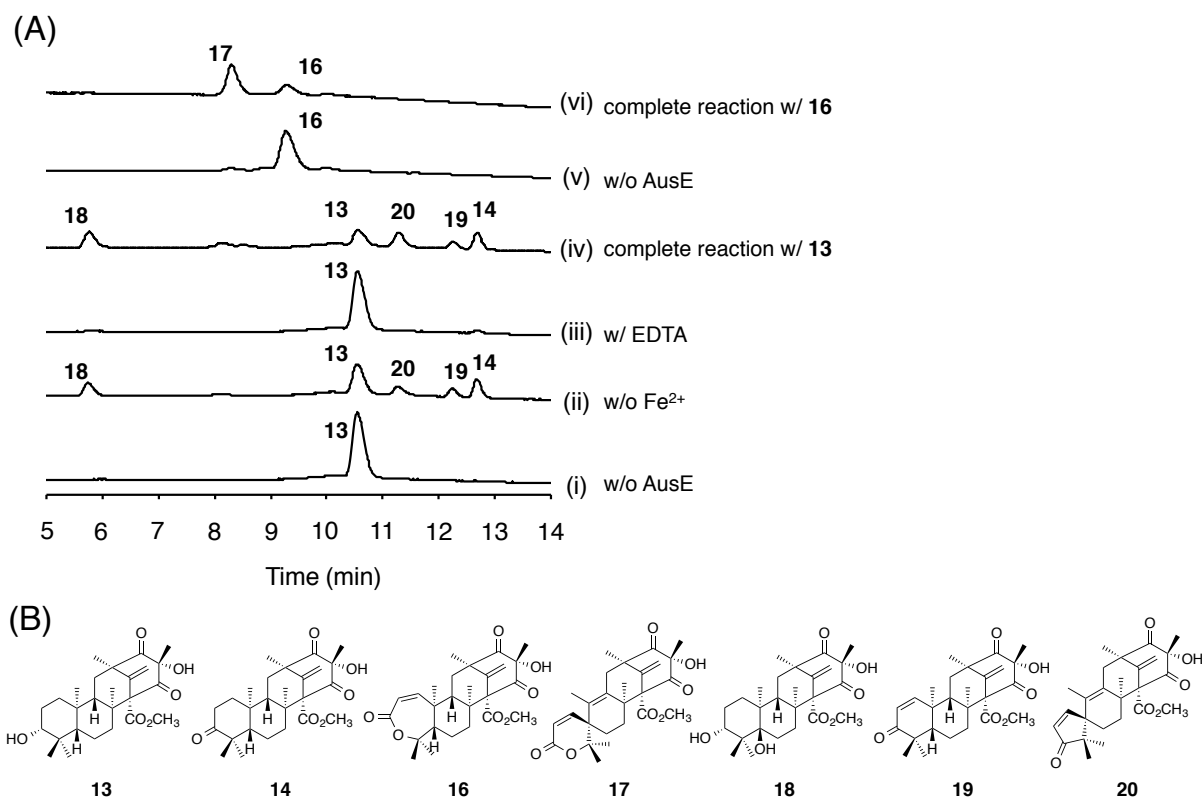


Figure 3-7. HPLC profiles of the AusE reaction products from **13** (i to iv) or **16** (v and vi): reaction (i) without α -KG; (ii) without Fe(II); (iii) with EDTA; (iv) complete reaction with **13**; reaction (v) without AusE; (vi) complete reaction with **16**. (B) Structures of compounds **13**, **14**, and **16-20**. The chromatograms were monitored at 190 nm.

AusE は、phytanoyl-CoA ジオキシゲナーゼ (PhyH)¹⁰² と同様に Fe(II)ならびに α -KG 依存型酵素であると考えられたことから、FeSO₄、 α -KG、および基質として berkeleyone A (**13**) の存在下、酵素反応を実施した。その結果、*in vivo* の試験と同様に **14**、**18**、**19**、**20** の四化合物が生成することが判明し、AusE は真に多段階の酸化反応ならびにスピロ環形成を単独で行うことが確認された (Figure 3-7、レーン iv)。本酵素反応は、FeSO₄ 非添加の条件下でも円滑に進行したが (Figure 3-7、レーン ii)、これは酵素精製過程で除去することができず、酵素活

性部位に結合したままになっている Fe(II)に由来すると考えられる。実際に、キレート剤として 1 mM の EDTA を加えた条件においては、反応は全く進行しなかった (Figure 3-7、レーン iii)。同様に α -KG 非添加の条件下においても、やはり反応は進行しないことが判明した (Figure 3-7、レーン i)。以上のことより、AusE は金属 (おそらく二価鉄) および α -KG 依存型の酸化酵素であることが確認された。

興味深いことに、AusE は七員環ラク톤を有する preaustinoid A2 (**16**) をも基質として受容し、スピロラクトン体 **17** へと変換することが明らかとなった (Figure 3-7、レーン v および vi)。

3-5. AusCの反応時期の解明

上述の *in vitro* の試験の結果、AusE が **17** ならびに **20** の両化合物の生成能を有することが判明したことで、AusC による Baeyer-Villiger 酸化がどのタイミングで起こるのかという点に疑問が生じた。AusC の基質を明らかにするとともに、**17** に至る全生合成経路を解明すべく、次のような生物変換実験を実施した。すなわち、5 つの化合物 **12**、**13**、**14**、**19**、**20** をそれぞれ、AusC および AusE を発現する *A. oryzae* 形質転換体の培養液に投与し、その変換産物を分析することとした。その結果、**13** および **14** のみが **17** へと変換された一方で、**19** は **20** へと変換され、**12** ならびに **20** は一切代謝されなかった (Figure 3-8、3-9)。以上のことを考慮すると、AusC は **14** を基質として受け入れ、七員環ラク톤を有する preaustinoid A1 (**15**)¹⁰¹ を与える酵素であることが強く示唆される。AusC により生じた **15** は、次いで AusE の基質となりエノン体 **16** へと変換されたのち、酸化的転位反応によりスピロラクトン **17** に至るものと推定される。すなわち、AusE は AusC による Baeyer-Villiger 酸化の前後の両段階において機能するものと考えられる。また、化合物 **19** および **20** はいずれも austinol (**11**) の生合成中間体ではなくシャント化合物であると言える。

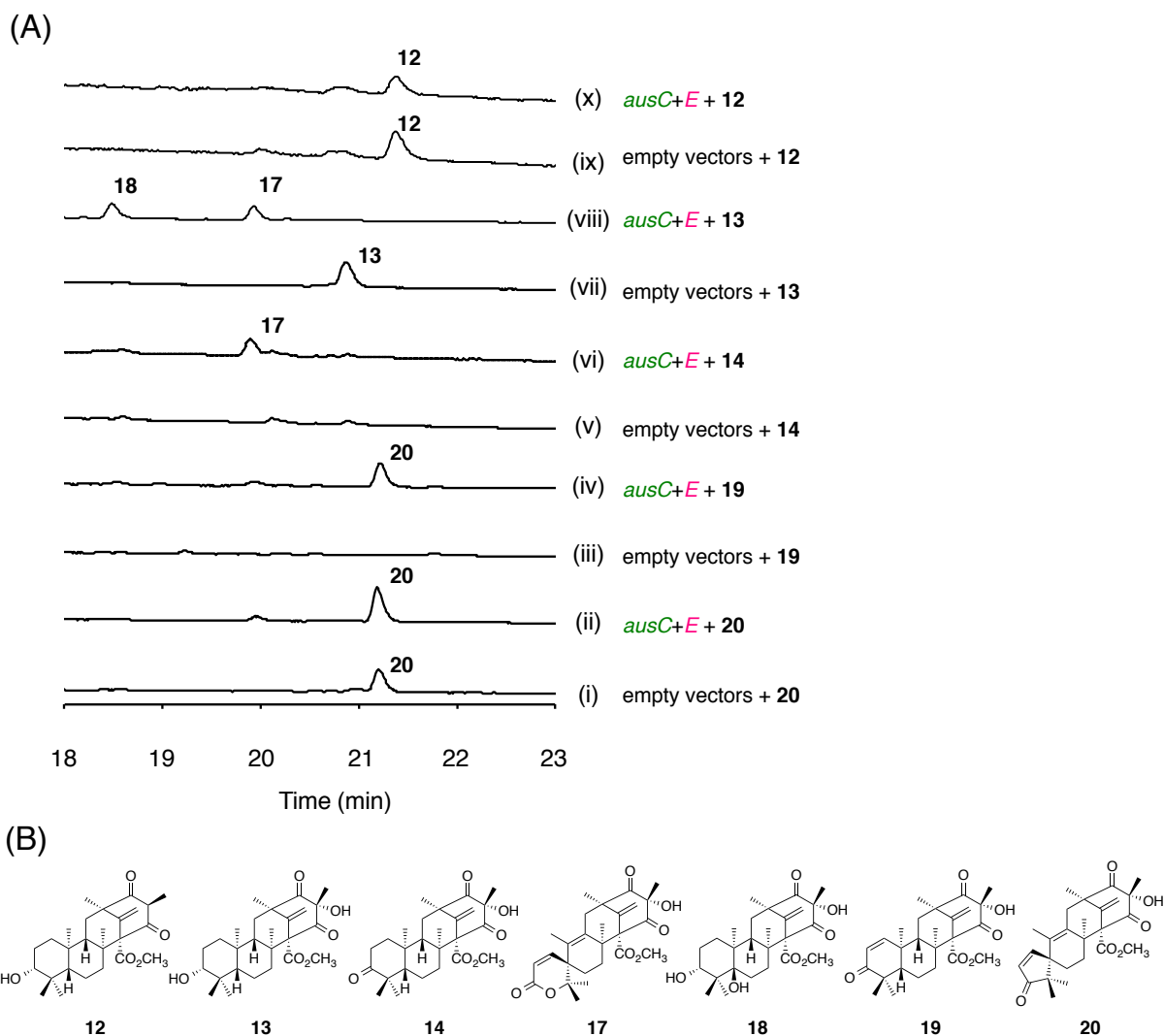


Figure 3-8. (A) HPLC profiles of culture supernatant extracts from each transformant incubated with various compounds: (i), (iii), (v), (vii), and (ix) transformant harboring empty vectors incubated with **20**, **19**, **14**, **13**, and **12**, respectively; (ii), (iv), (vi), (viii), and (x) transformant that expresses AusC and AusE incubated with **20**, **19**, **14**, **13**, and **12**, respectively. (B) Structures of compounds **12-14**, and **17-20**. The chromatograms were monitored at 190 nm.

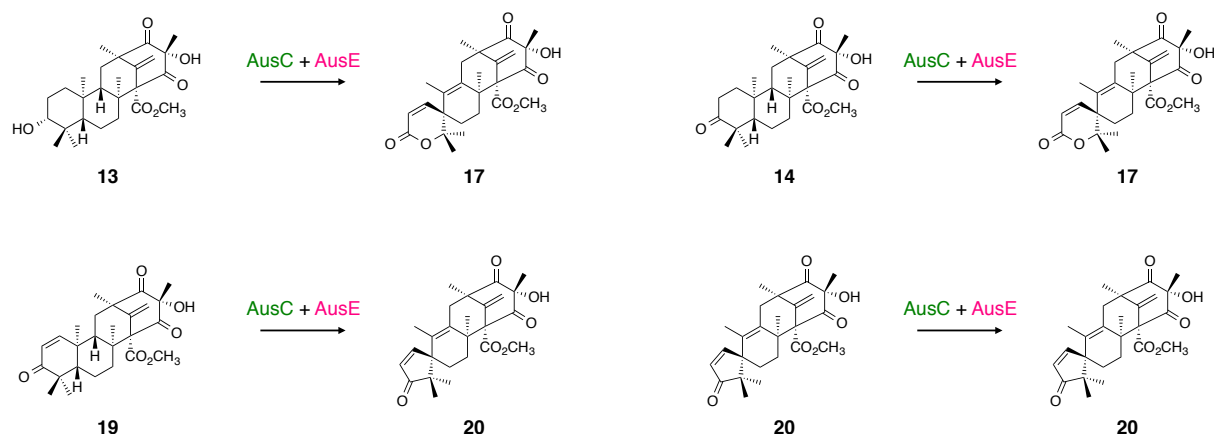
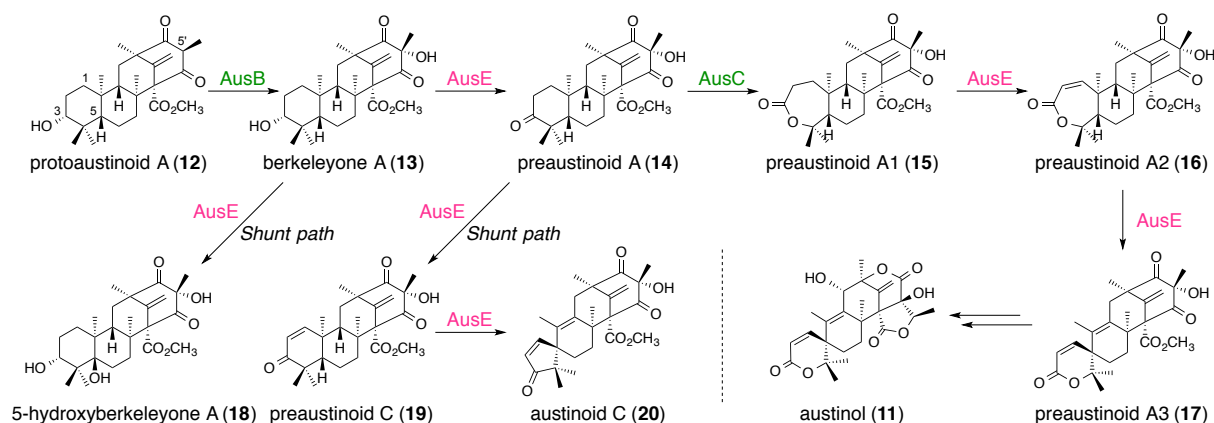


Figure 3-9. Bioconversion experiment of compounds **13**, **14**, **19**, and **20** with AusC and AusE

3-6. 考察

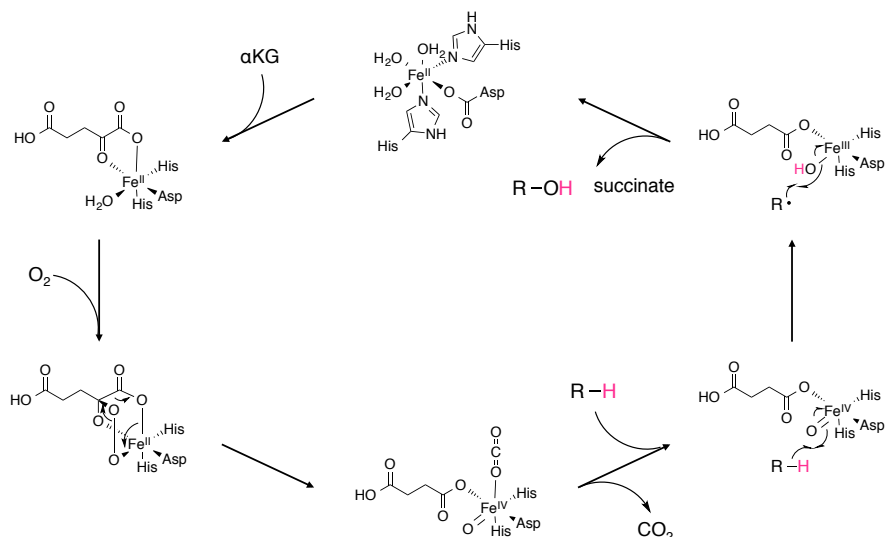
第3章においては、austinol 生合成に関わる3つの酸化酵素 AusB、AusC、AusE の機能解析を行い、遺伝子破壊実験では明らかにされなかった protoaustinoid A (**12**) から preaustinoid A3 (**17**) に至る生合成経路を解明した (Scheme 3-1)。天然物生合成研究において遺伝子破壊実験は、汎用される研究手法であり、各遺伝子の機能や生合成経路を推定するための非常に強力なツールである。しかしながら、*ausC* あるいは *ausE* 破壊株において一切の生合成中間体が単離されなかったことが示すように、遺伝子破壊を行っても中間体が蓄積せず、全生合成経路の解明が達成されないケースも少なくない。本研究では、異種糸状菌での発現系構築という手法を用いることで、遺伝子破壊実験では得られなかった3つの新規 austinol 類縁体 (**18-20**) ならびに3つの既知天然物 (**13**、**14**、**16**) の取得に成功した。このことは、異種発現系構築が生合成中間体を獲得する上でより優れた手法であることを示唆するものである。一方で、先行する遺伝子破壊実験がなければ、異種発現系に組み込むべき遺伝子群を選定することは非常に困難であったと予想される。以上を踏まえると、両手法の利点を巧みに利用することで、糸状菌由来天然物の生合成研究を加速させることができるものと考えられる。



Scheme 3-1. Proposed biosynthetic pathway leading preaustinoide A3 (17).

本章で明らかにした生合成経路のなかで、最も興味深い反応は α -KG 依存型ジオキシゲナーゼ AusE によるスピロ環形成反応であろう。本ジオキシゲナーゼは生物種を問わず普遍的に存在する酵素であり、ヒトにおいては、コラーゲン生合成に関与するプロコラーゲン-プロリンジオキシゲナーゼ¹⁰³、十文字ドメイン含有ヒストン脱メチル化酵素¹⁰⁴、フィタノイル CoA ジオキシゲナーゼ¹⁰⁵ などが代表的な例として知られる。初めてその結晶構造が明らかにされた α -KG 依存型ジオキシゲナーゼは、cephalosporin 生合成に関与する deacetoxycephalosporin C synthase (DAOCS) であり (Figure 1-1)、活性中心の Fe(II)に配位するアミノ酸残基や α -KG の結合様式が明らかにされた¹¹。また、詳細な反応メカニズムについては、大腸菌由来の taurine dioxygenase (TauD) を用いた研究が盛んに行われており、種々の分光法を用いた遷移速度論的解析によって、各種酵素反応中間体の検出にも成功している¹⁰⁶。

上述の先行研究等を基にして α -KG 依存型ジオキシゲナーゼの反応開始については、共通の機構を以て進行するものと理解されており、酵素活性部位に存在する "2-His-1-carboxylate iron-binding facial triad" と呼ばれる構造に配位した鉄原子が酵素活性に重要な役割を果たしているとされている¹⁰⁷。AusE においても、このトライアドは保存されており (His130、Asp132、His214)、ここに配位した鉄原子によって反応が担われるものと考えられる。反応の第一段階においては、酵素活性部位に α -KG および分子酸素が取り込まれたのち、 α -KG の酸化的脱炭酸により、活性種である鉄(IV)-オキソ中間体が生じる (Scheme 3-2)。次いで、基質が活性部位に結合したのち、この活性種により基質の水素原子が引き抜かれラジカルを生じることで反応が開始する。その後生じる反応としては、酸素の再結合による水酸化が最も一般的であるが (Scheme 3-2)、脱水素反応や転位を伴う酸化反応なども起こりうる。また、この時点で活性中心の鉄の価数は 2 価に戻り、触媒サイクルが完結する (Scheme 3-2)。



Scheme 3-2. General catalytic cycle of α -KG-dependent dioxygenases.

つづいて、AusE の反応機構を考察するにあたっては、類似した有機合成反応を参考にする
こととした。すなわち、 4β , 5β -または 5α , 6α -エポキシドを有するステロイド化合物をそれぞ
れギ酸または三フッ化ホウ素で処理することで、いずれも austinoid C (**20**) と同様のスピロ
環構造を有する化合物へと変換されるというものである (Figure 3-10)^{108, 109}。このことは、
C-5 位にカルボカチオンが生じることで、自発的にスピロ環形成に至ることを示唆している。
本反応と上述の α -KG 依存型ジオキシゲナーゼの反応機構とを踏まえて、AusE の反応を以下
のように推定した。まず、活性種である鉄-オキソ中間体により基質 **16** の C-5 位の水素原子
が引き抜かれラジカルを生じた後、水酸化を受け、二価鉄に結合した中間体を与える。さら
に、この水酸基の脱離に伴う転位反応により反応生成物 **17** のスピロラクトン骨格を生じるも
のと考えられる (Scheme 3-3A)。

他方で、上記の反応機構とは異なり水酸化を経ないメカニズムも提唱されている¹¹⁰。この
場合、C-5 位の水素原子の引き抜きによるラジカルの発生までは共通であるが、その後 C-1、
C-5 間で炭素-炭素結合が形成されたのち、C-1、C-10 間の炭素-炭素結合が開裂することで、
スピロ環構造を有するラジカル種が生じる。最終的に、C-9 位の水素原子の引き抜きに伴う
二重結合の導入が起これば反応が完結する (Scheme 3-3B)。現時点では、どちらの反応機構
で進行しているかは明らかではなく、その検証も困難であると考えられるが、C-1、C-2 間に
二重結合を有さないスピロ化合物 (たとえば、化合物 **14** や **15** が直接転位反応を起こしたと
考えられる化合物) が単離されていないことや、前者の反応機構では *syn* 脱離が要求される
ことを考慮すると、後者の反応機構がよりもらしいと考えられる。

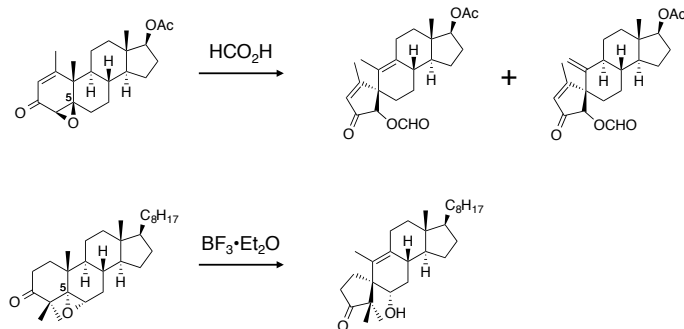
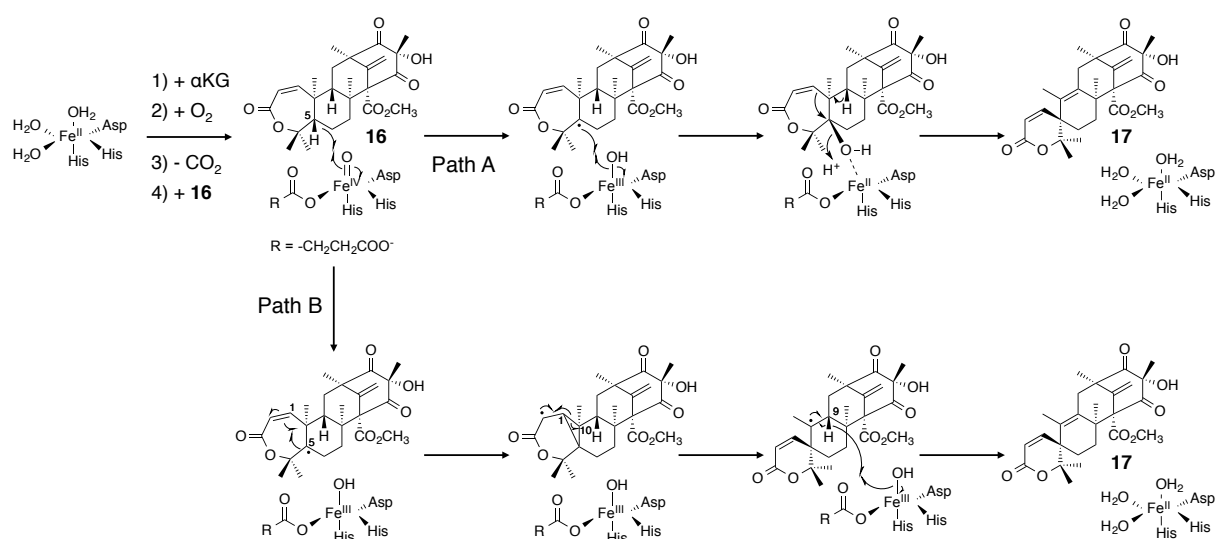


Figure 3-10. Spiro-ring formation by organic synthetic approaches.



Scheme 3-3. Proposed reaction mechanism for spiro-ring formation.

Fe(II)および α -KG 依存型ジオキシゲナーゼは、次章で詳述する反応を含め、非常に多様な、また特異な反応に関わることが知られており、たとえば、cephalosporin 生合成における環拡大反応¹¹や stipitatic acid 生合成におけるトロポロン形成反応¹³などが挙げられる (Figure 1-1)。また、クラブミン酸合成酵素はクラブラン酸生合成において、AusE と同様に三段階の異なる反応を触媒することが知られている¹¹¹。しかしながら、AusE の触媒するようなスピロ環形成反応は、 α -KG 依存型ジオキシゲナーゼの関わる反応としてこれまで報告されていない。また、austinol と類似したスピロラクトン骨格は先述の andbenin 類^{39, 112}のほか、センダン科植物 *Carapa grandiflora* に由来する carapolide D および G¹¹³ など極少数の天然物の構造に見られるが (Figure 3-11)、これらの生合成遺伝子はいまだ報告されていない。Austinol との構造類似性を踏まえると、上記の化合物の生合成にも類似したジオキシゲナーゼが関与している可能

性は高く、本研究はこれらの生合成研究の進展にも寄与するものと考えられる。

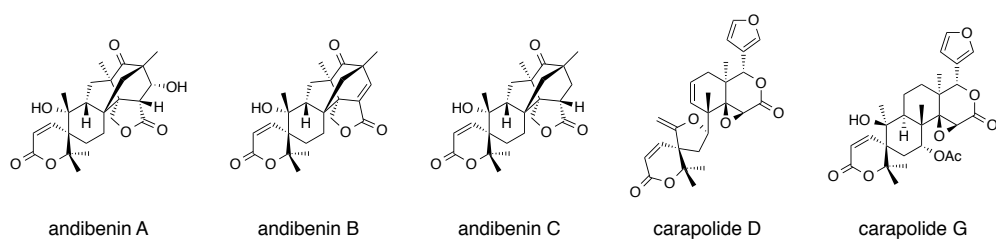


Figure 3-11. Natural products with the spiro-lactone system similar to that of austinol.

第 4 章 Anditomin の生合成研究

4-1. 背景・目的

Anditomin (**21**) ならびにその類縁化合物 andilesin A-C (**22-24**)、andibenin A-C、emervaridione は、糸状菌 *Aspergillus variegator* あるいは、その完全世代である *Emericella variegator* より単離されたメロテルペノイドであり、奇異な分子内架橋構造を有する点で特徴的な化合物群である (Figure 4-1) ^{39, 40, 112, 114, 115}。Simpson、Vederas らによって行われた同位体標識化合物の投与実験により、**21** が DMOA (**9**) およびファルネシル二リン酸 (FPP、**25**) に由来することが明らかにされるとともに、その生合成経路も以下のように提唱されている (Figure 4-2) ¹¹⁶⁻¹¹⁹。すなわち、**9** が **25** と付加することで、ファルネシル化されたシクロヘキサジエノン誘導体を生じたのち、末端二重結合のエポキシ化、ファルネシル基の環化を経て、エキソメチレンを有する環化中間体へと変換される。その後、分子内[4 + 2]環化付加反応 (Diels-Alder 反応) によって、andilesin 類および andibenin 類に共通のビシクロ[2.2.2]オクタン骨格が形成されるものと予想されている。得られた中間体はさらに酸化還元反応等の修飾反応を受けて **22** へと変換され、次いで **23** を経て **24** となったのち、**24** が酸化的転位反応を受けることで最終産物 **21** が合成されるものと考えられる。なお、andibenin 類は対応する andilesin 類から、おそらく前章で扱った AusE と類似した酵素の働きにより、生合成されると推察される。このように生合成研究や生合成経路の提唱はなされているものの、これら一連の化合物の生合成遺伝子、酵素はこれまでに全く報告がなされていない。

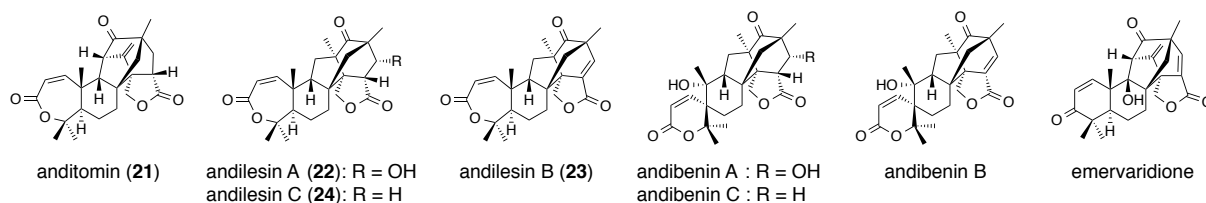


Figure 4-1. Structures of anditomin (**21**) and related natural products.

[4 + 2]環化付加反応を担う酵素は、すでにいくつか報告されているものの、真に Diels-Alder 反応を担うことが証明された酵素は未だ一例も存在しない¹²⁰。したがって、**21** の生合成研究を酵素レベルで行うことで、Diels-Alder 反応を担う酵素の発見につながる可能性がある。加えて、すでに生合成研究を行った terretonin、austinol、andrastin A といった DMOA 由来メロテルペノイド化合物の生合成経路や酵素群を **21** のそれらと比較することで、糸状菌が単純な芳香族化合物である **9** から如何にして多様な化合物を生み出すのかについて、新たな知見を

得られるものと期待される。そこで、**21** の生合成遺伝子の探索ならびに[4 + 2]環化付加反応を担う酵素の同定、ひいては全生合成経路の解明を目指すこととした。

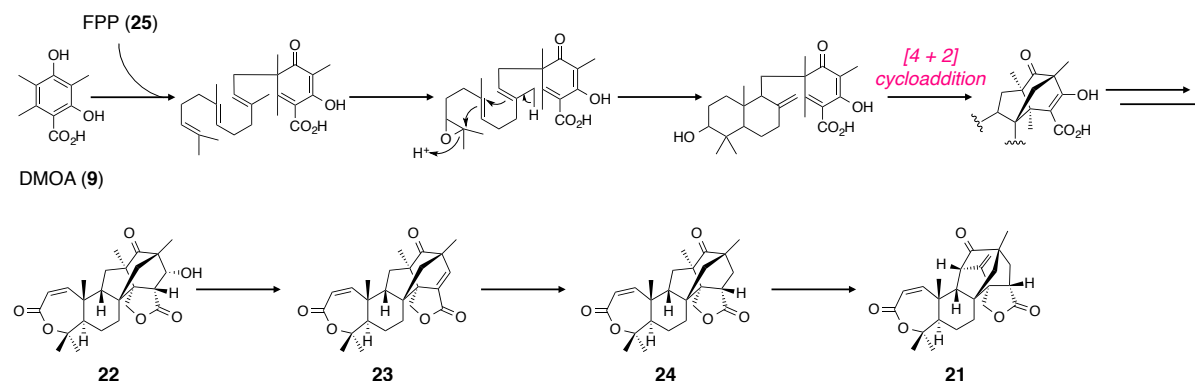


Figure 4-2. Proposed biosynthetic pathway of anditomin (**21**).

4-2. Anditomin生合成遺伝子クラスターの発見と生物情報学的解析

Anditomin (**21**) を生産する糸状菌のゲノム情報は公開されていないことから、まず、**21** および **24** の生産菌として知られる *E. varicolor* NBRC 32302 (CMI 60316) 株⁴⁰ のドラフトゲノムシーケンス解析を実施することとした。本ゲノム中に、既知の DMOA 合成酵素のホモログをコードする遺伝子を検索したところ、ひとつの候補遺伝子が見出された。その遺伝子産物は、Trt4⁵⁴、AusA⁹⁶、AdrD といった既知のポリケタイド合成酵素 (PKS) と 50%以上の配列同一性を有しており、そのドメイン構造も同一であった。さらに、本遺伝子の近傍を探索することによって **21** の生合成に関わると推定される遺伝子クラスターを見出すことができ、これを *and* クラスターと命名した (Figure 4-3)。

本遺伝子クラスターは、メロテルペノイド生合成に関わる典型的な酵素として、PKS (AndM)、プレニル基転移酵素 (AndD)、FAD 依存型エポキシダーゼ (AndE)、テルペン環化酵素 (AndB) をコードしており、これらは生合成の初期段階に関与するものと推定される。また、*and* クラスターは 2つの非ヘム鉄依存型ジオキシゲナーゼ (AndA、AndF)、3つの短鎖型脱水素酵素/還元酵素 (SDR: AndC、AndH、AndI)、アセチル基転移酵素 (AndG)、FAD 依存型モノオキシゲナーゼ (FMO: AndJ) をコードしており、これらは生合成の中後期において働く修飾酵素群であると予想される。興味深いことに本クラスターは、他の DMOA 由来メロテルペノイド (terretonin、austinol、andrastin A) の生合成に関わるメチル基転移酵素^{55, 56} のホモログをコードしていなかった。第 1 章で述べたとおり、このメチル基転移酵素によるカルボキシル基のメチル化は、テルペン環化酵素による閉環反応の進行に必須である。しか

しながら、*E. varicolor* のゲノム全体を検索しても、これらメチル基転移酵素と高い同一性を有するタンパク質をコードする遺伝子は見出されなかった。他方で、*adr* クラスタは P450 モノオキシゲナーゼと加水分解酵素のキメラタンパク質である AndK をコードしており、本酵素は mycophenolic acid 生合成に関わる MpaD/MpaE^{57, 121} とおよそ 50%の同一性を有することが判明した。MpaD/MpaE は、5-methylorsellinic acid (5-MOA) を基質として、5,7-dihydroxy-4-methylphtalide (DHMP) を与える酵素である (Figure 4-4A)。本酵素反応においては、P450 ドメインがメチル基の水酸化を、加水分解酵素ドメインがラクトン化をそれぞれ担うことが明らかにされている。これを踏まえると、AndK は DMOA (9) を基質として同様の二段階の反応を触媒し、5,7-dihydroxy-4,6- dimethylphtalide (DHDMP) を与えるものと推定される (Figure 4-4B)。DHDMP は、次いでファルネシル基転移酵素 (AndD)、エポキシダーゼ (AndE)、テルペン環化酵素 (AndB) によって、Figure 4-2 に示すような二環性のテルペノイド部位を有する中間体へと変換されると予想できる (Figure 4-5)。

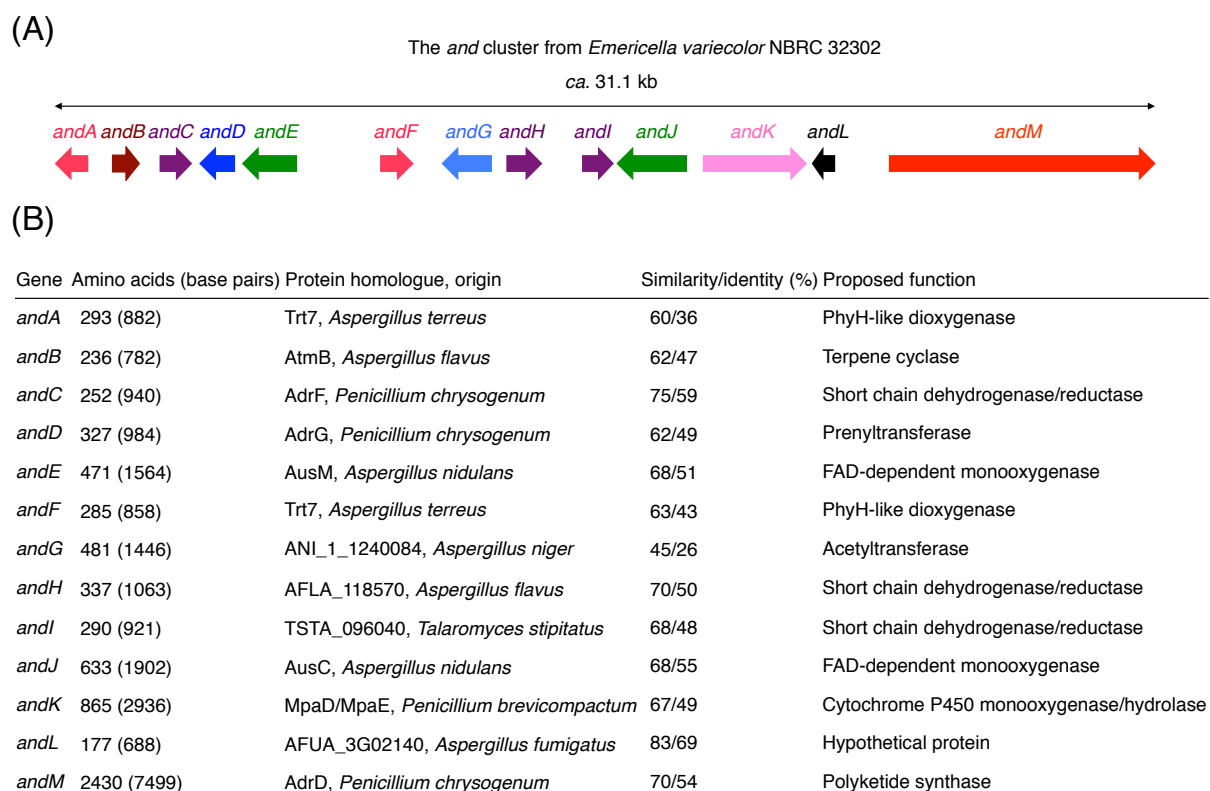


Figure 4-3. (A) Schematic representation of the *and* cluster. The direction of the arrow indicates the direction from the start to the stop codon. (B) Annotation of each protein in the *and* cluster. The deduced function of each open reading frame (ORF) and the amino acid sequence similarity/identity, as compared with the homologues found by a BLAST search at NCBI, are shown.

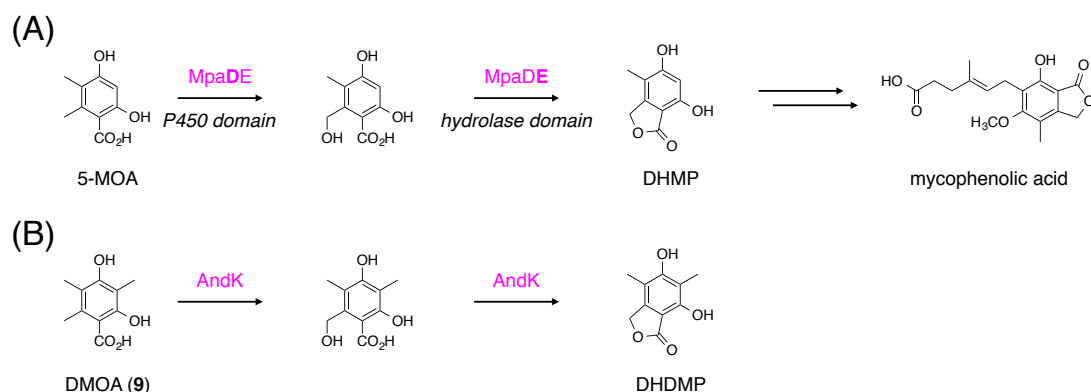


Figure 4-4. (A) Lactonization by MpaDE in the mycophenolic acid biosynthesis. (B) Proposed function of AndK in the anditomin pathway.

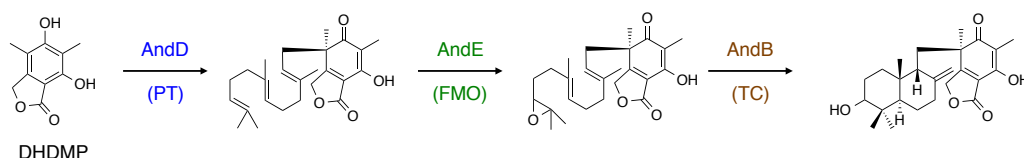


Figure 4-5. Predicted early-stage biosynthesis of anditomin.

4-3. 生合成初期段階の解明

生合成の初期段階に関与すると予想された 5 つの酵素遺伝子の機能を明らかにすべく、これらを予想生合成経路に沿って順次 *A. oryzae* NSAR1 株⁸⁷にて異種発現させることとした。まず、PKS 遺伝子である *andM* の単独発現株を構築したところ、空ベクターを導入したネガティブコントロール株には見られない新規化合物 **9** が検出された (Figure 4-6A、レーン i および ii)。予想されたとおり、¹H-および ¹³C-NMR、MS 分析によって **9** は DMOA⁵⁴であると判明し (Table 4-1)、AndM は DMOA 合成酵素であると確認された。つづいて、*andM*、*andK* 共発現系においては新たに化合物 **26** が生成した (Figure 4-6A、レーン iii)。本化合物もまた、期待されたとおり DHDMP¹²²であると判明し (Table 4-2)、したがって、AndK は MpaD/MpaE と同様にフタリド化合物の合成に関わる酵素であると明らかになった。

さらにプレニル基転移酵素遺伝子 *andD* を導入した形質転換体においては、その培養上清抽出物に新規代謝物は検出されなかったものの (Figure 4-6A、レーン vi)、菌体抽出物中に疎水性の高い化合物 **27** の生成が認められた (Figure 4-6B、レーン ii)。単離精製後、本化合物の ¹H-NMR を測定したところ、**26** のそれと比して新たに、4 つのアリルメチル、3 つのオレフィンメチン、複数のメチレンに由来するシグナルが観測された。また、¹³C-NMR スペクトル上

には 25 本のシグナルの存在が確認されたことから、**26** に対してファルネシル化が進行したことが強く示唆された。さらに、二次元 NMR 解析の結果、**27** は **26** の C-4 位にファルネシル基が付加した化合物であると決定でき、これを farnesyl-DHDMP と命名した (Table 4-3)。残念ながら、エポキシダーゼ遺伝子 *andE* をさらに導入した 4 遺伝子発現系からは期待された代謝産物である epoxyfarnesyl-DHDMP (**28**) は単離されなかったが、代わりに dihydroxyfarnesyl-DHDMP (**28'**) が得られた (Figure 4-6A、レーン v; Table 4-4)。化合物 **28'** は **28** のエポキシドが加水分解を受けて生じたものであり、本反応は非酵素的に、あるいは宿主由来の酵素によって進行したものと考えられることから、AndE は、基質 **27** の C-10'位、C-11'位にエポキシドを形成する酵素であると結論づけた。

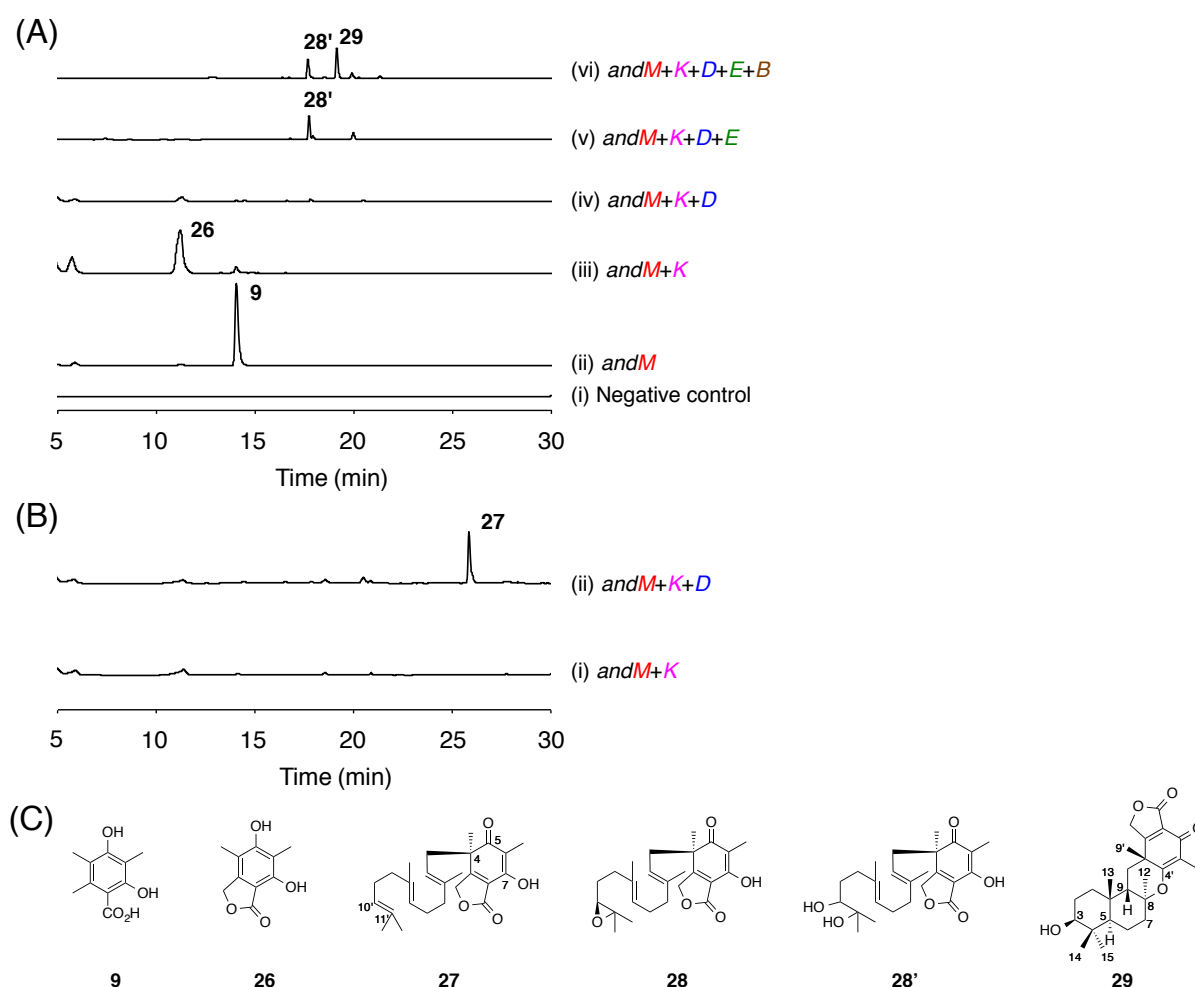
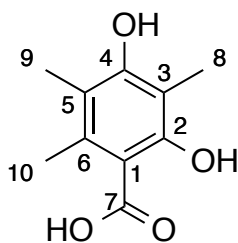


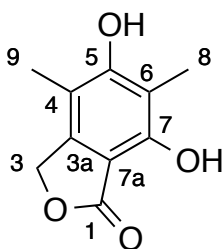
Figure 4-6. Reconstitution of the early-stage biosynthesis of **21** in the *A. oryzae* expression system. (A) HPLC profiles of culture supernatant extracts from transformants harboring (i) only empty vectors; (ii) *andM*; (iii) *andM+K*; (iv) *andM+K+D*; (v) *andM+K+D+E*; (vi) *andM+K+D+E+B*. (B) HPLC profiles of mycelial extracts from transformants harboring (i) *andM+K*; (ii) *andM+K+D*. (C) Structures of compounds **9** and **26-29**. The chromatograms were monitored at 254 nm.

つづいて、テルペン環化酵素遺伝子 *andB* を含む 5 遺伝子発現系からは、**28'**に加えて *andB* 特異的な代謝産物として化合物 **29** が検出された (Figure 4-6A、レーン vi)。また、高分解能質量分析の結果、**29** の分子式は $C_{25}H_{34}O_5$ と決定され、これは予想された構造式のそれと一致するものであった。さらに、 1H -NMR スペクトル上では、3.21 ppm に dd ($J=11.9, 2.8$ Hz) のオキシメチンシグナルが検出されるとともに、**27** や **28'**のスペクトル上では見られたオレフィンメチンシグナルが消失しており、ファルネシル基の環化反応が進行したことを強く示唆していた。しかしながら、驚くべきことに、エキソメチレンに由来すると考えられるシグナルは観測されず、**29** の構造は当初推定されたものとは異なることが判明した。さらに、 ^{13}C -NMR スペクトルにおいて、C-8 位のシグナルは 85.7 ppm に観測されたことから、この位置に酸素原子が結合しているものと考えられた。加えて、**27** や **28'**のスペクトルには存在する C-5、C-7 位由来のシグナルが消失した代わりに、180 ppm 付近に 2 つのシグナルが出現していた。以上のことを踏まえると、C-4'、C-8 間に新たにエーテル結合が形成され、それに伴ってフタリド **26** に由来する部分構造の共役系に変化が生じたものと推察された。さらに、HMBC スペクトルを解析することで、**29** の平面構造を決定し、本化合物が五環性の分子骨格を有することを明らかにした。相対立体配置については、H-5 と H-3/H-7 α /H-15、H-7 α と H-12、H-9 と H-13/H-9'、H-13 と H-14 間の NOESY 相関をもとにして決定した (Table 4-5)。なお、本化合物を preandiloid A と命名した。

Table 4-1. NMR data for DMOA (**9**)

position	¹³ C	¹ H		
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity
1	106.8			
2	161.5			
3	109.5			
4	159.4			
5	117.1			
6	138.8			
7	176.0			
8	8.8	2.06	3H	s
9	12.4	2.11	3H	s
10	19.0	2.46	3H	s

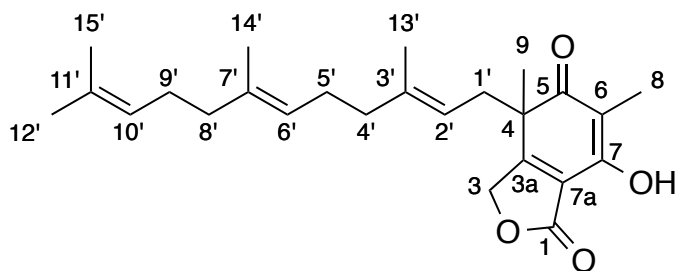
¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CD₃OD)

Table 4-2. NMR data for DHDMP (**26**)

position	¹³ C	¹ H		
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity
1	173.3			
3	145.3	5.23	2H	s
3a	70.3			
4	110.7			
5	161.3			
6	111.5			
7	154.1			
7a	103.3			
8	8.3	2.12	3H	s
9	11.4	2.10	3H	s

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in acetone-*d*₆)

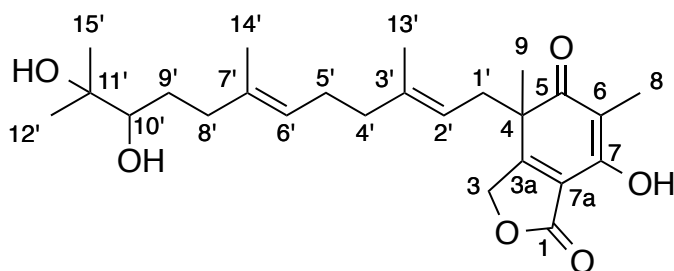
Table 4-3. NMR data for farnesyl-DHDMP (27)



position	¹³ C	¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation
1	171.9					
3	71.3	4.98	2H	s	1, 3a, 7a	
3a	172.8					
4	51.1					
5	201.3					
6	112.0					
7	156.3					
7a	116.8					
8	7.1	1.84	3H	s	5, 6, 7	
9	23.7	1.36	3H	s	3a, 4, 5, 1'	
1'	38.9	2.75	1H	dd (<i>J</i> = 14.2, 7.4 Hz)	3a, 4, 9, 2', 3'	H-2'
		2.33	1H	dd (<i>J</i> = 14.2, 7.4 Hz)	3a, 4, 5, 9, 2', 3'	H-2'
2'	117.0	4.78	1H	brt (<i>J</i> = 7.4 Hz)	4', 13'	H-1', H-13'
3'	140.3					
4'	39.7	1.94	2H	m	2', 3', 5', 6', 13'	
5'	26.6	1.95	2H	m	3', 6', 7'	
6'	123.5	5.00	1H	brt (<i>J</i> = 6.8 Hz)	5', 8', 14'	H-5', H-14'
7'	135.6					
8'	39.7	2.03	2H	m	7', 10'	
9'	26.7	2.03	2H	m	7', 8', 10', 11'	
10'	124.2	5.07	1H	brt (<i>J</i> = 6.8 Hz)	12', 15'	H-9', H-12', H-15'
11'	131.4					
12'	25.7	1.67	3H	brs	10', 11', 15'	H-10'
13'	16.4	1.56	3H	brs	2', 3', 4'	H-2'
14'	16.0	1.56	3H	brs	6', 7', 8'	H-6'
15'	17.7	1.59	3H	brs	10', 11', 12'	H-10'
OH		7.99	1H	brs		

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

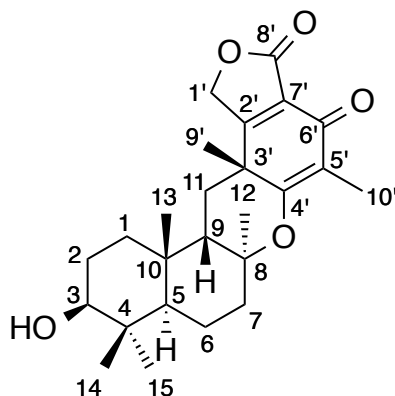
Table 4-4. NMR data for dihydroxyfarnesyl-DHDMP (**28'**)



position	¹³ C	¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation
1	171.9					
3	71.1	4.99	2H	s	1, 3a, 7a	
3a	172.9					
4	51.1					
5	201.3					
6	112.1					
7	156.4					
7a	117.0					
8	7.1	1.84	3H	s	5, 6, 7	
9	24.1	1.36	3H	s	3a, 4, 5, 1'	
1'	38.9	2.79	1H	dd (<i>J</i> = 14.6, 7.3 Hz)	3a, 4, 5, 9, 2', 3'	H-2'
		2.33	1H	dd (<i>J</i> = 14.0, 7.9 Hz)	3a, 4, 5, 9, 2', 3'	H-2'
2'	117.3	4.72	1H	brt (<i>J</i> = 7.0 Hz)	1', 4', 13'	H-1', H-13'
3'	139.7					
4'	39.5	2.00	1H	m		
		1.94	1H	m		
5'	26.0	2.00	1H	m		
		1.94	1H	m		
6'	124.2	5.03	1H	brt (<i>J</i> = 6.5 Hz)	4', 5', 8', 14'	H-5', H-14'
7'	135.3					
8'	36.7	2.20	1H	m	6', 7', 9', 10', 14'	H-9'
		2.03	1H	m		H-9'
9'	29.7	1.59	1H	m	7', 8'	H-8', H-10'
		1.37	1H	m		H-8', H-10'
10'	78.2	3.33	1H	dd (<i>J</i> = 10.7, 2.2 Hz)	8', 9', 11', 12', 15'	H-9'
11'	73.0					
12'	23.4	1.17	3H	brs	10', 11', 15'	
13'	16.3	1.56	3H	brs	2', 3', 4'	H-2'
14'	15.9	1.57	3H	brs	6', 7', 8'	H-6'
15'	26.4	1.21	3H	brs	10', 11', 12'	

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

Table 4-5. NMR data for preandiloid A (**29**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	32.0	1.25 (α)	1H	dt (<i>J</i> = 13.0, 3.4 Hz)	13	H-2α, H-2β	H-3, H-5
		1.32 (β)	1H	td (<i>J</i> = 13.0, 4.0 Hz)	2, 3, 5, 10, 13	H-2α, H-2β	H-13
2	28.4	1.74 (α)	1H	m		H-1α, H-1β, H-3	H-3
		1.58 (β)	1H	m		H-1α, H-1β, H-3	H-13, H-14
3	78.5	3.21	1H	dd (<i>J</i> = 11.9, 2.8 Hz)	14, 15	H-2α, H-2β	H-2α, H-5, H-15
4	39.1						
5	47.1	1.20	1H	dd (<i>J</i> = 12.5, 2.3 Hz)	1, 3, 4, 6, 7, 10, 13, 14, 15	H-6α, H-6β	H-1α, H-3, H-6α, H-7α, H-15
6	16.6	1.73 (α)	1H	m	8, 10	H-5, H-7α, H-7β	H-5, H-15
		1.62 (β)	1H	m	5, 8	H-5, H-7α, H-7β	H-14
7	38.3	1.95 (α)	1H	dt (<i>J</i> = 14.2, 9.6 Hz)	6, 8, 9, 12	H-6α, H-6β	H-5, H-12
		2.18 (β)	1H	brd (<i>J</i> = 14.2 Hz)	5, 6, 8	H-6α, H-6β	
8	85.7						
9	45.7	2.17	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 2.8 Hz)	1, 5, 8, 10, 11, 13	H-11α, H-11β	H-11β, H-13, H-9'
10	35.9						
11	29.8	1.80 (α)	1H	m	9, 3', 4', 9'	H-9	H-1'
		1.65 (β)	1H	m	9, 3', 4'	H-9	H-9, H-1'
12	25.4	1.28	3H	s	7, 8, 9		H-7α
13	21.7	1.05	3H	s	1, 9, 10		H-1β, H-2β, H-9, H-14
14	15.9	0.82	3H	s	3, 4, 5, 15		H-2β, H-6β, H-15
15	28.9	1.00	3H	s	3, 4, 5, 14		H-3, H-5, H-6α, H-14
1'	66.7	4.94	2H	s	2', 7', 8'		H-11α, H-11β
2'	180.1						
3'	39.8						
4'	169.6						
5'	122.6						
6'	180.0						
7'	121.0						
8'	167.7						
9'	27.3	1.52	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-9, H-1'
10'	8.0	1.79	3H	s	4', 5', 6'		

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

4-4. 修飾酵素群の機能予測ならびに生合成中期段階の解明

当初の予想に反して五環性の化合物 **29** が生成したものの、本化合物が anditomin 生合成中間体であると仮定し、修飾酵素群の機能解析を実施することとした。修飾酵素の機能する順序を予測することは困難であったことから、種々の組み合わせで修飾酵素を発現する *A. oryzae* 形質転換体を構築し、そこに基質となる **29** を投与した際の代謝物を分析することで各酵素機能の推定を試みた。なお、**21-24** はいずれもアセチル基を有さないことから、**21** の生合成にアセチル基転移酵素 AndG は関与しないものと推測した。したがって、この時点では解析対象として6つの酵素遺伝子 (*andA*、*andC*、*andF*、*andH*、*andI*、*andJ*) が残ることとなった。まず、これら6遺伝子全てを発現する形質転換体を作製し、その培養液中に **29** を 30 mg/L の濃度で投与したところ、 m/z 429 $[M+H]^+$ を有する化合物 **22** の生成が確認されたが (Figure 4-7、レーン viii)、**22** の分子量は anditomin (**21**) のそれとは異なるものであった。

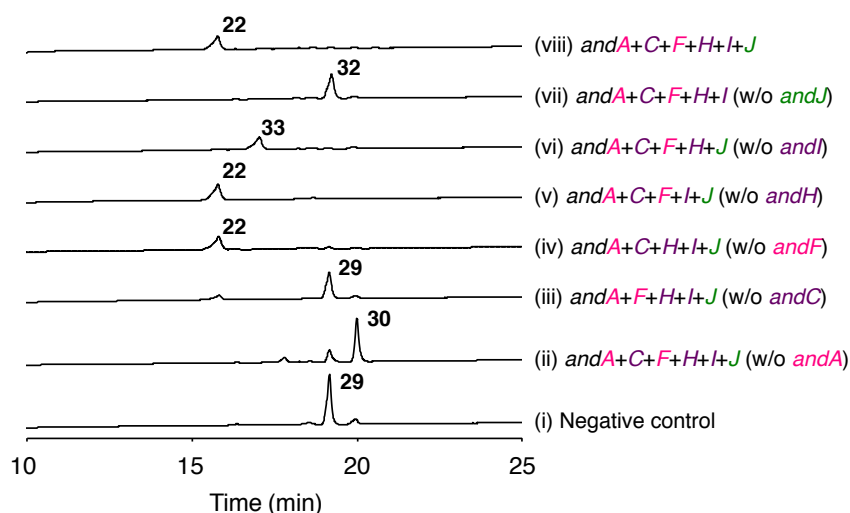


Figure 4-7. HPLC profiles of culture supernatant extracts from *A. oryzae* transformants incubated with **29**. Transformants (i) with only empty vectors; (ii) lacking *andA*; (iii) lacking *andC*; (iv) lacking *andF*; (v) lacking *andH*; (vi) lacking *andI*; (vii) lacking *andJ*; (viii) with *andA+C+F+H+I+J*. The chromatograms were monitored at 210 nm.

導入した各酵素機能に関するより詳細な知見を得るべく、次いで6つの遺伝子のうちひとつだけを欠く系をそれぞれ構築し、そこに **29** を与えた際に得られる化合物について精査することとした。その結果、*andF* または *andH* を含まない系においては引き続き **22** が得られることが判明した (Figure 4-7、レーン iv および v)。すなわち、これら両遺伝子は **22** の生合成に関与していないと言える。次に、*andC* を欠いた系においては、**29** は代謝されなかったことから (Figure 4-7、レーン iii)、AndC は **29** を基質とする酵素であることが示唆される。AndC は、

terretonin および andrastin A 生合成においてそれぞれ C-3 位の水酸基を酸化しケトンを与える Trt9⁷⁰ や AdrF とおよそ 60%の配列同一性を有することから、これらと同様の機能により **29** を対応するケトン体へと変換するものと推定される。非ヘム鉄依存型ジオキシゲナーゼをコードする *andA* を持たない形質転換体から得られた化合物 **30** は、**29** と類似した UV 吸収スペクトルならびに m/z 413 $[M + H]^+$ を有しており、**30** は AndC が **29** を酸化することで生じた化合物であると考えられる (Figure 4-8)。

つづいて、*andJ* を欠損させた系で得られた化合物 **32** は m/z 411 $[M + H]^+$ を有しており (Figure 4-7、レーン ii)、**30** よりも分子量が 2 Da だけ小さい化合物であると判明したが、その UV 吸収スペクトルは **29** や **30** のそれらとは大きく異なっていた。したがって、**32** は AndA による **30** の酸化によって生じた化合物であること、また、**32** の生成にあたっては大きな構造変換が生じたことが示唆された。おそらく、andilesin 類に共通の分子骨格がこの段階で合成されたものと予想される (Figure 4-8)。他方で、AndJ は austinol 生合成に関わる Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼ AusC と 55%の配列同一性を有しており、したがって、AndA により生じた **32** の Baeyer-Villiger 酸化により、七員環ラクトンを与えるものと期待された。ここで、*andI* を保持しない系においては、**32** より分子量が 16 Da 大きい化合物 **33** が検出されていることから (Figure 4-7、レーン vi)、本化合物が AusJ の酵素反応生成物であると推定される (Figure 4-8)。さらに、AndI が SDR であること、**33** と **22** の分子量の差が 2 Da であることを考慮すると、AndI は **33** のケト基を還元しアルコールを与える酵素であるとともに、その生成物が andilesin A であると予想可能であった (Figure 4-8)。

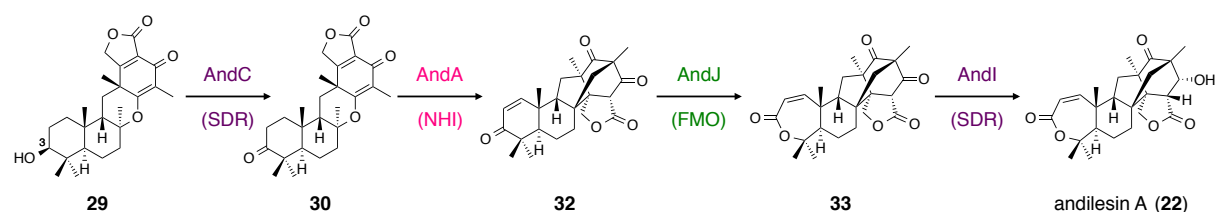


Figure 4-8. Proposed biosynthetic pathway leading to andilesin A (**22**).

22 に至る予想生合成経路を証明するとともに、各生合成中間体を単離構造決定すべく、先に構築した **29** を合成する *A. oryzae* 形質転換体に対して、さらに上記の修飾酵素群を順次導入することとした。まず、デヒドロゲナーゼ遺伝子 *andC* を導入したところ、期待されたとおりに化合物 **30** が生成した (Figure 4-9、レーン ii)。単離精製後、各種スペクトル解析に供したところ、**30** は実際に **29** のケトン体であると判明し、これを preandiloid B と命名した (Table 4-6)。つづいて、さらにジオキシゲナーゼ遺伝子 *andA* を加えた際には、化合物 **32** のみなら

ず、微量ながら **31** も生成することが判明した (Figure 4-9、レーン iii)。**31** は **30** の脱水素化体で、C-1、C-2 間に二重結合を有する化合物であると判明し、これを preandiloid C と命名した (Table 4-7)。一方で、**32** は **31** と同一の分子式 ($C_{25}H_{30}O_5$) を有するにも関わらず、その NMR スペクトルは **31** のそれとは大きく異なっていた。 1H -NMR スペクトルにおいては、新たに 3.68 ppm にシングレットのメチンシグナルが観察された一方で、メチル基に由来するシグナルが一本消失していた。さらに、 ^{13}C -NMR スペクトルにおいては、**31** の C-8、C-2'、C-4'、C-5'、C-6'、C-7' に由来する低磁場側のシグナルがいずれも消失するとともに、新たに 200 ppm 付近に 2 つのシグナルが出現しており、**32** の合成に際して劇的な構造変換が起きたことが強く示唆された。二次元 NMR スペクトル解析によって、**32** の構造を決定したところ、andilesin 類と同様なビスクロ[2.2.2]オクタン骨格を有する化合物であると判明し、これを andiconin と命名した (Table 4-8)。次いで、Baeyer-Villiger モノオキシゲナーゼ遺伝子 *andJ* を含む 8 遺伝子発現系は、特異的な代謝物として化合物 **33** を生成したが (Figure 4-9、レーン iv)、本化合物は **32** の酸化体であると決定されるとともに、andilesin D と命名された (Table 4-9)。最後に、さらに SDR 遺伝子 *andI* を導入することで化合物 **22** の生成が確認され (Figure 4-9、レーン v)、本化合物は期待されたとおり、既知天然物 andilesin A¹¹² であると決定された (Table 4-10)。以上の結果により、andilesin A (**22**) に至る生合成経路の確立に成功した。

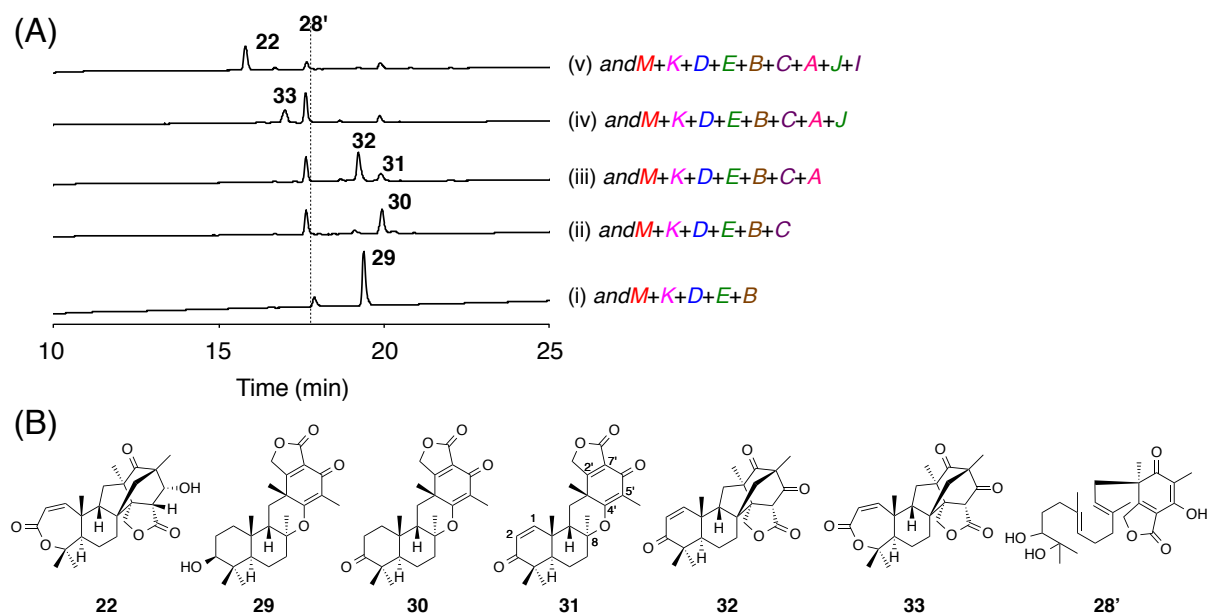
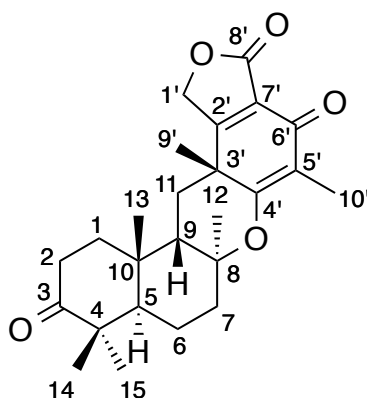


Figure 4-9. Functional analyses of the tailoring enzymes. (A) HPLC profiles of culture supernatant extracts from transformants harboring (i) *andM+K+D+E+B*; (ii) *andM+K+D+E+B+C*; (iii) *andM+K+D+E+B+C+A*; (iv) *andM+K+D+E+B+C+A+J*; (v) *andM+K+D+E+B+C+A+J+I*. (C) Structures of compounds **22** and **29-33**. The chromatograms were monitored at 210 nm.

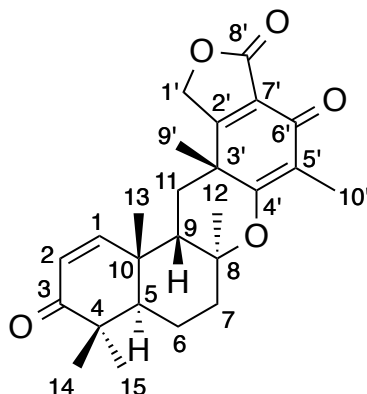
Table 4-6. NMR data for preandiloid B (**30**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	30.3	1.88 (α) 1.43 (β)	1H 1H	m ddd (<i>J</i> = 13.0, 9.6, 5.7 Hz)		H-2α, H-2β H-2α, H-2β	H-2β, H-11β, H-13
2	33.1	2.63 (α) 2.32 (β)	1H 1H	ddd (<i>J</i> = 16.2, 11.9, 5.4 Hz) ddd (<i>J</i> = 16.4, 9.6, 3.4 Hz)	1, 3 3, 10	H-1α, H-1β H-1α, H-1β	H-1α, H-5, H-15 H-1β, H-13, H-14
3	218.0						
4	46.8						
5	46.2	1.95	1H	dd (<i>J</i> = 12.7, 2.6 Hz)	4, 6, 7, 13, 14, 15	H-6	H-2α, H-12, H-15
6	18.0	1.65	2H	m		H-5, H-7α, H-7β	
7	37.5	1.99 (α) 2.27 (β)	1H 1H	m brd (<i>J</i> = 8.0 Hz)	8 5, 6, 8, 12	H-6 H-6	H-12
8	85.1						
9	43.6	2.24	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 4.0 Hz)	10, 12, 13	H-11α, H-11β	H-11β, H-13, H-9'
10	35.2						
11	29.5	1.86 (α) 1.72 (β)	1H 1H	t (<i>J</i> = 13.0 Hz) dd (<i>J</i> = 13.0, 3.4 Hz)	8, 3' 8, 3'	H-9 H-9	H-12 H-1β, H-9
12	25.3	1.36	3H	s	7, 8, 9		H-5, H-7α, H-11α
13	22.0	0.91	3H	s	1, 5, 9, 10		H-1β, H-2β, H-9, H-14
14	19.5	1.06	3H	s	3, 4, 5, 15		H-13
15	29.1	1.08	3H	s	3, 4, 5, 14		H-2α, H-5
1'	66.8	4.95	2H	d (<i>J</i> = 1.1 Hz)	2', 7', 8'		
2'	179.9						
3'	39.6						
4'	169.2						
5'	122.6						
6'	179.9						
7'	121.0						
8'	167.6						
9'	27.0	1.53	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-9
10'	8.0	1.80	3H	s	4', 5', 6'		

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

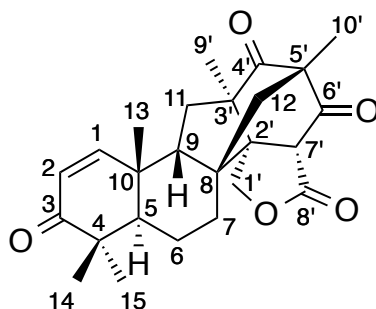
Table 4-7. NMR data for preandiloid C (**31**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	155.1	7.09	1H	d (<i>J</i> = 10.1 Hz)	3, 5, 9, 10	H-2	H-2, H-13
2	129.0	5.92	1H	d (<i>J</i> = 10.1 Hz)	4, 10	H-1	H-1
3	204.7						
4	45.2						
5	46.9	2.02	1H	m	4, 6, 7, 9, 10, 14	H-6	H-12, H-15
6	17.2	1.75	2H	m		H-5, H-7α, H-7β	
7	38.4	2.04 (α)	1H	m	8, 9, 12	H-6	H-12
		2.31 (β)	1H	m		H-6	
8	84.8						
9	44.1	2.29	1H	dd (<i>J</i> = 13.5, 2.8 Hz)		H-11α, H-11β	H-11β, H-13, H-9'
10	38.4						
11	30.5	2.05 (α)	1H	t (<i>J</i> = 13.5 Hz)	2'	H-9	H-12
		1.85 (β)	1H	dd (<i>J</i> = 12.9, 3.4 Hz)	8, 9, 9'	H-9	H-9, H-13, H-9'
12	24.2	1.23	3H	s	7, 8, 9		H-5, H-7α, H-11α
13	27.5	1.24	3H	s	1, 5, 9, 10		H-1, H-9, H-11β
14	20.9	1.17	3H	s	3, 4, 5, 15		
15	29.2	1.14	3H	s	3, 4, 5, 14		H-5
1'	66.7	5.03	1H	d (<i>J</i> = 18.5 Hz)	2', 7', 8'		
		4.98	1H	d (<i>J</i> = 18.5 Hz)			
2'	179.4						
3'	39.7						
4'	168.5						
5'	123.2						
6'	179.8						
7'	121.2						
8'	167.5						
9'	26.9	1.58	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-9, H-11β
10'	8.0	1.81	3H	s	4', 5', 6'		

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

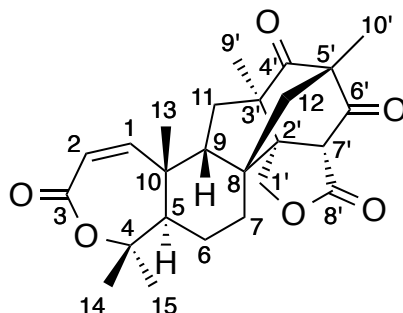
Table 4-8. NMR data for andiconin (**32**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	153.5	6.37	1H	d (<i>J</i> = 10.1 Hz)	3, 5, 9, 10	H-2	H-2, H-9, H-13
2	125.6	5.89	1H	d (<i>J</i> = 10.1 Hz)	4, 10	H-1	H-1
3	203.4						
4	44.1						
5	38.8	1.33	1H	dd (<i>J</i> = 12.9, 6.2 Hz)	4, 6, 10, 13, 15	H-6α, H-6β	H-6α, H-15
6	18.1	1.91 (α)	1H	m	4, 5, 7, 10	H-5, H-7α, H-7β	H-5, H-14, H-15
		1.76 (β)	1H	m	5, 7, 10	H-5, H-7α, H-7β	H-13, H-14, H-15
7	24.4	2.11 (α)	1H	m		H-6α, H-6β	H-7'
		1.93 (β)	1H	m		H-6α, H-6β	H-13
8	44.8						
9	56.13	1.66	1H	t (<i>J</i> = 8.7 Hz)	5, 7, 8, 10, 12, 13	H-11α, H-11β	H-11β, H-13, H-12α
10	38.4						
11	37.8	1.92 (α)	1H	m		H-9	H-9'
		1.31 (β)	1H	m		H-9	H-9
12	51.5	1.47 (α)	1H	d (<i>J</i> = 13.5 Hz)	8, 9, 2', 5', 6', 10'		H-9, H-10'
		1.99 (β)	1H	d (<i>J</i> = 13.5 Hz)			H-7', H-10'
13	22.7	1.30	3H	s	1, 5, 9, 10		H-1, H-6β, H-7β
14	20.9	1.06	3H	s	3, 4, 5, 15		H-6α, H-6β, H-13
15	23.4	1.13	3H	s	3, 4, 5, 14		H-5, H-6α, H-6β
1'	68.1	4.23	2H	brs	2', 7', 8'		
2'	56.0						
3'	56.05						
4'	209.7						
5'	64.2						
6'	196.5						
7'	46.5	3.68	1H	s	2', 8'		H-7α, H-12β
8'	167.3						
9'	15.9	1.02	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-11α
10'	11.7	1.16	3H	s	12, 4', 5', 6'		H-12α, H-12β

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

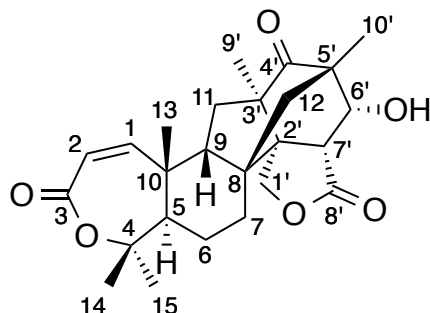
Table 4-9. NMR data for andilesin D (**33**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	150.7	6.00	1H	d (<i>J</i> = 12.5 Hz)	3, 5, 9, 13	H-2	H-2, H-9, H-13
2	120.2	5.81	1H	d (<i>J</i> = 12.5 Hz)		H-1	H-1
3	166.2						
4	83.9						
5	42.9	1.88	1H	m	4	H-6α, H-6β	H-6α, H-15
6	23.4	2.06 (α)	1H	m		H-5, H-7α, H-7β	H-5, H-15, H-1'β
		1.71 (β)	1H	m		H-5, H-7α, H-7β	
7	25.7	2.41 (α)	1H	dd (<i>J</i> = 15.3, 10.8 Hz)	9	H-6α, H-6β	H-1'β
		1.95 (β)	1H	m	9, 12	H-6α, H-6β	H-12β, H-13
8	45.9						
9	57.1	1.80	1H	m	5, 12, 13	H-11α, H-11β	H-13
10	44.8						
11	39.2	1.75 (α)	1H	m	9	H-9	H-9'
		1.60 (β)	1H	m		H-9	
12	51.5	1.61 (α)	1H	d (<i>J</i> = 13.6 Hz)	4', 6', 10'		
		2.21 (β)	1H	d (<i>J</i> = 13.6 Hz)	8, 9, 2', 4', 5', 6'		H-7β, H-7', H-10'
13	23.8	1.42	3H	s	1, 5, 9, 10		H-1, H-7β, H-9
14	23.0	1.46	3H	s	4, 5, 15		
15	30.0	1.34	3H	s	4, 5, 14		H-5, H-6α
1'	68.7	4.76 (α)	1H	d (<i>J</i> = 9.6 Hz)	7', 8'		H-9'
		4.48 (β)	1H	d (<i>J</i> = 9.6 Hz)			H-6α, H-7α
2'	57.0						
3'	57.0						
4'	211.2						
5'	65.2						
6'	197.8						
7'	47.7	4.13	1H	s	6', 8'		H-12β
8'	168.1						
9'	16.4	1.01	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-11α, H-1'α
10'	12.2	1.05	3H	s	12, 4', 5', 6'		H-12β

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in acetone-*d*₆)

Table 4-10. NMR data for andilesin A (**22**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	149.6	5.77	1H	d (<i>J</i> = 12.5 Hz)	2, 3, 10, 13	H-2	H-2, H-9, H-13
2	119.5	5.89	1H	d (<i>J</i> = 12.5 Hz)	1, 3, 10	H-1	H-1
3	166.4						
4	83.5						
5	42.2	1.66	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 6.2 Hz)	4, 9, 10, 13	H-6α, H-6β	H-6α, H-11α, H-15, H-1'α, H-1'β
6	22.8	1.87 (α) 1.76 (β)	1H 1H	m m	7	H-5, H-7α, H-7β H-5, H-7α, H-7β	H-5, H-15, H-1'β
7	25.0	1.93 (α) 1.76 (β)	1H 1H	dd (<i>J</i> = 14.2, 9.6 Hz) m	5, 6, 8, 9	H-6α, H-6β H-6α, H-6β	H-7' H-12β, H-13
8	45.5						
9	55.9	1.50	1H	dd (<i>J</i> = 10.8, 2.8 Hz)		H-11α, H-11β	H-13
10	43.8						
11	39.4	1.15 (α) 1.75 (β)	1H 1H	t (<i>J</i> = 13.6 Hz) dd (<i>J</i> = 13.6, 7.9 Hz)		H-9 H-9	H-5
12	50.7	1.13 (α) 1.49 (β)	1H 1H	d (<i>J</i> = 14.2 Hz) d (<i>J</i> = 14.2 Hz)	8, 10, 2', 4' 6'		H-10' H-7β, H-7', H-10'
13	23.5	1.30	3H	s	1, 5, 9, 10		H-9, H-14
14	24.4	1.45	3H	s	4, 5, 15		H-13
15	30.2	1.35	3H	s	4, 5, 14		H-5, H-6α
1'	69.2	4.23 (α) 4.12 (β)	1H 1H	d (<i>J</i> = 9.6 Hz) d (<i>J</i> = 9.6 Hz)	7', 8' 8, 8'		H-5, H-9' H-5, H-6α, H-7'
2'	56.7						
3'	55.2						
4'	215.1						
5'	49.1						
6'	71.9	4.07	1H	d (<i>J</i> = 7.4 Hz)	2', 4', 5', 10'	H-7'	H-12β, H-7', H-10'
7'	41.0	2.93	1H	d (<i>J</i> = 6.8 Hz)	6', 8'	H-6'	H-7α, H-12β, H-1'β, H-6'
8'	174.6						
9'	16.0	1.14	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-1'α
10'	16.8	1.13	3H	s	12, 4', 5', 6'		H-12α, H-12β, H-6'
OH		3.24	1H	s	5', 6'		

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

4-5. AndAの*in vitro*アッセイ

A. oryzae を用いた *in vivo* の試験の結果、ジオキシゲナーゼ AndA が二段階の反応ならびに特異な架橋構造の形成を担うものと考えられた。本酵素が一連の反応を単独で触媒するか否かを明らかにするとともに、より詳細な酵素機能の解明を目指して、精製酵素を用いた *in vitro* の試験を実施することとした。AndA を大腸菌にて His タグ融合型のタンパク質として大量発現後、Ni-NTA アフィニティーカラムにて精製し、さらに濃縮したのちに酵素反応に供した。

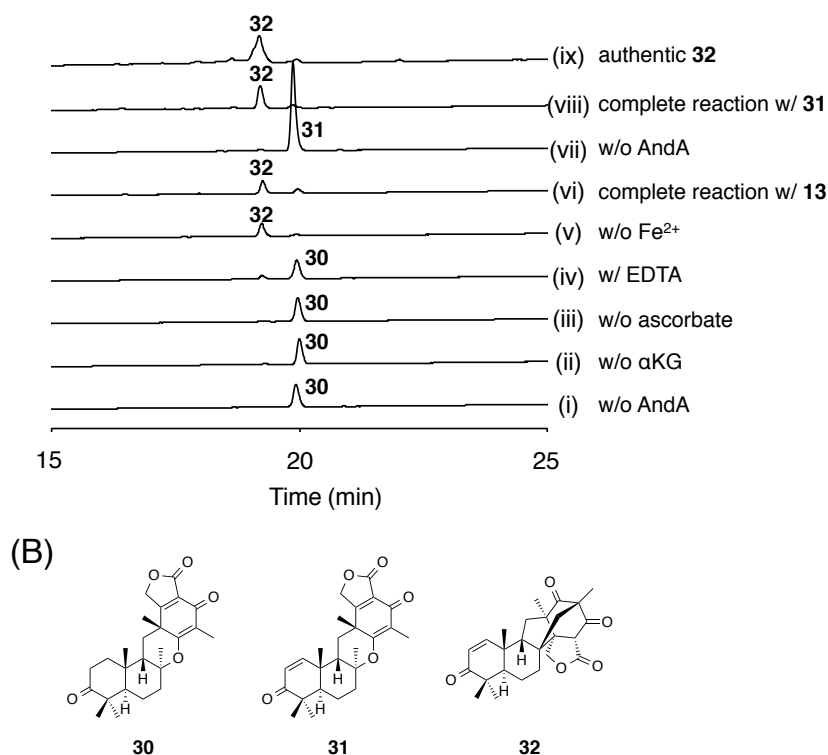


Figure 4-10. HPLC profiles of the products of *in vitro* enzymatic reactions of AndA with (i–vi) **30** or (vii, viii) **31**: (i) without AndA; (ii) without α -KG; (iii) without ascorbate; (iv) with EDTA; (v) without exogenous Fe(II); (vi) complete reaction with **30**; (vii) without AndA; (viii) complete reaction with **31**; (ix) authentic standard of **32**. The chromatograms were monitored at 210 nm.

AndA は、第 3 章で述べた AusE と同じく、PhyH 様のジオキシゲナーゼであると考えられた。そこで酵素反応は、 FeSO_4 、 α -KG、preandiloid B (**30**)、さらに鉄の酸化数を調節する目的でアスコルビン酸を加えた条件下にて実施することとした。その結果、**30** はほぼ全て消費され、生成物として **32** が得られることが判明した (Figure 4-10、レーン vi)。さらに、AndA は **31** も基質として受容し、**32** を与えることが明らかとなった (Figure 4-10、レーン viii)。このことから、AndA は単独で、**30** の脱水素化のみならず、非常に奇異な転位反応を引き起こ

し **32** のビシクロ[2.2.2]オクタン骨格を形成することが確認された。本酵素反応は、AusE の場合と同様に FeSO_4 非添加の条件下でも進行したが、1 mM EDTA の存在下あるいは α -KG 非添加の条件においては進行しなかった (Figure 4-10、レーン ii、iv および v)。興味深いことに、本反応はアスコルビン酸非添加の条件においても、ほとんど進行しないことが明らかとなった (Figure 4-10、レーン iii)。通常、PhyH 様ジオキシゲナーゼの反応にアスコルビン酸の添加は必須ではないが、同様にアスコルビン酸を要求するジオキシゲナーゼとして、verruculogen 生合成に関わる FtmF/FtmOx1 と呼ばれる酵素が知られている^{123, 124}。本酵素は fumitremorgin B を基質として、エンドペルオキシドの構築を担う酵素である。本反応においては、酵素反応により生じた生成物ラジカルならびに酵素活性部位の三価鉄の還元にあスコルビン酸が必要になるとされている (Figure 4-11)。**31** から **32** に至る反応は、酸化酵素によって触媒される反応であるにも関わらず、分子量の変化しない異性化反応であることを考慮すると、FtmF/FtmOx1 の場合と同様に、AndA の反応においても酵素反応の結果、生成物ラジカルが生じ、その還元のためにアスコルビン酸が要求されると考えることができる。

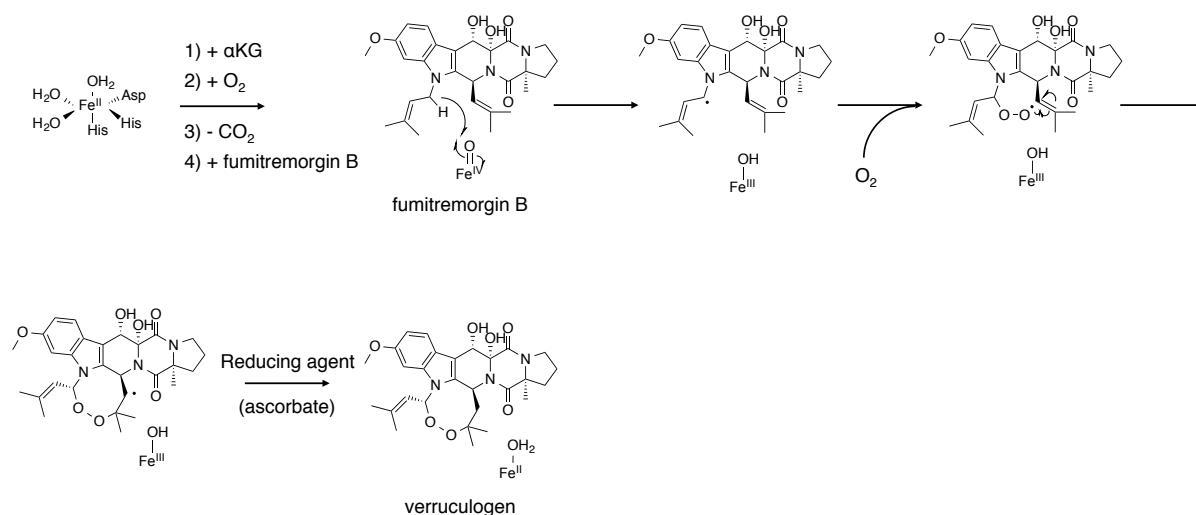


Figure 4-11. Endoperoxide forming reaction catalyzed by FtmF/FtmOx1.

4-6. 生合成後期段階の解明

化合物 **29** を用いた生物変換実験において、アセチル基転移酵素をコードする *andG* を欠いた状態では anditomin (**21**) ではなく andilesin A (**22**) が生成したこと、加えて、*andF* ならびに *andH* の 2 つの遺伝子が **22** の生合成に関与していなかったことを踏まえると、*andG* が **21** の生合成に関与しないとした当初の仮説は誤りであり、実際には生合成において重要な役割を果たしているものと推察された。この新たな仮説が正しいとすれば、AndG は **22** を基質と

するものと考えられる。AndG はアセチル基転移酵素であり、**22** の分子構造中でアセチル化を受けうるのは C-6'位の水酸基のみであることから、AndG はこの位置にアセチル基を付加する酵素であると推定できる。これまでに、このようなアセチル化を受けた andilesin 誘導体は単離されていないこと、また、**22** は andilesin B (**23**) の直接の生合成前駆体と予想されていることを考慮すると、AndG により生じたアセチル化体は非酵素的な脱酢酸反応を経て **23** へと変換されると予想された (Figure 4-12)。

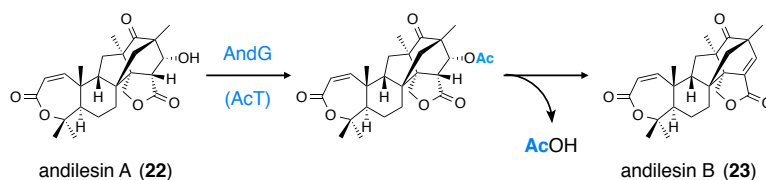


Figure 4-12. Proposed function of AndG.

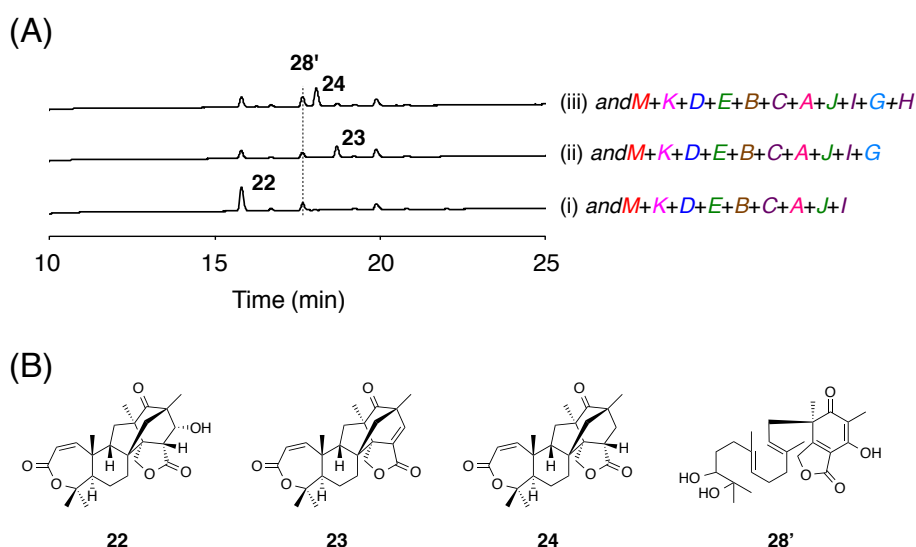


Figure 4-13. Late-stage biosynthesis of anditomin (**21**). (A) HPLC profiles of culture supernatant extracts from transformants harboring (i) *andM+K+D+E+B+C+A+J+I*; (ii) *andM+K+D+E+B+C+A+J+I+G*; (iii) *andM+K+D+E+B+C+A+J+I+G+H*. (B) Structures of compounds **22-24** and **28'**. The chromatograms were monitored at 210 nm.

上記の予想生合成反応を検証すべく、*andG* を **22** の生産能を有する *A. oryzae* 形質転換体に導入し、その代謝物を分析したところ、新たに化合物 **23** が得られた (Figure 4-13、レーン ii)。単離精製後、**23** は andilesin B¹¹² であると同定された (Table 4-11)。より詳細に AndG の触媒する反応に関する知見を得るべく、次いで大腸菌より精製した組み替えタンパク質を用いた

in vitro のアッセイを行った。その結果、AndG ならびに acetyl-CoA の存在下においてのみ反応が進行し、**23** を与えることが判明した (Figure 4-14)。さらに、**22** をピリジンと無水酢酸にてアセチル化したところ、やはり **23** が生じた (Figure 4-15)。以上より、AndG の生成物は acetylandilesin A であり、本化合物は自発的に、また効率的に脱酢酸を経て **23** へと変換されることができる。

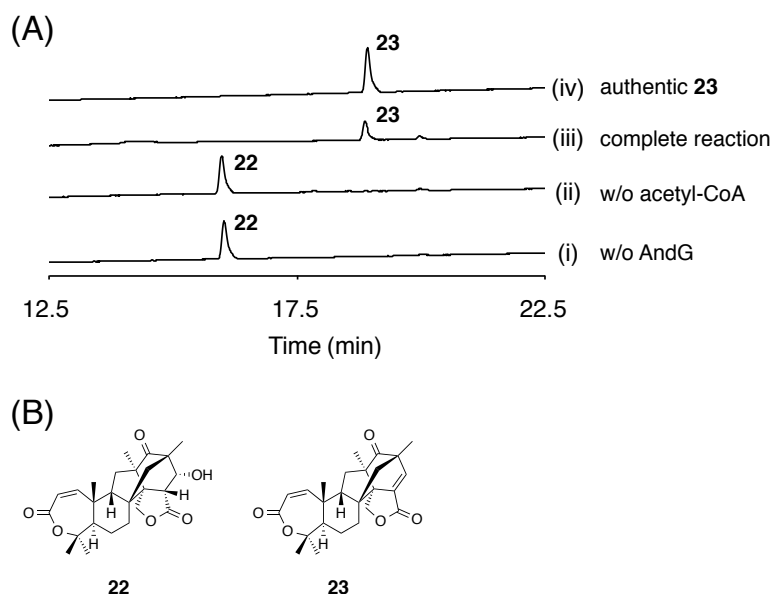


Figure 4-14. (A) HPLC profiles of the products of *in vitro* enzymatic reactions of AndG: (i) without AndG; (ii) without acetyl coenzyme A; (iii) complete reaction; (iv) authentic standard of **23**. (B) Structures of compounds **22** and **23**. The chromatograms were monitored at 210 nm.

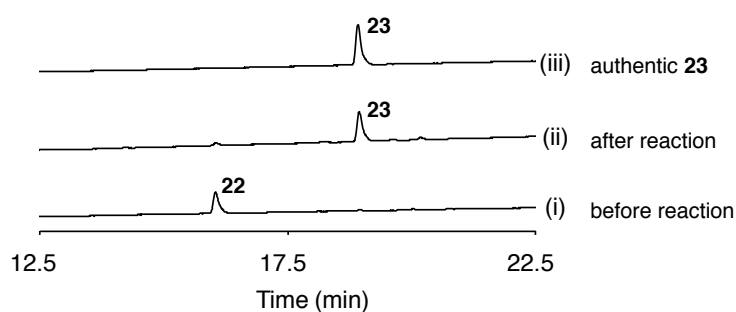
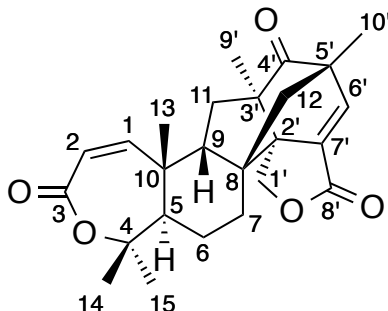


Figure 4-15. HPLC profiles of the products of acetylation of **22** with acetic anhydride and pyridine: (i) before the reaction; (ii) after the reaction; (iii) authentic standard of **23**. The chromatograms were monitored at 210 nm.

Table 4-11. NMR data for andilesin B (**23**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	149.5	5.79	1H	d (<i>J</i> = 13.0 Hz)	2, 3, 5, 9, 13	H-2	H-2, H-9, H-13
2	119.8	5.92	1H	d (<i>J</i> = 12.5 Hz)	1, 3, 10	H-1	H-1
3	166.3						
4	83.6						
5	42.7	1.73	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 6.2 Hz)	4, 10, 14	H-6α, H-6β	H-11α, H-15
6	23.1	2.00 (α)	1H	ddt (<i>J</i> = 14.2, 10.8, 6.8 Hz)	7, 10	H-5, H-7α, H-7β	H-15, H-1'β
		1.54 (β)	1H	m		H-5, H-7α, H-7β	H-9, H-14
7	28.3	1.72 (α)	1H	m	6, 8, 12, 2'	H-6α, H-6β	H-1'β
		1.83 (β)	1H	ddd (<i>J</i> = 16.4, 11.3, 6.8 Hz)	6, 8, 12, 2'	H-6α, H-6β	H-13
8	47.3						
9	57.7	1.62	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 8.0 Hz)	5, 11, 13, 3'	H-11α, H-11β	H-1, H-13
10	43.8						
11	37.0	1.04 (α)	1H	dd (<i>J</i> = 15.3, 13.0 Hz)	8, 9, 10, 2', 4', 9'	H-9	H-5, H-9', H-1'α
		1.63 (β)	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 8.0 Hz)	8, 10, 2', 4'	H-9	
12	57.6	1.55 (α)	1H	d (<i>J</i> = 11.9 Hz)	8, 9, 2', 5', 6', 10'		
		1.45 (β)	1H	d (<i>J</i> = 11.9 Hz)	7, 8, 9, 4', 5', 6'		H-6', H-10'
13	23.7	1.33	3H	s	1, 5, 9, 10		H-1, H-7β, H-9
14	22.5	1.47	3H	s	4, 5, 15		H-6β
15	30.3	1.39	3H	s	4, 5, 14		H-6α
1'	68.7	4.44 (α)	1H	d (<i>J</i> = 10.8 Hz)	8, 2', 3', 7', 8'		H-11α, H-9'
		4.48 (β)	1H	d (<i>J</i> = 10.8 Hz)	8, 2', 3', 8'		H-6α, H-7α
2'	60.1						
3'	53.3						
4'	213.8						
5'	51.5						
6'	143.5	7.13	1H	s	2', 5', 8, 10'		H-12β, H-10'
7'	133.5						
8'	166.8						
9'	16.5	0.96	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-1'α, H-11α
10'	17.0	1.32	3H	s	12, 4', 5', 6'		H-12β, H-6'

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

AndG により生じた **23** が最終産物である anditomin (**21**) へと変換される過程に、機能未知の 2 つの酵素 AndF および AndH が関わりとすれば、まず **23** が SDR である AndH により還元されて andilesin C (**24**) となったのち、ジオキシゲナーゼ AndF による酸化的転位反応によって **21** が生合成されると推測できる。本経路を証明すべく、*andH* を含む 11 遺伝子発現系を構築したところ、期待通りに新規生成物 **24** が得られ (Figure 4-13、レーン iii)、単離精製後、本化合物は andilesin C¹¹² であると同定された (Table 4-12)。しかしながら、ここに *andF* を加えた 12 遺伝子発現系は何らかの理由により構築できず、*in vivo* の系で AndF の機能解析はできなかった。そこで AndF の機能は、精製酵素を用いた *in vitro* の試験により証明することとした。AndF は AndA や AusE と同じく PhyH 様のジオキシゲナーゼであることから、AndA の場合と同様の条件で酵素反応を実施した。その結果、AndF によって **24** が **21** へと変換されることが判明し (Figure 4-16、レーン vi および vii)、AndF が anditomin 生合成の最終段階を担う酵素であることが明らかとなった。なお、**21** については *E. varicolor* の培養液から単離精製したものを標品として用いた (Table 4-13)。また AndF は、二価鉄、EDTA、 α -KG、アスコルビン酸に対して AndA と同様の依存性を示した (Figure 4-16、レーン i から iv)。

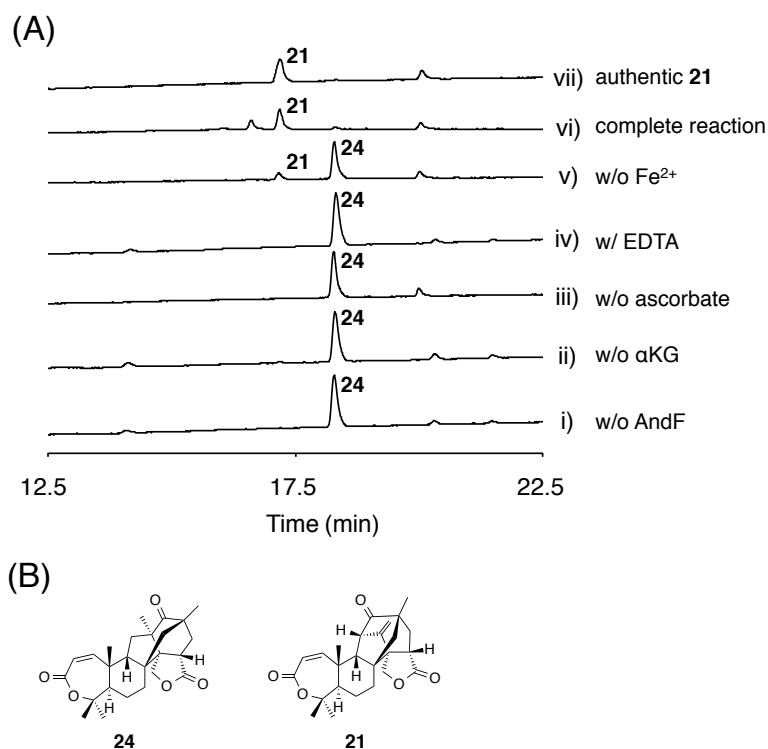
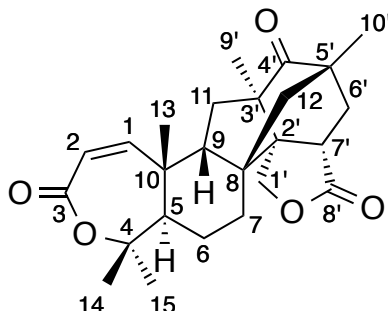


Figure 4-16. (A) HPLC profiles of the products of *in vitro* enzymatic reactions of AndF: (i) without AndF; (ii) without α -KG; (iii) without ascorbate; (iv) with EDTA; (v) without exogenous Fe(II); (vi) complete reaction; (vii) authentic standard of **21**. (B) Structures of compounds **24** and **21**. The chromatograms were monitored at 210 nm.

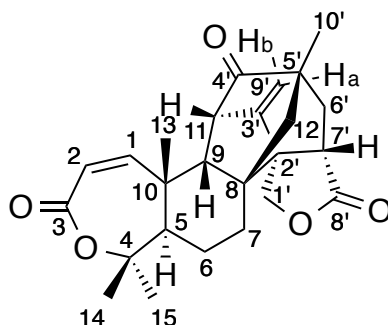
Table 4-12. NMR data for andilesin C (**24**)



position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	149.7	5.78	1H	d (<i>J</i> = 12.5 Hz)	2, 3, 5, 9, 13	H-2	H-2, H-9, H-11β, H-13
2	119.5	5.91	1H	d (<i>J</i> = 13.0 Hz)	1, 3, 10	H-1	H-1
3	166.4						
4	83.6						
5	42.2	1.67	1H	dd (<i>J</i> = 13.6, 6.2 Hz)	4, 10, 13	H-6α, H-6β	H-6α, H-15, H-1'α, H-1'β
6	22.8	1.86 (α)	1H	m	7	H-5, H-7α, H-7β	H-5, H-15, H-1'β
		1.54 (β)	1H	m	4, 5, 7	H-5, H-7α, H-7β	H-13
7	24.7	2.01 (α)	1H	m	5, 6, 8, 9	H-6α, H-6β	H-1'β, H-7'
		1.79 (β)	1H	m	5, 9	H-6α, H-6β	H-13
8	45.3						
9	56.5	1.47	1H	dd (<i>J</i> = 10.2, 8.5 Hz)	8, 11, 12, 13	H-11α, H-11β	H-1, H-11β, H-12α, H-13
10	43.8						
11	38.7	1.16 (α)	1H	dd (<i>J</i> = 12.5, 10.8 Hz)	10, 3', 4', 9'	H-9	H-1'α
		1.70 (β)	1H	dd (<i>J</i> = 12.5, 7.9 Hz)	8, 9, 2', 4'	H-9	H-1
12	52.7	1.21 (α)	1H	dd (<i>J</i> = 13.0, 2.3 Hz)	8, 9, 2', 5', 6', 10'	H-6'α	H-9, H-10'
		1.61 (β)	1H	d (<i>J</i> = 13.0 Hz)	7, 8, 9, 2', 4', 5', 6'		H-6'β, H-7', H-10'
13	23.5	1.31	3H	s	1, 5, 9, 10		H-1, H-6β, H-7β, H-9
14	22.5	1.46	3H	s	4, 5, 15		
15	30.2	1.37	3H	s	4, 5, 14		H-5, H-6α
1'	69.3	4.23 (α)	1H	d (<i>J</i> = 9.6 Hz)	3', 7', 8'		H-5, H-11α, H-9'
		4.13 (β)	1H	d (<i>J</i> = 9.6 Hz)	8, 3'		H-5, H-6α, H-7α, H-7'
2'	56.8						
3'	55.0						
4'	216.8						
5'	43.1						
6'	32.2	1.77 (α)	1H	ddd (<i>J</i> = 14.1, 9.1, 2.3 Hz)	12, 4', 7', 8'	H-12α, H-7'	H-9', H-10'
		1.93 (β)	1H	dd (<i>J</i> = 14.1, 10.8 Hz)	12, 2', 4', 5', 7', 10'	H-7'	H-12β, H-7', H-10'
7'	35.5	2.83	1H	dd (<i>J</i> = 10.8, 9.1 Hz)	8, 4', 6', 8'	H-6'α, H-6'β	H-7α, H-12β, H-1'β, H-6'β
8'	176.4						
9'	16.8	1.10	3H	s	11, 2', 3', 4'		H-1'α, H-6'α
10'	19.5	1.02	3H	s	12, 4', 5', 6'		H-12α, H-12β, H-6'α, H-6'β

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

Table 4-13. NMR data for anditomin (**21**)

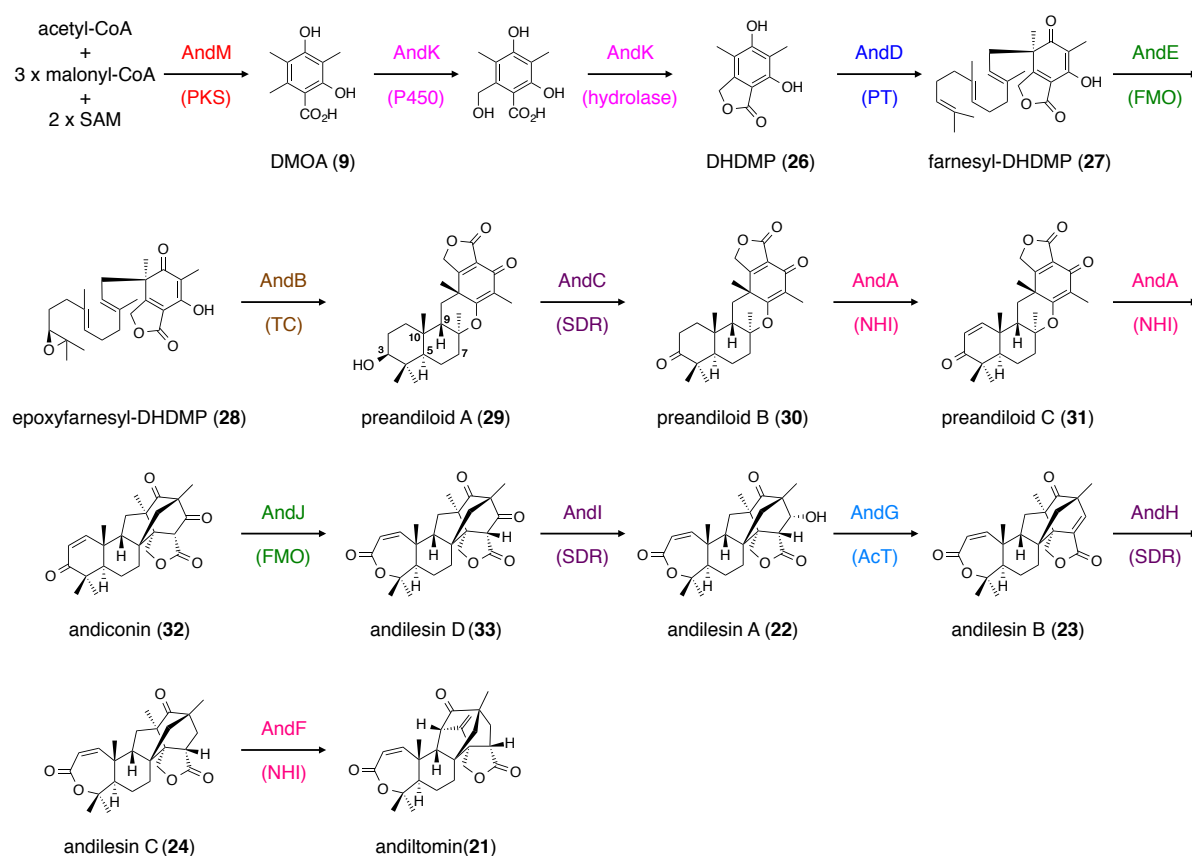


position	¹³ C		¹ H				
	δ (ppm)	δ (ppm)	intensity	multiplicity	HMBC correlation	COSY correlation	NOESY correlation
1	147.5	5.87	1H	d (<i>J</i> = 13.0 Hz)	2, 3, 5	H-2	H-2, H-9, H-11, H-13
2	120.1	5.99	1H	d (<i>J</i> = 13.0 Hz)	1, 10	H-1	H-1
3	166.0						
4	83.6						
5	44.5	2.13	1H	dd (<i>J</i> = 13.6, 6.2 Hz)	4, 6, 10, 13, 14	H-6α, H-6β	H-6α, H-15, H-1'α
6	21.0	1.74 (α)	1H	m		H-5, H-7α, H-7β	H-5, H-15
		1.54 (β)	1H	m		H-5, H-7α, H-7β	H-13
7	25.8	2.01 (α)	1H	brd (<i>J</i> = 15.3 Hz)	6, 8, 2'	H-6α, H-6β	H-1'β
		1.84 (β)	1H	ddd (<i>J</i> = 15.3, 10.7, 7.9 Hz)	6, 2'	H-6α, H-6β	H-13
8	47.8						
9	61.5	1.60	1H	brs	1, 5, 12, 13, 2', 4'	H-11	H-1, H-11, H-12α, H-13
10	42.6						
11	64.1	3.39	1H	brs	8, 10, 2', 3', 4', 9'	H-9	H-1, H-9, H-13, H-9'b
12	49.9	1.39 (α)	1H	d (<i>J</i> = 13.0 Hz)	7, 8, 9, 2', 6'		H-9, H-10'
		2.00 (β)	1H	d (<i>J</i> = 13.0 Hz)	7, 8, 9, 5', 6'		H-1'β, H-7', H-10'
13	26.0	1.29	3H	s	1, 5, 9, 10		H-1, H-6β, H-7β, H-9, H-11, H-14
14	23.2	1.46	3H	s	4, 5, 15		H-13
15	30.7	1.37	3H	s	4, 5, 14		H-5, H-6α, H-1'α
1'	75.6	4.55 (α)	1H	d (<i>J</i> = 8.5 Hz)	2', 3', 7', 8'		H-5, H-15, H-9'a
		4.48 (β)	1H	d (<i>J</i> = 8.5 Hz)	3'		H-7α, H-7'
2'	54.1						
3'	147.9						
4'	208.0						
5'	44.5						
6'	30.4	1.71	2H	m	12, 2', 4', 7', 10'	H-7'	
7'	43.2	3.02	1H	dd (<i>J</i> = 10.8, 9.1 Hz)	8, 2', 3', 6', 8'	H-6'	H-12β, H-1'β
8'	173.9						
9'	111.6	5.16 (a)	1H	brs	11, 2'		H-1'α
		5.14 (b)	1H	brs	11, 2'		H-11
10'	23.7	1.13	3H	s	12, 4', 5', 6'		H-12α, H-12β

¹H NMR: 500 MHz, ¹³C NMR: 125 MHz (in CDCl₃)

4-7. 考察

第4章においては、anditomin 生合成遺伝子クラスターを同定するとともに、その全生合成経路を *in vivo* または *in vitro* での生合成再構成により明らかにした (Scheme 4-1)。これまでに報告されてきた terretonin、austinol、andrasitin A などの DMOA 由来メロテルペノイドの生合成においては、DMOA (9) はプレニル基転移酵素によって直接ファルネシル化を受けるのに対して⁵⁶、anditomin 生合成においては P450 と加水分解酵素のキメラ酵素である AndK が 9 をフタリド誘導体へと変換し 26 を与えた後にファルネシル化される点で興味深い。DMOA 由来メロテルペノイドは糸状菌由来メロテルペノイドの中でも、とりわけ構造多様性に富む化合物群であることから²⁹、AndK の同定ならびに機能解明は、糸状菌が生合成経路を多様化させてきたプロセスを理解する上で重要な発見であると言える。



Scheme 4-1. Complete biosynthetic pathway of anditomin (21).

AndB によって触媒されるテルペン環化反応もまた、本生合成経路における特徴的な反応の一つである。本酵素が当初の予想に反し、五環性の分子骨格を有する preandiloid A (29) を生成物として与えたことから、旧来提唱されてきた Diels-Alder 反応の生合成への関与が否定された。興味深いことに、AndB のアミノ酸配列をクエリーに BLAST 検索を実施したところ、

本酵素はインドールジテルペン aflatrem の生合成に関与する AtmB¹²⁵ と最も高い同一性 (47%) を示すことが明らかとなった (Figure 4-17)。一方で、既知の DMOA 由来メロテルペノイド生合成に関わるテルペン環化酵素 Trt1⁵⁶、AusL⁵⁵、AdrI との配列同一性は約 30% であり、比較的低いことが判明した。

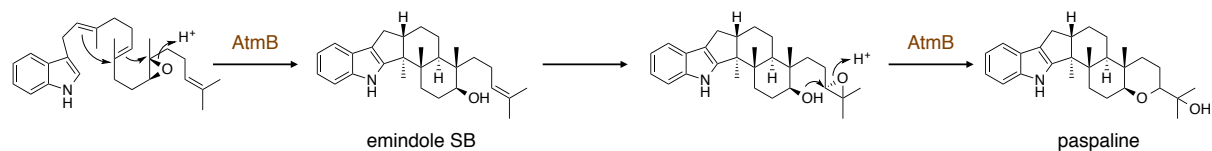


Figure 4-17. Predicted reactions catalyzed by AtmB.

ここで、化合物 **29** のテルペノイド部位の絶対立体配置について andilesin A の絶対構造を基にして考えると、3*S*, 5*R*, 8*S*, 9*S*, 10*S* であると演繹的に決定できる (Scheme 4-1)。しかしながら、terretonin、austinol、andrastin A 生合成における環化中間体の立体配置は 3*R*, 5*S*, 8*S*, 9*S*, 10*R* であることから⁵⁶、AndB による環化産物の立体配置とは異なっている。このような立体配置の違いを生み出す要因としては二点挙げられる (Figure 4-18)。第一に、基質のエポキシドの立体化学の違いが考えられる。AndB の基質と考えられる epoxyfarnesyl-DHDMP (**8**) は単離されておらず、その立体化学を示す直接的な根拠は得られていないが、環化産物の立体化学を踏まえると **8** は (*S*)-epoxide を有すると推定される。他方、Trt1、AusL、AdrI の共通の基質と考えられる epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester のエポキシドは *R* 配置であると予想される⁵⁶。したがって、それぞれの経路において、異なる立体選択性でエポキシドを導入する酵素が関与することで閉環産物の立体化学に影響を及ぼすものと推定される。第二に、AndB による環化反応においては、epoxyfarnesyl 基が chair-boat のコンフォメーションに折り畳まれて反応が進行する一方で、他の酵素による反応では chair-chair のコンフォメーションを経て閉環するものと推定される。これらの相違点を踏まえると、AndB が他の Trt1、AusL、AdrI といったテルペン環化酵素と高い配列同一性を示さないことも説明できよう。なお、**29** と類似した炭素骨格を有する tropolactone D⁴² のテルペノイド部位は、**29** と同じく 5*R*, 8*S*, 9*S*, 10*S* であると決定されているが、C-3' 位 (tropolactone D における C-12 位) のメチル基の立体化学のみ反転している。この位置はプレニル基転移酵素によりファルネシル基が付加するところであることから、tropolactone D 生合成においては AndD とは異なる立体選択性を有するプレニル基転移酵素ならびに AndB と類似したテルペン環化酵素が関与するものと推察される (Figure 4-19)。

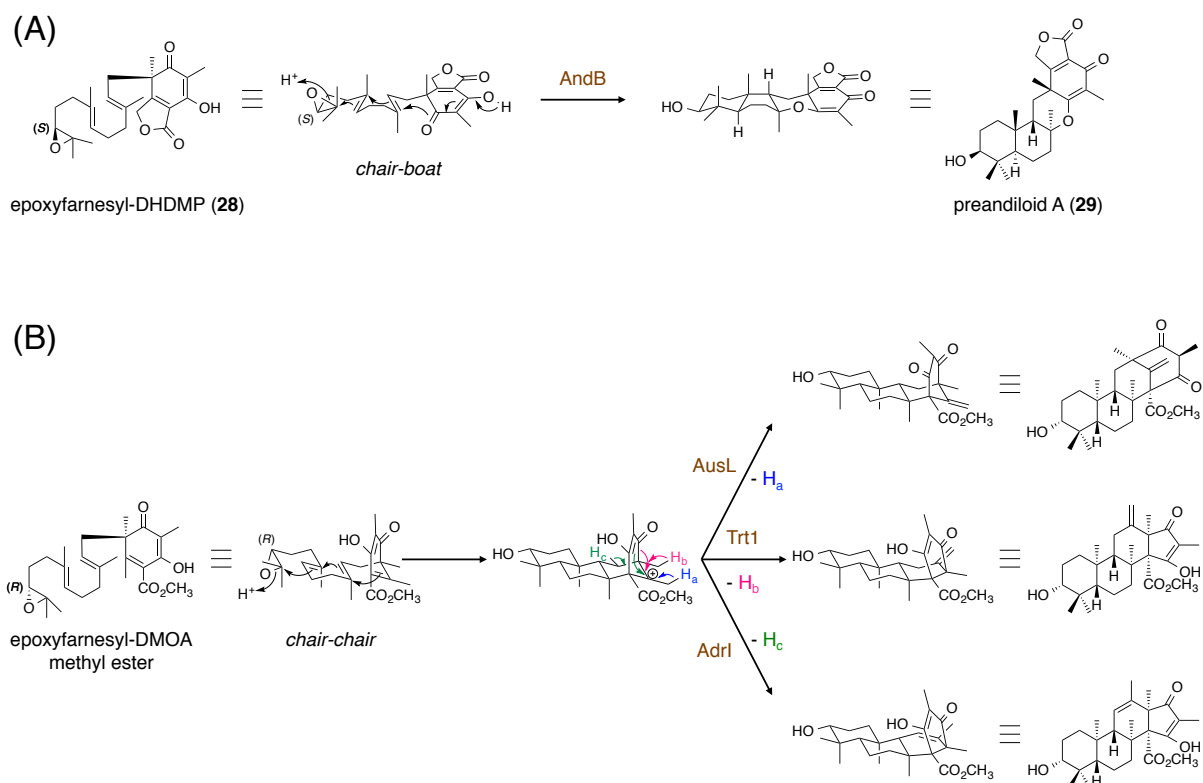


Figure 4-18. Comparison of the reaction catalyzed by (A) AndB with those by (B) other terpene cyclases involved in the DMOA-meroterpenoid pathways.

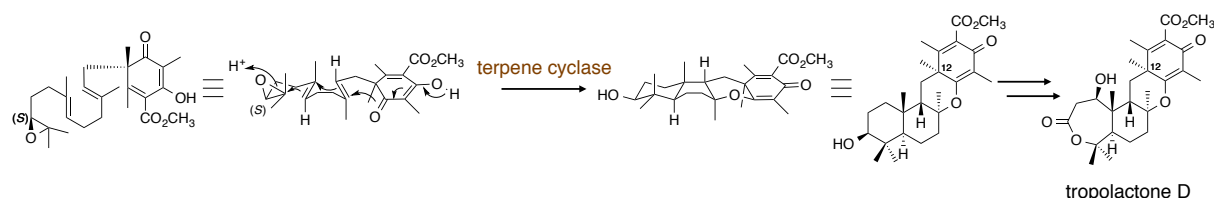
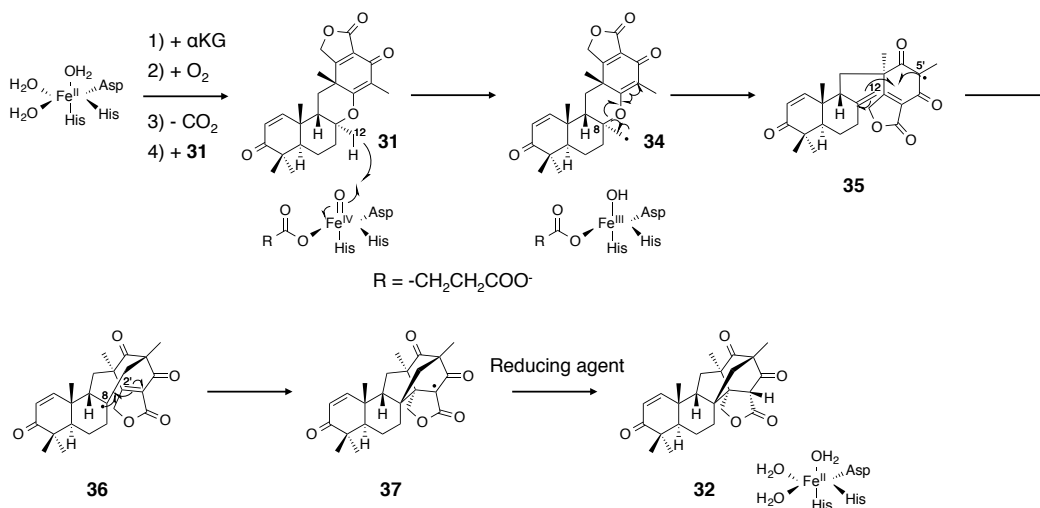


Figure 4-19. Proposed reaction mechanism of the terpene cyclase involved in the biosynthesis of tropolactone D.

Anditomin 生合成における最も興味深い反応は、おそらく多機能型ジオキシゲナーゼ AndA による bicyclo[2.2.2]octane 骨格の構築であろう。AndA も第 3 章で述べた AusE と同様に、鉄原子の結合部位が保存されており (His135、Asp137、His213)、ここに配位した鉄原子が反応の中心的役割を果たすものと考えられる。さらに、AndA と同じくアスコルビン酸要求性のジオキシゲナーゼ FtmF/FtmOx1 の推定反応機構 (Figure 4-11)^{123, 124} を踏まえると、AndA による preandiloid C (31) から andiconin (32) への変換のメカニズムは以下のように推定される (Scheme 4-2)。すなわち、まず α -KG および分子酸素が活性部位に結合した後、 α -KG の酸化

的脱炭酸により活性種である鉄(IV)-オキソ中間体が生成する。この活性種により基質 **31** の 12 位の水素原子が引き抜かれラジカル種 **34** を生じた後、炭素-酸素結合の開裂を経て **35** を与える。ここで、5'位のラジカルは 2 つのカルボニル基と隣接していることから、求電子的ラジカルとして振る舞うと考えられ、これが電子豊富なオレフィンと C-12 位で反応することで **36** を生じる。次いで、C-8 位の求核的ラジカルがカルボニルと共役した電子不足二重結合と C-2'位で結合を形成することで、生成物ラジカル **37** を与える。最終的に、還元剤が **37** および活性部位の Fe(III)を還元することで、反応が終結すると推定される。



Scheme 4-2. Proposed reaction mechanism for the rearrangement catalyzed by AndA.

興味深いことに、*Aspergillus insuetus* より単離された insuetolide 類は andilesin 類と非常に類似した構造を有するが、C-8 位と C-2'位の間に 1 つの酸素原子が挿入されている点のみで異なっている¹²⁶。これらの構造類似性を考慮すると、insuetolide 類は anditomin 生合成と同様の経路を経て合成されるものと予想される。ただし、anditomin 生合成と同じく **32** が生成した後に酸素原子が挿入されるとは考えにくいことから、insuetolide 類の特徴的な構造は AndA による反応と類似のプロセスを経て合成されるものと推定した。予想反応中間体 **36** が生じた後に、炭素-炭素結合形成の代わりに、ヒドロキシルラジカルが結合することで酵素反応が終結すれば、C-8 位に水酸基を有する化合物が得られる。本化合物の C-2'位は求電子的であることから、C-8 位の水酸基が C-2'位を求核攻撃することで、insuetolide 類に共通の架橋構造を与えるものと予想できる (Figure 4-20)。この推定反応機構は、AndA による反応の中間体として **36** が存在していることや Scheme 4-2 に示した反応機構全体が正しいことを支持するものである。

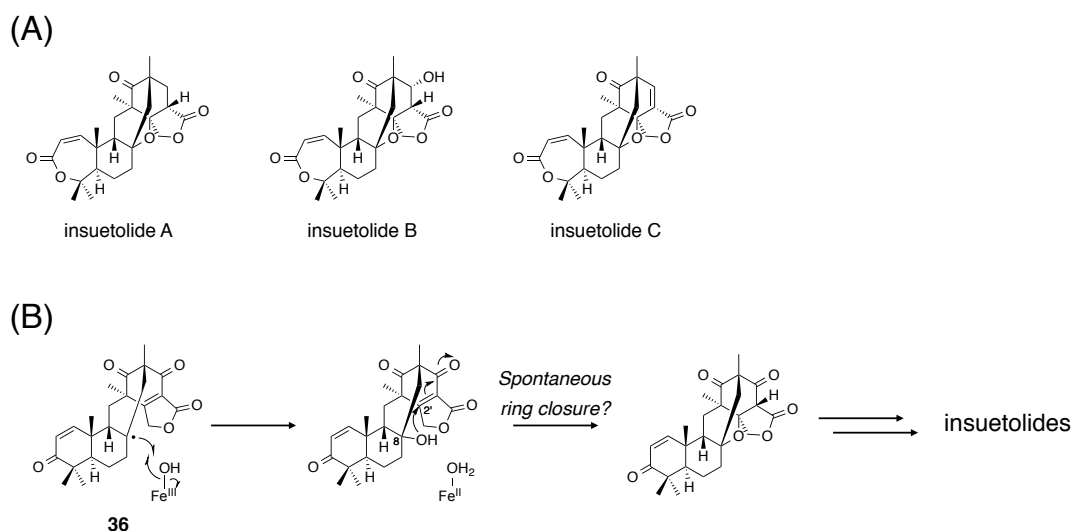


Figure 4-20. (A) Chemical structures of insuetolides and (B) plausible reaction mechanisms for the formation of insuetolides scaffold.

AndA の発見により、当初予想された Diels-Alder 反応は実際には生合成に関与しないことが明らかとなったが、興味深いことに、合成化学的に Diels-Alder 反応を用いて andilesin 類の有する bicyclo[2.2.2]octane 骨格を構築する試みはすでになされている¹²⁷。ここでは、当初予想された生合成中間体のアナログを Diels-Alder 反応に供することで、実際に架橋構造が形成されることが明らかになっている (Figure 4-21)。しかしながら、本反応は高温 (>80 °C) ならびに長時間 (5 日間) を要する上に、望まぬ立体異性体をも生成する。一方で、AndA によるラジカル反応は、より速く、また温和な条件下で、正確な立体選択性を以て進行する点で興味深い。したがって、AndA が如何に本反応を正確に触媒するかについて、今後のさらなる解明が待たれるが、AndA はあくまで C-12 位にラジカルを生じさせることのみを担っており、その後の骨格再構築は、特異な分子構造に起因して自発的に進行する反応であるのかもしれない。

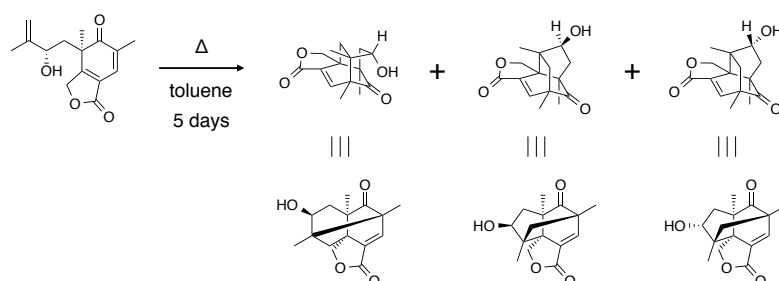


Figure 4-21. Biomimetic synthesis of bicyclo[2.2.2]octane system by [4+2]-cycloaddition.

Anditomin 生合成の最終段階を担うジオキシゲナーゼ AndF もまた、構造複雑化に大きく寄与する酵素である。AndF は AndA と同じく PhyH 様のジオキシゲナーゼであることから、AndF による反応も水素原子の引き抜きにより開始するものと考えられる。これまでに提唱されてきた反応機構においては²⁹、まず C-11 位にカチオンが生じると予想されていたことを踏まえ、AndF による反応機構を以下のように推定した (Scheme 4-3)。基質 **24** の 11 位の水素原子が引き抜かれラジカルを生じた後、水酸化を受け、2 価鉄に結合した中間体 **38** を与える。さらに、この水酸基の脱離に伴う転位反応、C-9' 位からの脱プロトン化により反応生成物 **21** の骨格を生じるものと予想できる。ただし、本反応機構は外因性の還元剤を要求しないことから、本反応におけるアスコルビン酸の役割は未だ不明である。一つの可能性としては、酵素自身の酸化状態の維持に利用されていることが考えられる。

Scheme 4-3. Proposed reaction mechanism for the transformation catalyzed by AndF.

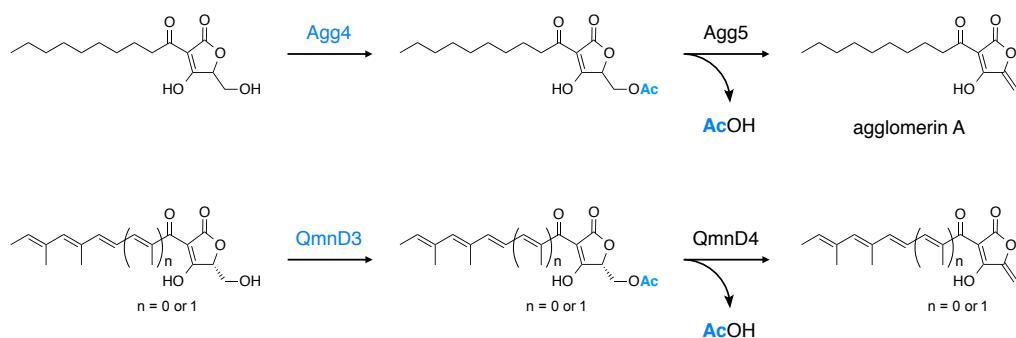


Figure 4-22. Acetyltransferase-mediated dehydration reactions involved in the agglomericin and the quartromycin pathways.

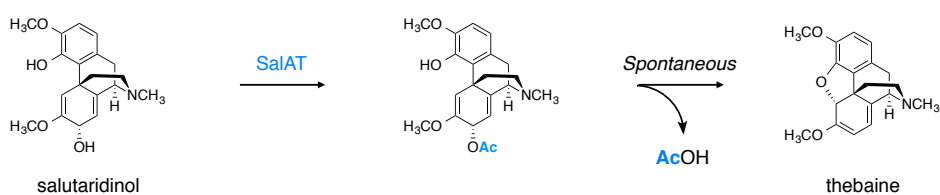


Figure 4-23. Formation of thebaine by SalAT in the biosynthesis of plant isoquinoline alkaloids.

最後に、本研究においては、anditomin の全生合成経路を分子レベルで明らかにすることに成功した。すでに述べてきたように、遺伝子破壊実験は天然物の生合成研究における強力な研究手法であるが、一方で austinol の例に代表されるように、期待される生合成中間体が一切蓄積しないこともあるため⁵⁵、全生合成経路の解明が達成されないことも少なくない。本研究では、第3章とは異なり、遺伝子破壊実験の結果を一切用いることなく、全生合成経路を解明することができた。このことは、*A. oryzae* を用いた異種発現系構築が、糸状菌由来天然物の生合成研究における極めて有効な手法であることを如実に示すものであると考える。

第 5 章 総括

本研究では糸状菌の産生する DMOA 由来メロテルペノイド化合物に着目し、その生合成分子基盤を主に *Aspergillus oryzae* を用いた異種発現系構築により明らかにすることを目指した。その結果として、andrastin A、austinol、anditomin の 3 つの化合物の全生合成経路を解明するとともに、これらの生合成に関与する興味深い酵素の発見やその機能解析に成功した。

第 2 章では、テルペン環化酵素 AdrI の機能解析を行い、本酵素が TrtI や AusL と同様に epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester を基質とする一方で両酵素とは異なる生成物を与えることを見出した。テルペン環化酵素による閉環反応はメロテルペノイド生合成における分岐点のひとつであり、AdrI の発見は生合成経路の多様化を理解する上で重要な発見であると考えられる。これまでに単離されているメロテルペノイドの構造を踏まえると、epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester の閉環産物は preterretonin A (TrtI)、protoaustinoid A (AusL)、andrastin E (AdrI) の 3 つに集約されることが考えられる。したがって、epoxyfarnesyl-DMOA methyl ester を基質とする全ての環化酵素の取得に成功したと言える。加えて、これらの環化中間体はいずれも多様なメロテルペノイドの生合成前駆体であると予想されることから、すでに構築されたこれらの環化産物の異種生産システムは他のメロテルペノイド生合成研究における基盤としても応用可能である。

第 3 章では、austinol 生合成における未解明経路に着目し、3 つの酸化酵素の機能解析を行った。その過程で、ジオキシゲナーゼ AusE が多段階の酸化反応を担うとともに、スピロ環形成をも触媒することを見出した。同様に、第 4 章においても、2 つのジオキシゲナーゼの機能解明に成功し、AndA が非常に特異な骨格変換反応により andilesin 類に特徴的な架橋構造を形成すること、AndF も特徴的な酸化的転位反応により anditomin の分子骨格を与えることが判明した。これらのうち、とりわけ AndA の関与する反応は興味深く、当初予想された Diels-Alder 反応ではなく、全く異なる反応を経て bicyclo[2.2.2]octane 骨格を与えることが明らかとなった。本反応の基質構造や架橋構造形成に至るプロセスは、おそらく誰もが想像し得なかったものであろう。これら 3 つのジオキシゲナーゼは互いに相同であるのみならず、すでによく研究のなされてきた酵素に対しても配列類似性を示す。すなわち、アミノ酸配列や反応開始機構の上では、普遍的な酵素であると言え、その配列情報から反応の特殊性を予測することは困難である。また、実際に酵素自身がどの程度、転位反応に関与しているかも明らかではない。おそらく、特異な構造を有する基質に対して、位置選択的に作用する酵素が存在することで、非常にユニークな反応が生み出されるものと考えている。合成化学の進歩

により、非常に複雑な骨格を有する天然物の全合成も可能になってきているが、一方で、本研究が示すように自然界の合成戦略はいまだに我々人類の想像を凌駕することも少なくはなく、引き続き特異な構造を有する化合物の生合成経路を明らかにしていくことで、さらに興味深い反応が発見されるものと期待される。

本研究で取り上げた 3 つのメロテルペノイド化合物のみならず、当研究室においては最近 terretonin の全生合成経路も明らかにしている¹³²。すなわち、DMOA 由来メロテルペノイドのうち、4 つの化合物の生合成分子基盤がすでに解明されたことになる。しかしながら、本化合物群の構造多様性を踏まえると、これらの生合成に関与する未同定の生合成遺伝子クラスターも多数存在するとともに広く分布しているはずである。最近では、ゲノムシーケンス解析のコストが年々減少していることや、現在「1000 Fungal Genomes Project」と銘打ったプロジェクトが進行中であることと相俟って、続々と新たな糸状菌のゲノム情報が公開されている状況にある。これらすでに公開されたゲノム中に DMOA 由来メロテルペノイドの生合成に関与すると推定される遺伝子クラスターを探索したところ、新たに 5 つの糸状菌種に当該遺伝子クラスターを見出すことができた(2015 年 2 月現在)。これらのうち、*Penicillium roquefortii* FM164、*Penicillium expansum* ATCC 24692、*Penicillium fellutanum* ATCC 48694 の 3 菌株は andrastin A 生合成遺伝子クラスター (*adr* クラスター) と高度に類似したクラスターを有する (Figure 5-1)。*P. roquefortii* 由来のクラスターはとりわけ *adr* クラスターとの類似度が高く、遺伝子の配置が同一であるのみならず、これらの遺伝子産物は互いに 90% 程度の同一性を示している。*P. roquefortii* は andrastin A の生産者であることから¹³³、本クラスターは andrastin A 生合成遺伝子クラスターであると考えられる。*P. expansum* 由来のクラスターも *adr* クラスターと遺伝子の配置の点で類似しているが、興味深いことに推定ペルオキシダーゼ (PO) 遺伝子を 2 つ、推定ガラクトースオキシダーゼ (GO) 遺伝子を 1 つ有しており、andrastin A がさらに酸化を受けた化合物生合成への関与が期待される。このような化合物としては、citreoahybridone 類⁸⁸⁻⁹⁰ や citreoahybridione 類^{91, 93} などが挙げられ (Figure 5-2)、本クラスターはこれらの生合成遺伝子群であるかもしれない。また、*P. fellutanum* 由来のクラスターには、同様に推定ペルオキシダーゼ遺伝子と推定ガラクトースオキシダーゼ遺伝子が 1 つずつ含まれているのに加え、P450 遺伝子が合計 2 つ含まれている。一方で、本クラスターには *adr* クラスターが有する *adrF*、*adrE*、*adrJ* 遺伝子のホモログは見られないことから、本クラスターによって合成される化合物は 3 位の水酸基の立体反転や引き続くアセチル化を受けないものと推察される。この条件を満たす天然物としては atlantinone⁹⁴ が知られており (Figure 5-2)、本クラスターは atlantinone やその類縁体の生合成遺伝子クラスターである可能性が高い。今後、

これらクラスターの機能解析がなされ、DMOA 由来メロテルペノイドの構造多様性が生まれる分子基盤の解明がさらに進むことを期待したい。

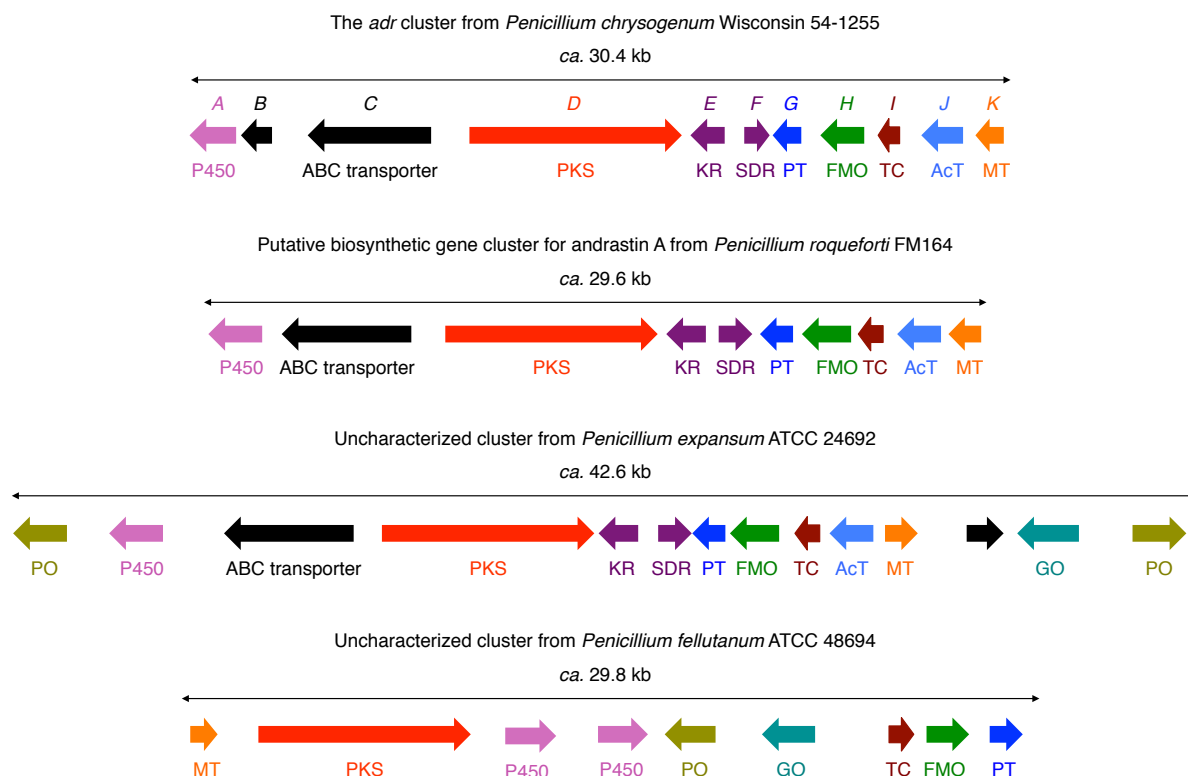


Figure 5-1. Uncharacterized gene clusters similar to the *adr* cluster found in publicly available genome sequences.

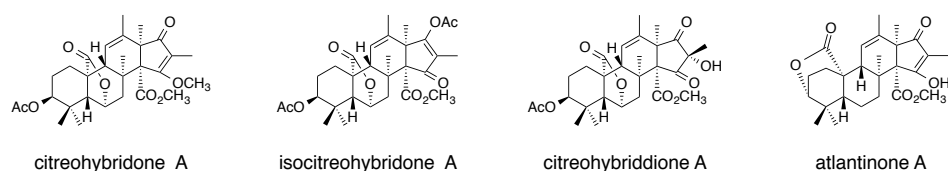


Figure 5-2. Natural products analogous to andrastin A.

上述の 5 つのクラスターのうち、2 つのクラスターは既知のメロテルペノイド生合成遺伝子クラスターとある程度の類似性は示すものの、上記の 3 つのクラスターの場合のように、明確にある既知のクラスターとは類似性を示さない。これらの中で、*Aspergillus novofumigatus* IBT 16806 に由来するクラスターは、本菌株が DMOA に由来する novofumigatonin を生産することから⁴¹、本化合物の生合成遺伝子クラスターであると示唆される (Figure 5-3)。他方で、*Talaromyces aculeatus* ATCC 10409 由来のクラスターに関しては、本菌株からはこれまでに DMOA 由来メロテルペノイドの単離報告がないため、クラスターの産物を予測することは困

難である (Figure 5-4)。本クラスターは AusE と 46%の同一性を示すジオキシゲナーゼをコードしており、ユニークな骨格を有する化合物の生合成への関与が期待される。なお、本研究で用いた異種糸状菌発現系を用いれば、このような機能予測困難な遺伝子の機能解析やそれに由来する代謝物の獲得も容易に行えるものと考えられる。

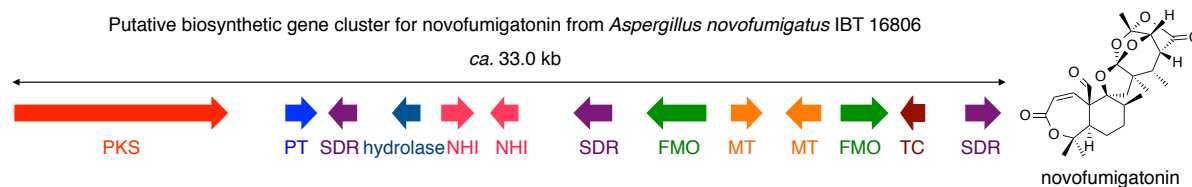


Figure 5-3. Putative biosynthetic gene cluster for novofumigatonin from *Aspergillus novofumigatus* IBT 16806.

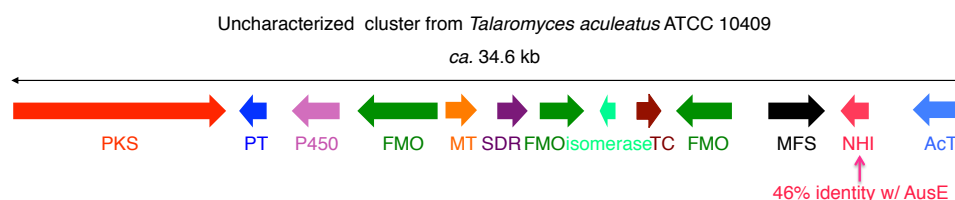


Figure 5-4. Uncharacterized gene cluster from *Talaromyces aculeatus* ATCC 10409.

今後ますます多くの糸状菌のゲノム情報が公開されていくことは疑いの余地がなく、DMOA 由来メロテルペノイド生合成遺伝子クラスターの情報も蓄積していくであろう。これら一連の生合成遺伝子群を人為的に様々な組み合わせで発現させることで、人工的な代謝経路を創出できれば、これまで自然界に存在しなかった化合物の取得も可能になると考えられる。「微生物を培養しその代謝物を分析する」という旧来の方法では新規天然物の取得が困難になっている今日において、新規化合物を効率的に供給する方法の開発は喫緊の課題であり、同一の起源を有する多様な化合物群の生合成を網羅的に明らかにすることは、この課題を克服しうる有効な手段となる。今後ますます多くの DMOA 由来メロテルペノイド生合成の分子基盤が明らかにされるとともに、その生合成遺伝子を巧みに組み合わせることによって創薬シードとなりうる新規化合物の合成が達成されることを期待したい。

実験の部

実験一般（第 2、3、4 章共通）

基本的な実験操作は成書によった。また、キット類は添付のプロトコルに従って使用した。

● 機器類

PCR Thermal Cycler: TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice[®] Gradient (タカラバイオ)

HPLC: Prominence system (島津製作所)

LC-MS/MS: Esquire 4000 (Bruker Daltonics) with 1100 series LC System (Agilent Technologies)

HR-ESI-MS: JMS-T100LP AccuTOF LC-plus (日本電子), microTOF focus-ws (Bruker Daltonics)

NMR: JNM-ECX 500, JNM-ECA 500 (日本電子)

● 有機化学試薬

HPLC ならびに LC-MS/MS 分析用の溶媒は関東化学株式会社より購入した。他の試薬については、特に記載がない限り和光純薬工業株式会社の特級品を使用した。

● 生化学試薬・実験

DNA プライマー：ユーロフィンジェノミクス株式会社より購入した。

制限酵素：タカラバイオ株式会社製のものを使用した。

DNA ポリメラーゼ：iProof[™] High Fidelity DNA Polymerase (Bio-Rad) を使用した。

DNA リガーゼ：DNA Ligation Kit Ver.2.1 (タカラバイオ) を使用した。

In-Fusion 反応：In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Clontech) を使用した。

脱リン酸化酵素：Alkaline Phosphatase (Shrimp) (タカラバイオ) を使用した。

アガロースゲル電気泳動：ゲルの作製には、アガロース KANTO S (関東化学) を使用し、ゲル濃度は 1.2%とした。

DNA 精製：Wizard[®] SV Gel and Clean-Up System (Promega) を使用した。アガロースゲルより抽出する際には ViewBlue[®] Stain KANTO (関東化学) にて染色した。

プラスミド抽出：Wizard[®] Plus Minipreps (Promega) または Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) を使用した。

DNA シーケンシング：ユーロフィンジェノミクス株式会社に依頼した。

SDS-PAGE:ゲル作成に際して、SDS、トリスヒドロキシメチルアミノメタン (Tris)、40% (w/v) アクリルアミド/ビス混合液 (29:1)、グリシンはナカライテスク製のものを、ammonium persulfate (APS) は Bio-Rad 製のものを使用した。濃縮ゲルと分離ゲルの濃度はそれぞれ 4%、10%とした。ゲルの染色には CBB Stain One (ナカライテスク) を使用した。

Ni キレートアガロースレジン: COSMOGEL[®] His-Accept (ナカライテスク) を使用した。

糸状菌細胞壁溶解酵素: Yatalase (タカラバイオ) を使用した。

● 培地・抗生物質

アンピシリン溶液: 25 mg/ml のアンピシリンナトリウム (ナカライテスク) 水溶液を濾過滅菌することで調製した。

カナマイシン溶液: 50 mg/ml のカナマイシン硫酸塩 (和光純薬工業) 水溶液を濾過滅菌することで調製した。

ピリチアミン溶液: 0.1 mg/ml の pyrithiamine hydrobromide (Sigma-Aldrich) 水溶液を濾過滅菌することで調製した。

グルホシネート溶液: Basta (Bayer) より文献既知の方法¹³⁴で抽出後、濾過滅菌することで調製した。

LB 液体培地: LB 培地 (Miller), 造粒タイプ (関東化学) を用いて作製した。

LB 寒天培地: LB-AGAR MILLER (ForMedium) を用いて作製した。

※ LB 培地には必要に応じて、0.1%アンピシリン溶液または 0.1%カナマイシン溶液を添加した。

PDA 培地: ポテトデキストロース寒天培地 (顆粒) (日水製薬) を用いて作製した。

M 寒天培地: 0.2% NH_4Cl , 0.1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.05% KCl , 0.05% NaCl , KH_2PO_4 0.1 g, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% グルコース, 1.5% (または 0.8%) 寒天 (粉末) (関東化学), pH 5.5

CD 寒天培地: 0.3% NaNO_3 , 0.2% KCl , 0.1% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.002% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% グルコース, 1.5% (または 0.8%) 寒天 (粉末) (関東化学), pH 5.5

※ PDA 培地、M 培地および CD 培地には必要に応じて、0.1% arginine, 0.15% methionine, 0.01% adenine, 0.1%ピリチアミン溶液, 5%グルホシネート溶液, 1.2 M sorbitol を添加した。

DPY液体培地: 2% dextrin, 1% hipolypepton (日本製薬), 0.5% yeast extract (BD Biosciences), 0.5% KH_2PO_4 , 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

CD-starch 液体培地：0.3% NaNO₃, 0.2% KCl, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% MgSO₄·7H₂O, 0.002% FeSO₄·7H₂O, 1% hipolypepton, 2% starch (soluble), pH 5.5

麦芽エキス液体培地：3% malt extract (BD Biosciences), 0.5% mycological peptone (Oxoid)

● 本研究で使用した微生物株

Escherichia coli DH5α (Clontech)：遺伝子のクローニングに使用した。

Escherichia coli RosettaTM2(DE3) (Novagen)：酵素タンパク質の大量発現のために使用した。

Escherichia coli BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Agilent Technologies)：酵素タンパク質の大量発現のために使用した。

Aspergillus oryzae NSAR1⁸⁷：東京大学大学院農学生命科学研究科 教授 北本勝ひこ先生よりご恵与いただいた。生合成遺伝子の機能解析に使用した。

Penicillium chrysogenum NBRC 32030：製品評価技術基盤機構 (NITE) より入手した。Andrastin A 生合成遺伝子のクローニングのために使用した。

Aspergillus nidulans FGSC A4：Fungal Genetics Stock Center (FGSC) より入手した。Austinol 生合成遺伝子のクローニングのために使用した。

Emericella variecolor NBRC 32302：NITE より入手した。Anditomin 生合成遺伝子のクローニングならびに anditomin の単離のために使用した。

● 本研究で使用したプラスミドベクター

1. 大腸菌形質転換用ベクター

pET-28a(+) (Novagen)：大腸菌形質転換用ベクター。標的タンパク質の N 末端に His タグを融合した状態で発現させるために使用される。

2. 糸状菌形質転換用ベクター

pTAex3¹³⁵：アルギニンの生合成に関わる *argB* を選択マーカーとして有する。デンプンやマルトースによって誘導可能な α-アミラーゼプロモーター (*PamyB*) ならびにターミネーター (*TamyB*) を有しており、*PamyB* の下流に目的遺伝子を導入する。

pUSA¹³⁶：メチオニンの生合成に関わる *sC* を選択マーカーとして有する。*PamyB* ならびに *TamyB* を有する。

pUNA¹³⁷：硝酸資化に関わる *niaD* を選択マーカーとして有する。*PamyB* ならびに *TamyB* を有する。

pAdeA¹³⁸：アデニンの生合成に関わる *adeA* を選択マーカーとして有する。*PamyB* ならびに

TamyB を有さない。

pPTRI¹³⁹: ピリチアミン耐性遺伝子 *ptrA* を選択マーカーとして有する。*PamyB* ならびに *TamyB* を有さない。

pBARI: グルホシネート耐性遺伝子 *bar* を選択マーカーとして有する。本研究において構築した。*PamyB* ならびに *TamyB* を有さない。

● 形質転換

E. coli の形質転換は井上法¹⁴⁰ によって行った。*A. oryzae* の形質転換はプロトプラスト-PEG 法¹⁴¹ によって行った。

● ゲノム DNA の抽出

糸状菌株を 100 mL の DPY 液体培地で 30 °C、160 rpm にて 3 日間培養後、得られた菌体を液体窒素下、乳棒と乳鉢を用いて破碎した。菌体を 50 ml のコニカルチューブに移し、20 ml の Lysis バッファー (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1.5% SDS) に懸濁したのち、500 μ L の Proteinase K (20 mg/mL) を加え 37 °C、150 rpm で 80 分間インキュベーションした。これに 10 ml のフェノール/クロロホルム溶液を加え、10 分間穏やかに転倒混和後、8,000 rpm で 15 分間遠心した。水相 (約 20 mL) を新しいチューブに移し、2 mL の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 7.5)、および 20 mL のイソプロパノールを加えた。15,000 rpm で 10 分間遠心後上清を捨て、得られた白い沈殿を 3 mL の TE バッファーに溶解させた。15 μ L の RNase (10 mg/ml) を加え、37 °C で 30 分間インキュベーションしたのち、2 mL のフェノール/クロロホルム溶液を加え、ゆっくりと転倒混和後、2,500 rpm で 5 分間遠心した。これを計 3 回繰り返し、得られた水相 (約 2 mL) に 200 μ L の 3 M 酢酸ナトリウム水溶液 (pH 7.5) を加えボルテックスした後、5 mL の冷エタノールを加えよく混ぜた。15,000 rpm で 10 分間遠心後上清を捨て、得られた白い沈殿を 70%エタノールで 2 回洗浄した。乾燥後、300 μ L の TE バッファーに溶解し DNA 溶液とした。

● *A. oryzae* 形質転換体の培養

各形質転換体を DPY 液体培地で 30 °C、160 rpm にて 3 日間培養したのち、 α -アミラーゼプロモーター下流に配した導入遺伝子の発現を誘導するため CD-starch 培地へと植え継いだ。これを 30 °C、160 rpm にて 3~6 日間培養したのち、その代謝物の分析を実施した。

● HPLC による分析

各形質転換体由来の代謝物や酵素反応生成物の分析には、TSKgel ODS-80T_S カラム (4.6 mmI.D.×15 cm) (東ソー) を用いた。溶媒には、0.5% 酢酸水溶液 (A 液) および 0.5% 酢酸を含むアセトニトリル (B 液) を用いた。特に記載がない限り下記の条件で分析を行った。

グラジエント：20/0 – 20/5 – 100/20 – 100/30 – 20/33 (%B/min)

流速：1.0 mL/min

カラム温度：40 °C

● 形質転換体由来代謝物の単離、精製

各形質転換体を 30 °C、160 rpm にて培養し、培養上清と菌体とをブフナー漏斗を用いて分けたのち、菌体をアセトンに一晩浸した。アセトンを濃縮後、残渣に培養上清を加え、これを酢酸エチルで抽出した。有機相を濃縮乾固し、順相のオープンカラムクロマトグラフィー (Wakogel C-200) により分画したのち、さらに HPLC 分取にて精製を行った。HPLC 分取には、TSKgel ODS-80T_M カラム (7.8 mmI.D.×30 cm) (東ソー) を用いた。流速は 3.0 mL/min、カラム温度は 40 °C とした。より詳細な精製条件については、化合物ごとに後述する。

第2章実験項

● *trt4*、*trt2*、*trt5*、*trt8*、*adrI* 共発現系の構築

テルペン環化酵素遺伝子 *adrI* の全長を PCR 法により増幅後、糸状菌発現ベクター pTAex3 のアミラーゼプロモーター下流に組み込み、pTAex3-*adrI* を構築した。次いで、本プラスミドを鋳型に、*adrI* に加えてアミラーゼプロモーター (*PamyB*) およびターミネーター (*TamyB*) を含む領域を PCR にて増幅後、pAdeA ベクターに組み込み pAdeA-*adrI* を得た。本プラスミドならびに構築済みの pUSA-*trt5*⁵⁶ を用いて、以前の研究で作製された *A. oryzae* NSAR1/*trt4*+2+8⁵⁴ を形質転換することで、*adrI* を含む 5 遺伝子発現系を構築した。使用したプライマーの配列、構築したプラスミド、およびその構築方法の概要は Table 1 ならびに Table 2 に列挙した。

● *adrF*、*adrE*、*adrJ*、*adrA* 共発現系の構築

修飾酵素遺伝子群の共発現型を構築するため、*adrF*、*adrE*、*adrJ*、*adrA* をそれぞれ pTAex3、pPTRI、pAdeA、pUSA に導入した。pPTRI ならびに pAdeA はプロモーターおよびターミネーターを有さないため、pPTRI-*adrE* および pAdeA-*adrJ* の作製にあたっては、pAdeA-*adrI* を構築した際と同様に一旦 pTAex3 に導入した後に *PamyB* ならびに *TamyB* を含めた領域を増幅し、各ベクターに導入した。得られた 4 つのプラスミドを用いて *A. oryzae* NSAR1 株を形質転換することで、*adrF*、*adrE*、*adrJ*、*adrA* の 4 遺伝子発現系を得た。一つまたは複数の遺伝子を発現しないネガティブコントロール株の構築にあたっては、対応する空ベクターを用いて形質転換を行った。使用したプライマーの配列、構築したプラスミド、およびその構築方法の概要は Table 1 ならびに Table 2 に列挙した。

● 修飾酵素群の機能解析

上記により構築された修飾酵素発現株については、基質となる andrastin E (30 mg/L) の存在下で培養を行ったのち、HPLC 分析ならびに代謝物の単離精製操作に供した。

● 各代謝物の単離、精製

各形質転換体を 1 L スケールで培養したのち、抽出操作を実行した。順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画し、さらに HPLC 分取

(andrastin A および andrastin B : 50%アセトニトリル水溶液、andrastin C : 70%アセトニトリル水溶液、andrastin D : 55%アセトニトリル水溶液、andrastin E : 65%アセトニトリル水溶液、andrastin F : 60%アセトニトリル水溶液) により精製した。各化合物の培養液 1 L あたりの収量は、andrastin A (1) : 9.35 mg、andrastin B (2) : 3.57 mg、andrastin C (3) : 18.23 mg、andrastin D (4) : 7.32 mg、andrastin E (7) : 40.30 mg、andrastin F (8) : 15.43 mg であった。

Table 1. Primers used in Chapter 2.

Primer	Sequence (5' to 3')
KpnI-adrI-F	CGACCAGGTACCATGGAGAAATCGACTTTG
KpnI-adrI-R	TAGGTATGGTACCTCAAGCTGCCTTTCCTG
KpnI-adrF-F	CTCATTACGGTACCATGTCACTCCTTCAAG
KpnI-adrF-R	AACGAATGGTACCCTAGATCACGGACCAAG
KpnI-adrE-F	TGACCGGTACCATGACGCAGGCTCAGAATC
KpnI-adrE-R	AGTCTTGGTACCTTACTCCCTTGCGATACC
EcoRI-adrJ-F	CATTGATGAATTCATGGGGTTGTTTTCTAG
EcoRI-adrJ-R	TGAACGAATTCCTAACTCGAACCCAATTTG
KpnI-adrA-F	CTGCTGGTACCATGGCCGTCGACAAGC
KpnI-adrA-R	TCTGGAGGTACCTCAGAAAGTGACCTCCTC
pTA-SpeI-F	GAGGAACTAGTTCATGGTGTGTTTGATCATTTTAA
pTA-SpeI-R	GACCATACTAGTTTCCGTTCCCTTTGCTTTCTGC
pTA-HindIII-F	CTAGAAGCTTCCCATCATGGTGTTTGTGATC
pTA-HindIII-R	CATGAAAGCTTCCGTTCCCTTTGCTTTCTGC

Table 2. Plasmids constructed in Chapter 2 and PCR / ligation conditions.

Plasmid	Insert	Primer 1	Primer 2	PCR Template	Ligation method
pTAex3-adrI	<i>adrI</i>	KpnI-adrI-F	KpnI-adrI-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pAdeA-adrI	<i>PamyB-adrI-TamyB</i>	pTA-SpeI-F	pTA-SpeI-R	pTAex3-adrI	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-adrF	<i>adrF</i>	KpnI-adrF-F	KpnI-adrF-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-adrE	<i>adrE</i>	KpnI-adrE-F	KpnI-adrE-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pPTRI-adrE	<i>PamyB-adrE-TamyB</i>	pTA-HindIII-F	pTA-HindIII-R	pTAex3-adrE	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andJ	<i>adrJ</i>	EcoRI-adrJ-F	EcoRI-adrJ-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pAdeA-adrJ	<i>PamyB-adrJ-TamyB</i>	pTA-SpeI-F	pTA-SpeI-R	pTAex3-andJ	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pUSA-adrA	<i>adrA</i>	KpnI-adrA-F	KpnI-adrA-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1

● 化合物データ

Andrastin A (1). White solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$ -109.8 (CHCl_3 , c 0.2); HRMS found m/z 509.2527 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd 509.2510 for $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{O}_7\text{Na}$). NMR データは文献値⁸⁵と良い一致を示した。

Andrastin B (2). White solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -90.4 (CHCl_3 , c 0.2); HRMS found m/z 511.2646 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd 511.2666 for $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_7\text{Na}$). NMR データは文献値⁸⁵と良い一致を示した。

Andrastin C (3). Colorless oil; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -143.4 (CHCl_3 , c 1.2); HRMS found m/z 495.2721 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd 495.2717 for $\text{C}_{28}\text{H}_{40}\text{O}_6\text{Na}$). NMR データは文献値⁸⁵と良い一致を示した。

Andrastin D (4). White solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -180.8 (CHCl_3 , c 0.5); HRMS found m/z 451.2460 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd 451.2455 for $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Na}$). NMR データは文献値⁸⁰と良い一致を示した。

Andrastin E (7). White solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$ -138.4 (CHCl_3 , c 0.8); HRMS found m/z 453.2604 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd 453.2611 for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{Na}$).

Andrastin F (8). White solid; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -154.7 (CHCl_3 , c 1.1); HRMS found m/z 453.2612 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd 453.2611 for $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{Na}$).

第3章実験項

● *ausB*、*ausC*、*ausE* 共発現系の構築

酸化酵素遺伝子群の共発現型を構築するため、*ausB*、*ausC*、*ausE* をそれぞれ pTAex3、pUSA、pAdeA に導入した。使用したプライマーの配列、構築したプラスミド、およびその構築方法の概要は Table 3 ならびに Table 4 に列挙した。得られた 3 つのプラスミドを用いて *A. oryzae* NSAR1 株を形質転換することで、*ausB*、*ausC*、*ausE* の 3 遺伝子発現系を得た。一つまたは複数の遺伝子を発現しないネガティブコントロール株の構築にあたっては、対応する空ベクターを用いて形質転換を行った。

● 酸化酵素群の機能解析

上記により構築された酸化酵素発現株については、基質となる protoaustinoid A (30 mg/L) の存在下で培養を行ったのち、HPLC 分析ならびに代謝物の単離精製操作に供した。Protoaustinoid A は、文献既知の方法⁵⁶で調製した。

● Berkeleyone A (13) の単離、精製

AusB を単独で発現株を 2 L スケールで培養したのち、抽出操作を実行した。順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-98/2) により分画後、さらに HPLC 分取 (60%アセトニトリル水溶液) により精製することで 6.36 mg の白色粉末を得た。

● Preaustinoid A (14)、5-hydroxyberkeleyone A (18)、preaustinoid C (19)、austinoid C (20) の単離、精製

AusB および AusE の共発現株を 4 L スケールで培養したのち、抽出操作を実行した。順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-90/10) により分画後、さらに HPLC 分取 (55%アセトニトリル水溶液) により精製を行った。各化合物の培養液 4 L あたりの収量は、preaustinoid A (14): 0.81 mg、5-hydroxyberkeleyone A (18): 5.58 mg、preaustinoid C (19): 3.38 mg、austinoid C (20): 9.91 mg であった。

● Preaustinoid A2 (16) および Preaustinoid A3 (17) の単離、精製

AusB、AusC および AusE の共発現株を 2 L スケールで培養したのち、抽出操作を実行した。順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画後、

さらに HPLC 分取 (50%アセトニトリル水溶液) により精製を行った。各化合物の培養液 2 L あたりの収量は、preaustinoid A2 (**16**) : 1.94 mg、preaustinoid A3 (**17**) : 9.04 mg であった。

● AusE の大量発現ならびに精製

大腸菌内で *ausE* を発現させるため、当該遺伝子を pAdeA-*ausE* より増幅後、pET-28a(+)ベクターに導入し、pET-28a(+)-*ausE* を得た。本プラスミドを用いて *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS 株を形質転換した。得られた形質転換体を、カナマイシンを加えた LB 液体培地で 37 °C、180 rpm にて OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養したのち、0.05 mM の IPTG を加えることで遺伝子発現を誘導し、引き続き 28 °C、180 rpm にて 15 時間培養を行った。菌体を遠心操作にて回収後、破碎バッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5% glycerol) に懸濁させた。氷上で超音波にて細胞を破碎した後、遠心操作によって細胞残滓を取り除いた。得られた上清を Ni キレートレジンに通液後、100 カラム体積の洗浄バッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5% glycerol) にてカラムを洗浄した。His タグ融合タンパク質は、5 カラム体積の溶出バッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 300 mM imidazole, 5% glycerol) を用いて溶出させたのち、限外濾過を行うことで imidazole を含まないバッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol) に置換するとともに濃縮した。得られた精製タンパク質の純度は SDS-PAGE にて分析した。また、タンパク質の濃度は分光光度計を用いて決定した。

● AusE の酵素反応

AusE の *in vitro* アッセイは、100 µL の酵素反応液 (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.1 mM FeSO₄, 2.5 mM α-ketoglutarate, 4 mM ascorbate, 500 µM substrate, 2 µM AusE) を 30 °C で 2 時間インキュベートすることで行った。なお、本反応の基質は berkeleyone A (**13**) または preaustinoid A2 (**16**) である。酵素反応は、100 µL のメタノールを加えてボルテックスすることで終結させた。遠心操作により不溶物を沈殿させたのち、上清を HPLC 分析ならびに LC-MS/MS 分析に供した。HPLC の分析条件は下記の通りである。

グラジエント : 50/0 – 50/5 – 100/15 – 100/20 – 50/23 (%B/min)

流速 : 1.0 mL/min

カラム温度 : 40 °C

Table 3. Primers used in Chapter 3.

Primer	Sequence (5' to 3')
EcoRI-ausB-F	TACCACAGAATTCATGGGCACCTCTGAAGA
EcoRI-ausB-R	GTGCTGAGAATTCCTACCTGGAACCCCTCAG
KpnI-ausC-F	TACGGATTTGGTACCATGACTATTACACCC
KpnI-ausC-R	CCTTGGTACCTCAAACTTCGCAAAAAAAG
EcoRI-ausE-F	AGTAACAGAATTCATGGGCTCAGCTACTCC
EcoRI-ausE-R	CTCCAAGAATTCCTAAGCGCTGGAGATCAA
pTA-Spel-F	GAGGAAGTAGTTCATGGTGTGTTTGATCATTTTAA
pTA-Spel-R	GACCATACTAGTTTCCGTTCTTTGCTTTCTGC
NdeI-ausE-F	GTAACACATATGGGCTCAGCTACTCCATCC

Table 4. Plasmids constructed in Chapter 3 and PCR / ligation conditions.

Plasmid	Insert	Primer 1	Primer 2	PCR Template	Ligation method
pTAex3-ausB	<i>ausB</i>	EcoRI-ausB-F	EcoRI-ausB-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pUSA-ausC	<i>ausC</i>	KpnI-ausC-F	KpnI-ausC-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-ausE	<i>ausE</i>	EcoRI-ausE-F	EcoRI-ausE-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pAdeA-ausE	<i>PamyB-ausE-TamyB</i>	pTA-Spel-F	pTA-Spel-R	pTAex3-ausE	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pET-28a(+)-ausE	<i>ausE</i>	NdeI-ausE-F	EcoRI-ausE-R	pAdeA-ausE	DNA Ligation Kit Ver.2.1

● 化合物データ

Berkeleyone A (13). White powder; $[\alpha]_D^{20}$ -8.7 (*c* 1.47, CHCl₃); HRMS found *m/z* 447.2734 [M+H]⁺ (calcd 447.2741 for C₂₆H₃₉O₆). NMR データは文献値⁹⁸と良い一致を示した。

Preaustinoid A (14). White powder; $[\alpha]_D^{20}$ -17.4 (*c* 0.33, CHCl₃); HRMS found *m/z* 467.2421 [M+Na]⁺ (calcd 267.2404 for C₂₆H₃₆O₆Na). NMR データは文献値⁹⁹と良い一致を示した。

Preaustinoid A2 (16). White powder; $[\alpha]_D^{22}$ -6.5 (*c* 0.16, CHCl₃); HRMS found *m/z* 459.2357 [M+H]⁺ (calcd 459.2377 for C₂₆H₃₅O₇). NMR データは文献値¹⁰¹と良い一致を示した。

Preaustinoid A3 (17). White powder; $[\alpha]_D^{23}$ +429.1 (*c* 0.76, CHCl₃); HRMS found *m/z* 457.2202 [M+H]⁺ (calcd 457.2221 for C₂₆H₃₃O₇). NMR データは文献値¹⁰⁰と良い一致を示した。

5-Hydroxyberkeleyone A (18). Colorless oil; $[\alpha]_D^{21}$ -14.0 (*c* 0.47, CHCl₃); HRMS found *m/z* 501.2230 [M+K]⁺ (calcd 501.2249 for C₂₆H₃₈O₇K).

Preaustinoid C (19). White powder; $[\alpha]_D^{21}$ -10.5 (*c* 0.32, CHCl₃); HRMS found *m/z* 443.2418 [M+H]⁺ (calcd 443.2428 for C₂₆H₃₅O₆).

Austinoid C (20). White powder; $[\alpha]_D^{22}$ +237.5 (*c* 0.76, CHCl₃); HRMS found *m/z* 441.2253 [M+H]⁺ (calcd 441.2272 for C₂₆H₃₃O₆).

第4章実験項

● *E. varicolor* NBRC 32302 株のドラフトゲノムシーケンス解析

E. varicolor NBRC 32302 株のドラフトゲノムシーケンス解析は北海道システム・サイエンス株式会社に依頼し、Illumina HiSeq 2000 を用いて行われた。配列アセンブリは Velvet¹⁴² version 1.2.08 (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>) によって行い、およそ 33.5 Mb をカバーする 630 のコンティグを得た。AUGUSTUS¹⁴³ (<http://bioinf.uni-greifswald.de/webaugustus/>) を用いて遺伝子予測を行い、得られた全ての遺伝子産物を local BLAST 検索用のデータベース構築に使用した。なお、予測された遺伝子の配列は必要に応じて、NCBI データベース中に存在するホモログ遺伝子との配列比較を行ったのち、修正を施した。また、*and* クラスターの配列データは DDBJ/EMBL/GenBank に登録を行った（アクセッション番号：AB981314）。

● 糸状菌発現ベクターpBARIの構築

グルホシネート耐性遺伝子を有し、かつ簡便に利用できる糸状菌発現ベクターを構築するため、pPTRI の有する *ptrA* 遺伝子のコーディング領域をグルホシネート耐性遺伝子 *bar* のそれと置換することとした。まず、*bar* 遺伝子のコーディング領域を、pBARGPE1 ベクター¹⁴⁴ を鋳型に、プライマー *bar*-pPTRI-F および *bar*-pPTRI-R (Table 5) を用いて増幅した。次いで、*ptrA* 遺伝子のコーディング領域を含まない線状化 pPTRI を、プライマー pPTRI-F および pPTRI-R (Table 5) を用いて増幅した。両 PCR 産物を精製後、In-Fusion 反応により連結し、*bar* 遺伝子を有する糸状菌発現ベクターを得た。本ベクターを pBARI と命名した。

● 糸状菌発現プラスミドの構築

一遺伝子のみを有する発現プラスミドの構築にあたっては、*E. varicolor* NBRC 32302 株のゲノム DNA を鋳型位に、Table 5 および Table 6 に示したプライマーを用いて、*and* クラスター内の各遺伝子を増幅した。得られた各 DNA 断片は必要に応じて制限酵素で消化したのち、DNA リガーゼまたは In-Fusion 反応によって、pTAex3、pUSA、pUNA ベクターに導入した。pAdeA、pPTRI、pBARI への導入に際しては、pTAex3 に目的遺伝子を導入したのち *PamyB* ならびに *TamyB* を含めた領域を増幅し、各ベクターに導入した。

つぎに、*andK* および *andD* を有するプラスミドの構築にあたっては、pTAex3-*andD* を *Bam*HI で消化することで *PamyB-andD-TamyB* を含む領域を得て、これを *Bam*HI で消化後、脱リン酸化を施した pUSA-*andK* に DNA リガーゼを用いて連結することで pUSA-*andK+andD* を構築し

た。それ以外の共発現プラスミドの作製にあたっては、*PamyB* ならびに *TamyB* の両方または一方を含む各遺伝子断片を、各遺伝子を導入した pTAex3 由来のプラスミドより増幅後、各ベクターに導入し、二遺伝子を含むプラスミドを構築した。使用したプライマーの配列、構築したプラスミド、およびその構築方法の概要は Table 5 ならびに Table 6 に示した。

● *A. oryzae* 異種発現系の構築

11 遺伝子発現系の構築にあたっては、まず *A. oryzae* NSAR1 株を三つのプラスミド pTAex3-andM、pUSA-andK+andD、pAdeA-andE+andB を用いて形質転換することで、5 遺伝子発現系を作製した。得られた形質転換体をさらに pUNA-andC+andA、pPTRI-andJ+I を用いて形質転換し、9 遺伝子発現系を得た。最後に、本形質転換体を pBARI-andG+andI を用いて形質転換することで 11 遺伝子発現系を構築した。

つぎに、*andA*、*andC*、*andF*、*andH*、*andI*、*andJ* の 6 遺伝子発現系の構築には、三つのプラスミド pTAex3-andA+andF、pUSA-andC+andH、pAdeA-andI+andJ を用いて *A. oryzae* NSAR1 株を形質転換した。いずれの場合においても、一つまたは複数の遺伝子を発現しないネガティブコントロール株の構築にあたっては、対応する空ベクターを用いて形質転換を行った。

● 各代謝物の単離、精製

Anditomin 以外の各代謝物の単離、精製にあたっては、各 *A. oryzae* 形質転換体を 1 L スケールで培養したのち、抽出操作を実行した。各化合物の単離、精製スキームを以下に示す。

3,5-Dimethylorsellinic acid (DMOA, **9**) の精製：*andM* を単独で発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-80/20) により分画後、さらに HPLC 分取 (40%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、20.6 mg の黄白色固体を得た。

5,7-Dihydroxy-4,6-dimethylphthalide (DHDMP, **26**) の精製：*andM*、*andK* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-80/20) により分画後、さらに HPLC 分取 (40%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、55.8 mg の黄白色固体を得た。

Farnesyl-DHDMP (**27**) の精製：*andM*、*andK*、*andD* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物の菌体抽出物のみを順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画後、さらに HPLC 分取 (80%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、7.2 mg の黄色油状物質を得た。

Dihydroxyfarnesyl-DHDMP (**28'**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画後、さらに HPLC 分取 (45%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、2.39 mg の黄色油状物質を得た。

Preandiloid A (**29**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画後、さらに HPLC 分取 (55%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、13.3 mg の白色アモルファス固体を得た。

Preandiloid B (**30**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB*、*andC* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画後、さらに HPLC 分取 (60%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、63.2 mg の白色アモルファス固体を得た。

Preandiloid C (**31**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB*、*andC*、*andA* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画後、さらに二度の HPLC 分取 (65%メタノール水溶液、次いで 40%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、8.7 mg の白色アモルファス固体を得た。

Andiconin (**32**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB*、*andC*、*andA* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-95/5) により分画後、さらに二度の HPLC 分取 (65%メタノール水溶液、次いで 45%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、18.0 mg の無色針状物質を得た。

Andilesin D (**33**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB*、*andC*、*andA*、*andJ* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-90/10) により分画後、HPLC 分取 [溶媒 A：水、溶媒 B：アセトニトリル、グラジエント：20/0 – 90/17.5 – 20/20.5 (%B/min)] により精製を行い、6.3 mg の白色アモルファス固体を得た。

Andilesin A (**22**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB*、*andC*、*andA*、*andJ*、*andI* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-85/15) により分画後、さらに HPLC 分取 (50%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、28.0 mg の無色針状物質を得た。

Andilesin B (**23**) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB*、*andC*、*andA*、*andJ*、*andI*、*andG* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラ

フィー (chloroform/ MeOH = 100/0-90/10) により分画後、さらに HPLC 分取 (60%メタノール水溶液) により精製を行い、14.1 mg の白色固体を得た。

Andilesin C (24) の精製：*andM*、*andK*、*andD*、*andE*、*andB*、*andC*、*andA*、*andJ*、*andI*、*andG*、*andH* を共発現する *A. oryzae* 形質転換体由来の抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-90/10) により分画後、さらに HPLC 分取 (55%メタノール水溶液) により精製を行い、7.8 mg の無色針状物質を得た。

Anditomin (21) の精製：*E. varicolor* NBRC32302 株を 1 L の麦芽エキス液体培地で 10 日間静置培養したのち、培養上清を酢酸エチルで抽出した。抽出物を順相のオープンカラムクロマトグラフィー (chloroform/ MeOH = 100/0-90/10) により分画後、さらに HPLC 分取 (50%アセトニトリル水溶液) により精製を行い、1.9 mg の白色固体を得た。

● AndA、AndF、AndG の大量発現ならびに精製

大腸菌内で *andA*、*andF*、または *andG* を発現させるため、各遺伝子を増幅後 *NdeI* および *EcoRI* で消化し、同じ制限酵素で消化した pET-28a(+)ベクターと連結した。使用したプライマーの配列、構築したプラスミド、およびその構築方法の概要は Table 3 ならびに Table 4 に列挙した。

AndA の発現にあたっては、pET-28a(+)-*andA* を用いて *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS 株を形質転換した。得られた形質転換体を、カナマイシンを加えた LB 液体培地で 37 °C、180 rpm にて OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養したのち、0.5 mM の IPTG を加えることで遺伝子発現を誘導し、引き続き 20 °C、180 rpm にて 15 時間培養を行った。菌体を遠心操作にて回収後、破碎バッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5% glycerol) に懸濁させた。氷上で超音波にて細胞を破碎した後、遠心操作によって細胞残渣を取り除いた。得られた上清を Ni キレートレジンに通液後、30 カラム体積の洗浄バッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 5% glycerol) にてカラムを洗浄した。His タグ融合タンパク質は、5 カラム体積の溶出バッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 300 mM imidazole, 5% glycerol) を用いて溶出させたのち、限外濾過を行うことでimidazoleを含まないバッファー (50 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5% glycerol) に置換するとともに濃縮した。得られた精製タンパク質の純度は SDS-PAGE にて分析した。また、タンパク質の濃度は分光光度計を用いて決定した。

AndF および AndG の発現にあたっては、pET-28a(+)-*andF* または pET-28a(+)-*andG* を用いて *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL 株を形質転換した。得られた形質転換体を、カナマイシンを加えた LB 液体培地で 37 °C、180 rpm にて OD₆₀₀ が 0.6 に達するまで培養したのち、0.5 mM

の IPTG を加えることで遺伝子発現を誘導し、引き続き 18 °C、180 rpm にて 20 時間培養を行った。以後の精製操作は AndA の場合と同様にして行った。

● AndA の酵素反応

AndA の *in vitro* アッセイは、50 μ L の反応液 (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.1 mM FeSO₄, 2.5 mM α -ketoglutarate, 4 mM ascorbate, 500 μ M substrate, 5.8 μ M AndA) を 30 °C で 3 時間インキュベートすることで行った。なお、本反応の基質は preandiloid C (**30**) または andiconin (**31**) である。酵素反応は、50 μ L のメタノールを加えてボルテックスすることで終結させた。遠心操作により不溶物を沈殿させたのち、上清を HPLC 分析ならびに LC-MS/MS 分析に供した。

● AndG の酵素反応

AndG の *in vitro* アッセイは、50 μ L の酵素反応液 (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 2 mM acetyl-CoA, 500 μ M andilesin A (**22**), 8.6 μ M AndG) を 30 °C で 3 時間インキュベートすることで行った。なお、本反応の基質は preandiloid C (**30**) または andiconin (**31**) である。酵素反応は、50 μ L のメタノールを加えてボルテックスすることで終結させた。遠心操作により不溶物を沈殿させたのち、上清を HPLC 分析ならびに LC-MS/MS 分析に供した。

● Andilesin A (**22**) のアセチル化

1.79 mg の andilesin A (**22**) を 300 μ L の無水ピリジンに溶解し、ここに 128.0 mg の無水酢酸を加えた。65 °C で 8 時間反応させたのち、反応液をメタノールで希釈し HPLC 分析ならびに LC-MS/MS 分析に供した。

● AndF の酵素反応

AndF の *in vitro* アッセイは、50 μ L の酵素反応液 (50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), 0.1 mM FeSO₄, 2.5 mM α -ketoglutarate, 4 mM ascorbate, 500 μ M andilesin C (**24**), 7.4 μ M AndF) を 30 °C で 3 時間インキュベートすることで行った。酵素反応は、50 μ L のメタノールを加えてボルテックスすることで終結させた。遠心操作により不溶物を沈殿させたのち、上清を HPLC 分析ならびに LC-MS/MS 分析に供した。

Table 5. Primers used in Chapter 4.

Primer	Sequence (5' to 3')
bar-pPTRI-F	ATTGCAACTTGAAACATGAGCCCAGAACGACGCC
bar-pPTRI-R	CGGGTAGTGAGTCATTGAGATCTCGGTGACGGGCA
pPTRI-F	GTTTCAAGTTGCAATGACTATCATCTGTTAGCC
pPTRI-R	ATGACTCACTACCCGAATGGGTTCAAGT
InF-andM-F	TTGAGCTCGGTACCATGGAAGCCAGCCAGGGGATCGC
InF-andM-R	AGATCCCCGGGTACCGCAGAAAATCAGCATTGTACACGGTC
InF-andK-F	TTGAGCTCGGTACCATGATGCCGACGGTCACAGCAGTTA
InF-andK-R	AGATCCCCGGGTACCCCTATCCAGACAAAGCCTCCTCCATC
KpnI-andD-F	TACGCTAGGTACCATGTCCGCAACAATAC
KpnI-andD-R	CCAGAGGGTACCTCAGGACCGCCAGAC
KpnI-andE-F	CTAAGTTTGGTACCATGGAACAGCAATCAC
KpnI-andE-R	CTATGAGGTACCCTATGAAGCAAGGAGAAG
KpnI-andB-F	ACGAGGTACCATGCAGCCCATCACTC
KpnI-andB-R	AGACCCTGGTACCCTAAATGGCCTTCGC
KpnI-andC-F	TGACTAGGTACCATGGGATTCTTCAAGAC
KpnI-andC-R	TATTGGGTACCCTATATCGTTGACCAAGCG
EcoRI-andA-F	GCCACCGAATTCATGACCATCGAATCTAAG
KpnI-andA-R	GGACAAGGGTACCTTAAGCAGTCTTAGACT
EcoRI-andJ-F	AGATTGAATTCATGGCACCAGCAATCAAG
EcoRI-andJ-R	CTTATCGAATTCTCATGCTAGACGCTTTATC
EcoRI-andI-F	AAGTCGGAATTCATGGAGAAAGCCGTATCC
KpnI-andI-R	CTAGAGGTACCCTATACTCTCATAGTAACCC
EcoRI-andG-F	CTATCGAATTCATGCCCTGGATTTCAGTCCC
KpnI-andG-R	GAGTCTGGTACCTCAGTCCACAGTCAAGAA
EcoRI-andH-F	AAGCGGAATTCATGCCGTCCCTGAGTCA
KpnI-andH-F	AAGCGGGTACCATGCCGTCCCTGAGTCAGATTC
KpnI-andH-R	TGCGTGGTACCTCAAGCTGGTTCAGCAG
EcoRI-andF-F	ATCATCGAATTCATGACCGTTCCCCAACTT
KpnI-andF-R	CCCGTGGTACCATTACACAGCGATGGAC
InF-andA-F	TCGAGCTCGGTACCCATGACCATCGAATCTAAGAACTACC
InF-andC-F	TCGAGCTCGGTACCCATGGGATTCTTCAAGACAAGG
InF-andC-R	CTACTACAGATCCCCCTATATCGTTGACCAAGCGTC
InF-andF-R	CTACTACAGATCCCCATTTACACAGCGATGGACTTCA
InF-andH-R	CTACTACAGATCCCCTCAAGCTGGTTCAGCAGAGC
pTAex3-XbaI-F	CTAGTCTAGACCCATCATGGTGTGTTTGATC
pTAex3-XbaI-R	CATGAATCTAGACGTTTCCTTTGCTTTCTGC
pTAex3-SpeI-F	GAGGAACTAGTTCATGGTGTGTTTGATCATTTTAA
pTAex3-SpeI-R	GACCATACTAGTTTCCGTTCCCTTTGCTTTCTGC
InF-pAdeA-F	CAGGTCGACTCTAGACGACTCCAATCTTCAAGAGC
InF-pAdeA-R	AGTAGATCCTCTAGAGTAAGATACATGAGCTTCGG
InF-linker-F1	GCTCGCGAGCGGTTCCACTGCATCATCAGTCTAG
InF-linker-R1	AACGCGCTCGCGAGCAAGTACCATACAGTACCGCG
InF-pPTRI-F	TGATTACGCCAAGCTTCGACTCCAATCTTCAAGAGC
InF-pPTRI-R	GTGAATTCGAGCTCGGTACCGTAAGATACATGAGCTTCGG
InF-pBARI-R	GCAGGCATGCAAGCTTGTAAGATACATGAGCTTCG
NdeI-andA-F	GCCACCCATATGATGACCATCGAATCTAAG
EcoRI-andA-R	GGACAAGGAATTCTTAAGCAGTCTTAGACT
NdeI-andF-F	ATCATCCATATGATGACCGTTCCCCAACTT
EcoRI-andF-R	CCCGTGAATTCATTTACACAGCGATGGAC
NdeI-andG-F	GCCACCCATATGATGCCTGGATTTCAGTCCC
EcoRI-andG-R	GGACAAGGAATTCTCAGTCCACAGTCAAGAA

Table 6. Plasmids constructed in Chapter 4 and PCR / ligation conditions.

Plasmid	Insert	Primer 1	Primer 2	PCR Template	Ligation method
pTAex3-andM	<i>andM</i>	InF-andM-F	InF-andM-R	gDNA	In-Fusion® HD Cloning Kit
pUSA-andK	<i>andK</i>	InF-andK-F	InF-andK-R	gDNA	In-Fusion® HD Cloning Kit
pTAex3-andD	<i>andD</i>	KpnI-andD-F	KpnI-andD-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andE	<i>andE</i>	KpnI-andE-F	KpnI-andE-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andB	<i>andB</i>	KpnI-andB-F	KpnI-andB-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andC	<i>andC</i>	KpnI-andC-F	KpnI-andC-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andA	<i>andA</i>	EcoRI-andA-F	KpnI-andA-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andJ	<i>andJ</i>	EcoRI-andJ-F	EcoRI-andJ-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andI	<i>andI</i>	EcoRI-andI-F	KpnI-andI-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andG	<i>andG</i>	EcoRI-andG-F	KpnI-andG-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andH	<i>andH</i>	EcoRI-andH-F	KpnI-andH-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pTAex3-andF	<i>andF</i>	EcoRI-andF-F	KpnI-andF-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pUSA-andK+D	-	-	-	-	As described above
pAdeA-andE	<i>PamyB-andE- TamyB</i>	pTAex3-XbaI-F	pTAex3-XbaI-R	pTAex3-andE	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pAdeA-andE+B	<i>PamyB-andE- TamyB</i>	InF-pAdeA-F	InF-linker-R1	pTAex3-andE	In-Fusion® HD Cloning Kit
	<i>PamyB-andB- TamyB</i>	InF-linker-F1	InF-pAdeA-R	pTAex3-andB	
pUSA-andC	<i>andC</i>	KpnI-andC-F	KpnI-andC-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pUSA-andH	<i>andH</i>	KpnI-andH-F	KpnI-andH-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pUSA-andC+H	<i>andC- TamyB</i>	InF-andC-F	InF-linker-R1	pTAex3-andC	In-Fusion® HD Cloning Kit
	<i>PamyB-andH</i>	InF-linker-F1	InF-andH-R	pTAex3-andH	
pTAex3-andA+F	<i>andA- TamyB</i>	InF-andA-F	InF-linker-R1	pTAex3-andA	In-Fusion® HD Cloning Kit
	<i>PamyB-andF</i>	InF-linker-F1	InF-andF-R	pTAex3-andF	
pAdeA-andI	<i>PamyB-andI- TamyB</i>	pTAex3-SpeI-F	pTAex3-SpeI-R	pTAex3-andI	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pAdeA-andJ	<i>PamyB-andJ- TamyB</i>	pTAex3-SpeI-F	pTAex3-SpeI-R	pTAex3-andJ	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pAdeA-andI+J	<i>PamyB-andI- TamyB</i>	InF-pAdeA-F	InF-linker-R1	pTAex3-andI	In-Fusion® HD Cloning Kit
	<i>PamyB-andJ- TamyB</i>	InF-linker-F1	InF-pAdeA-R	pTAex3-andJ	
pUNA-andC	<i>andC</i>	InF-andC-F	InF-andC-R	gDNA	In-Fusion® HD Cloning Kit
pUNA-andC+A	<i>andC- TamyB</i>	InF-andC-F	InF-linker-R1	pTAex3-andC	In-Fusion® HD Cloning Kit
	<i>PamyB-andA</i>	InF-linker-F1	InF-andA-R	pTAex3-andA	
pPTRI-andJ	<i>PamyB-andJ- TamyB</i>	InF-pPTRI-F	InF-pPTRI-R	pTAex3-andJ	In-Fusion® HD Cloning Kit
pPTRI-andJ+I	<i>PamyB-andJ- TamyB</i>	InF-linker-F1	InF-pPTRI-R	pTAex3-andJ	In-Fusion® HD Cloning Kit
	<i>PamyB-andI- TamyB</i>	InF-pPTRI-F	InF-linker-R1	pTAex3-andI	
pBARI-andG	<i>PamyB-andG- TamyB</i>	InF-pPTRI-F	InF-pBARI-R	pTAex3-andG	In-Fusion® HD Cloning Kit
pBARI-andG+H	<i>PamyB-andG- TamyB</i>	InF-pPTRI-F	InF-linker-R1	pTAex3-andG	In-Fusion® HD Cloning Kit
	<i>PamyB-andH- TamyB</i>	InF-linker-F1	InF-pBARI-R	pTAex3-andH	
pET-28a(+)-andA	<i>andA</i>	NdeI-andA-F	EcoRI-andA-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pET-28a(+)-andG	<i>andG</i>	NdeI-andG-F	EcoRI-andG-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1
pET-28a(+)-andF	<i>andF</i>	NdeI-andF-F	EcoRI-andF-R	gDNA	DNA Ligation Kit Ver.2.1

● 化合物データ

3,5-Dimethylorsellinic acid (DMOA, 9): Yellowish white solid; HRMS found m/z 179.0711 [$M - H_2O + H$]⁺ (calcd 179.0708 for C₁₀H₁₁O₃). NMR データは文献値⁵⁴と良い一致を示した。

5,7-Dihydroxy-4,6-dimethylphthalide (DHDMP, 26): Yellowish white solid; HRMS found m/z 195.0655 [$M + H$]⁺ (calcd 195.0657 for C₁₀H₁₁O₄). NMR データは文献値¹²²と良い一致を示した。

Farnesyl-DHDMP (27): Yellowish oil; [α]_D²⁰ -37.7 (c 1.00, CHCl₃); HRMS found m/z 421.2339 [$M + Na$]⁺ (calcd 421.2355 for C₂₅H₃₄O₄Na).

Dihydroxyfarnesyl-DHDMP (28'): Yellowish oil; [α]_D²⁰ -87.1 (c 1.00, CHCl₃); HRMS found m/z 455.2403 [$M + Na$]⁺ (calcd 455.2410 for C₂₅H₃₆O₆Na).

Preandiloid A (29): White amorphous solid; [α]_D²⁰ -104.8 (c 1.00, CHCl₃); HRMS found m/z 415.2485 [$M + H$]⁺ (calcd 415.2485 for C₂₅H₃₅O₅).

Preandiloid B (30): White amorphous solid; [α]_D²⁰ -33.9 (c 1.00, CHCl₃); HRMS found m/z 413.2317 [$M + H$]⁺ (calcd 413.2328 for C₂₅H₃₃O₅).

Preandiloid C (31): White amorphous solid; [α]_D²⁰ -53.9 (c 0.53, CHCl₃); HRMS found m/z 411.2164 [$M + H$]⁺ (calcd 411.2172 for C₂₅H₃₁O₅).

Andiconin (32): Colorless needles; [α]_D²⁰ -80.7 (c 1.00, CHCl₃); HRMS found m/z 411.2158 [$M + H$]⁺ (calcd 411.2172 for C₂₅H₃₁O₅).

Andilesin D (33): White amorphous solid; [α]_D²⁰ -87.0 (c 0.46, acetone); HRMS found m/z 427.2120 [$M + H$]⁺ (calcd 427.2121 for C₂₅H₃₁O₆).

Andilesin A (22): Colorless needles; [α]_D²⁰ -4.8 (c 1.00, CHCl₃); HRMS found m/z 429.2289 [$M + H$]⁺ (calcd 429.2277 for C₂₅H₃₃O₆). NMR データは文献値¹⁰⁸と良い一致を示したが、本研究において若干の修正を行った。

Andilesin B (23): White solid; [α]_D²⁰ -257.2 (c 0.59, CHCl₃); HRMS found m/z 411.2155 [$M + H$]⁺ (calcd 411.2172 for C₂₅H₃₁O₅). NMR データは文献値¹⁰⁸と良い一致を示したが、本研究において若干の修正を行った。

Andilesin C (24): Colorless needles; [α]_D²⁰ -0.8 (c 0.61, CHCl₃); HRMS found m/z 413.2332 [$M + H$]⁺ (calcd 413.2328 for C₂₅H₃₃O₅). NMR データは文献値¹⁰⁸と良い一致を示したが、本研究において若干の修正を行った。

Anditomin (21): White solid; [α]_D²⁰ +68.8 (c 0.16, CHCl₃); HRMS found m/z 411.2192 [$M + H$]⁺ (calcd 411.2172 for C₂₅H₃₁O₅). NMR データは文献値⁴⁰と良い一致を示したが、本研究において若干の修正を行った。

参考文献

- (1) Fischbach, M.A.; Walsh, C.T. Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468-3496.
- (2) Hertweck, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688-4716.
- (3) Keatinge-Clay, A.T. The structures of type I polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1050-1073.
- (4) Abe, I.; Morita, H. Structure and function of the chalcone synthase superfamily of plant type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 809-838.
- (5) Hur, G.H.; Vickery, C.R.; Burkart, M.D. Explorations of catalytic domains in non-ribosomal peptide synthetase enzymology. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1074-1098.
- (6) Christianson, D.W. Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412.
- (7) Gao, Y.; Honzatko, R.B.; Peters, R.J. Terpenoid synthase structures: A so far incomplete view of complex catalysis. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1153-1175.
- (8) Baunach, M.; Franke, J.; Hertweck, C. Terpenoid biosynthesis off the beaten track: Unconventional cyclases and their impact on biomimetic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 2604-2626.
- (9) Lin, H.-C.; Tsunematsu, Y.; Dhingra, S.; Xu, W.; Fukutomi, M.; Chooi, Y.-H.; Cane, D.E.; Calvo, A.M.; Watanabe, K.; Tang, Y. Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: Discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4426-4436.
- (10) Tsunematsu, Y.; Ishikawa, N.; Wakana, D.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Moriya, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 818-825.
- (11) Vålgård, K.; van Scheltinga, A.; Lloyd, M.; Hara, T.; Ramaswamy, S.; Perrakis, A.; Thompson, A.; Lee, H.; Baldwin, J.; Schofield, C.; Hajdu, J.; Andersson, I. Structure of a cephalosporin synthase. *Nature* **1998**, *394*, 805-809.
- (12) Vålgård, K.; van Scheltinga, A.C.T.; Dubus, A.; Raghino, G.; Öster, L.M.; Hajdu, J.; Andersson, I. The structural basis of cephalosporin formation in a mononuclear ferrous enzyme. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2003**, *11*, 95-101.
- (13) Davison, J.; al Fahad, A.; Cai, M.; Song, Z.; Yehia, S.Y.; Lazarus, C.M.; Bailey, A.M.; Simpson, T.J.; Cox, R.J. Genetic, molecular, and biochemical basis of fungal tropolone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 7642-7647.
- (14) Ishikawa, N.; Tanaka, H.; Koyama, F.; Noguchi, H.; Wang, C.C.; Hotta, K.; Watanabe, K. Non-heme

dioxygenase catalyzes atypical oxidations of 6,7-bicyclic systems to form the 6,6-quinolone core of viridicatin-type fungal alkaloid. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 12880–12884.

(15) Teufel, R.; Miyanaga, A.; Michaudel, Q.; Stull, F.; Louie, G.; Noel, J.P.; Baran, P.S.; Palfey, B.; Moore, B.S. Flavin-mediated dual oxidation controls an enzymatic Favorskii-type rearrangement. *Nature* **2013**, *503*, 552–556.

(16) Hu, Y.; Dietrich, D.; Xu, W.; Patel, A.; Thuss, J.A.; Wang, J.; Yin, W.-B.; Qiao, K.; Houk, K.; Vederas, J.C. A carbonate-forming Baeyer-Villiger monooxygenase. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 552–554.

(17) Lyons, T.W.; Sanford, M.S. Palladium-catalyzed ligand-directed C–H functionalization reactions. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 1147–1169.

(18) Godula, K.; Sames, D. CH bond functionalization in complex organic synthesis. *Science* **2006**, *312*, 67–72.

(19) Urlacher, V.B.; Girhard, M. Cytochrome P450 monooxygenases: an update on perspectives for synthetic application. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 26–36.

(20) Takahashi, S.; Toyoda, A.; Sekiyama, Y.; Takagi, H.; Nogawa, T.; Uramoto, M.; Suzuki, R.; Koshino, H.; Kumano, T.; Panthee, S.; Daiiri, T.; Ishikawa, J.; Ikeda, H.; Sakaki, Y.; Osada, H. Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 461–468.

(21) Hashimoto, T.; Hashimoto, J.; Teruya, K.; Hirano, T.; Shin-Ya, K.; Ikeda, H.; Liu, H.-w.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. Biosynthesis of versipelostatin: Identification of an enzyme-catalyzed [4+2]-cycloaddition required for macrocyclization of spirotetronate-containing polyketides. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 572–575.

(22) Klayman, D.L. Qinghaosu (artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science* **1985**, *228*, 1049–1055.

(23) White, N.J. Qinghaosu (artemisinin): the price of success. *Science* **2008**, *320*, 330–334.

(24) Ro, D.K.; Paradise, E.M.; Ouellet, M.; Fisher, K.J.; Newman, K.L.; Ndungu, J.M.; Ho, K.A.; Eachus, R.A.; Ham, T.S.; Kirby, J.; Chang, M.C.Y.; Withers, S.T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J.D. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature* **2006**, *440*, 940–943.

(25) Paddon, C.J.; Westfall, P.J.; Pitera, D.J.; Benjamin, K.; Fisher, K.; McPhee, D.; Leavell, M.D.; Tai, A.; Main, A.; Eng, D.; Polichuk, D.R.; Teoh, K.H.; Reed, D.W.; Treynor, T.; Lenihan, J.; Fleck, M.; Bajad, S.; Dang, G.; Dengrove, D.; Diola, D.; Dorin, G.; Ellens, K.W.; Fickes, S.; Galazzo, J.; Gaucher, S.P.; Geistlinger, T.; Henry, R.; Hepp, M.; Horning, T.; Iqbal, T.; Jiang, H.; Kizer, L.; Lieu, B.; Melis, D.; Moss, N.; Regentin, R.; Secrest, S.; Tsuruta, H.; Vazquez, R.; Westblade, L.F.; Xu, L.; Yu, M.; Zhang, Y.; Zhao, L.; Lievense, J.; Covello, P.S.; Keasling, J.D.; Reiling, K.K.; Renninger, N.S.; Newman, J.D. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature* **2013**, *496*, 528–532.

(26) Owens, A.P.; Byrnes, J.R.; Mackman, N. Hyperlipidemia, tissue factor, coagulation, and simvastatin.

Trends Cardiovasc. Med. **2014**, *24*, 95-98.

(27) Xie, X.; Watanabe, K.; Wojcicki, W.A.; Wang, C.C.; Tang, Y. Biosynthesis of lovastatin analogs with a broadly specific acyltransferase. *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 1161-1169.

(28) Jiménez-Osés, G.; Osuna, S.; Gao, X.; Sawaya, M.R.; Gilson, L.; Collier, S.J.; Huisman, G.W.; Yeates, T.O.; Tang, Y.; Houk, K. The role of distant mutations and allosteric regulation on LovD active site dynamics. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 431-436.

(29) Geris, R.; Simpson, T.J. Meroterpenoids produced by fungi. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1063-1094.

(30) Bentley, R. Mycophenolic acid: a one hundred year odyssey from antibiotic to immunosuppressant. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 3801-3826.

(31) Molina, J.-M.; Tourneur, M.; Sarfati, C.; Chevret, S.; de Gouvello, A.; Gobert, J.-G.; Balkan, S.; Derouin, F. Fumagillin treatment of intestinal microsporidiosis. *N. Engl. J. Med.* **2002**, *346*, 1963-1969.

(32) Kruger, E.A.; Figg, W.D. TNP-470: an angiogenesis inhibitor in clinical development for cancer. *Expert opinion on investigational drugs* **2000**, *9*, 1383-1396.

(33) Tomoda, H.; Nishida, H.; Kim, Y.K.; Obata, R.; Sunazuka, T.; Omura, S.; Bordner, J.; Guadiana, M.; Dormer, P.G.; Smith III, A.B. Relative and absolute stereochemistry of pyripyropene A, a potent, bioavailable inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT). *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 12097-12098.

(34) Ohshiro, T.; Ohte, S.; Matsuda, D.; Ohtawa, M.; Nagamitsu, T.; Sunazuka, T.; Harigaya, Y.; Rudel, L.L.; Omura, S.; Tomoda, H. Selectivity of pyripyropene derivatives in inhibition toward acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 2 isozyme. *J. Antibiot.* **2008**, *61*, 503-508.

(35) Ohshiro, T.; Matsuda, D.; Sakai, K.; Degirolamo, C.; Yagyu, H.; Rudel, L.L.; Omura, S.; Ishibashi, S.; Tomoda, H. Pyripyropene A, an acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase 2-selective inhibitor, attenuates hypercholesterolemia and atherosclerosis in murine models of hyperlipidemia. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 1108-1115.

(36) Peng, F.-C. Acetylcholinesterase inhibition by territrems B derivatives. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 857-862.

(37) Yabu, Y.; Suzuki, T.; Nihei, C.-i.; Minagawa, N.; Hosokawa, T.; Nagai, K.; Kita, K.; Ohta, N. Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in *Trypanosoma vivax*-infected mice without glycerol. *Parasitol. Int.* **2006**, *55*, 39-43.

(38) Simpson, T.J.; Stenzel, D.J.; Bartlett, A.J.; O'Brien, E.; Holker, J.S.E. Studies on fungal metabolites part 3. ¹³C N.m.r spectral and structural studies on austin and new related meroterpenoids from *Aspergillus ustus*, *Aspergillus variegator*, and *Penicillium diversum*. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1982**, 2687-2692.

(39) Dunn, A.W.; Johnstone, R.A.; Sklarz, B.; King, T.J. Isolation of C₂₅ polyisoprenoids from *Aspergillus* sp:

Crystal structure of andibenin. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1976**, 270a-270a.

(40) Simpson, T.J.; Walkinshaw, M.D. Anditomin, a new C₂₅ metabolite from *Aspergillus variegator*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 914-915.

(41) Rank, C.; Phipps, R.K.; Harris, P.; Fristrup, P.; Larsen, T.O.; Gotfredsen, C.H. Novofumigatonin, a new orthoester meroterpenoid from *Aspergillus novofumigatus*. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 401-404.

(42) Cueto, M.; MacMillan, J.B.; Jensen, P.R.; Fenical, W. Tropolactones A–D, four meroterpenoids from a marine-derived fungus of the genus *Aspergillus*. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 1826-1831.

(43) Itoh, T.; Tokunaga, K.; Matsuda, Y.; Fujii, I.; Abe, I.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T. Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nature Chem.* **2010**, *2*, 858-864.

(44) Hu, J.; Okawa, H.; Yamamoto, K.; Oyama, K.; Mitomi, M.; Anzai, H. Characterization of two cytochrome P450 monooxygenase genes of the pyripyropene biosynthetic gene cluster from *Penicillium coprobium*. *J. Antibiot.* **2011**, *64*, 221-227.

(45) Hu, J.; Furutani, A.; Yamamoto, K.; Oyama, K.; Mitomi, M.; Anzai, H. Characterization of two acetyltransferase genes in the pyripyropene biosynthetic gene cluster from *Penicillium coprobium*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **2014**, *28*, 818-826.

(46) Du, L.; Lou, L. PKS and NRPS release mechanisms. *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 255-278.

(47) Ma, S.M.; Li, J.W.-H.; Choi, J.W.; Zhou, H.; Lee, K.M.; Moorthie, V.A.; Xie, X.; Kealey, J.T.; Da Silva, N.A.; Vederas, J.C.; Tang, Y. Complete reconstitution of a highly reducing iterative polyketide synthase. *Science* **2009**, *326*, 589-592.

(48) Tsunematsu, Y.; Fukutomi, M.; Saruwatari, T.; Noguchi, H.; Hotta, K.; Tang, Y.; Watanabe, K. Elucidation of pseurotin biosynthetic pathway points to trans - acting C - methyltransferase: Generation of chemical diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 8475-8479.

(49) Crawford, J.M.; Dancy, B.C.; Hill, E.A.; Udvary, D.W.; Townsend, C.A. Identification of a starter unit acyl-carrier protein transacylase domain in an iterative type I polyketide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 16728-16733.

(50) Crawford, J.M.; Thomas, P.M.; Scheerer, J.R.; Vagstad, A.L.; Kelleher, N.L.; Townsend, C.A. Deconstruction of iterative multidomain polyketide synthase function. *Science* **2008**, *320*, 243-246.

(51) Heide, L. Prenyl transfer to aromatic substrates: Genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 171-179.

(52) Yaegashi, J.; Praseuth, M.B.; Tyan, S.-W.; Sanchez, J.F.; Entwistle, R.; Chiang, Y.-M.; Oakley, B.R.; Wang,

C.C. Molecular genetic characterization of the biosynthesis cluster of a prenylated isoindolinone alkaloid aspernidine A in *Aspergillus nidulans*. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2862-2865.

(53) Bräuer, L.; Brandt, W.; Schulze, D.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. A structural model of the membrane - bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *ChemBioChem* **2008**, *9*, 982-992.

(54) Itoh, T.; Tokunaga, K.; Radhakrishnan, E.K.; Fujii, I.; Abe, I.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T. Identification of a key prenyltransferase involved in biosynthesis of the most abundant fungal meroterpenoids derived from 3, 5 - dimethylorsellinic acid. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1132-1135.

(55) Lo, H.-C.; Entwistle, R.; Guo, C.-J.; Ahuja, M.; Szewczyk, E.; Hung, J.-H.; Chiang, Y.-M.; Oakley, B.; Wang, C.C. Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 4709-4720.

(56) Matsuda, Y.; Awakawa, T.; Itoh, T.; Wakimoto, T.; Kushiro, T.; Fujii, I.; Ebizuka, Y.; Abe, I. Terretonin biosynthesis requires methylation as essential step for cyclization. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1738-1741.

(57) Regueira, T.B.; Kildegaard, K.R.; Hansen, B.G.; Mortensen, U.H.; Hertweck, C.; Nielsen, J. Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2011**, *77*, 3035-3043.

(58) Springer, J.P.; Clardy, J.; Wells, J.M.; Cole, R.J.; Kirksey, J.W. The structure of paxilline, a tremorgenic metabolite of *Penicillium paxilli* bainier. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2531-2534.

(59) Gallagher, R.T.; Clardy, J.; Wilson, B.J. Aflatrem, a tremorgenic toxin from *Aspergillus flavus*. *Tetrahedron Lett.* **1980**, *21*, 239-242.

(60) Gallagher, R.T.; Hawkes, A.D.; Steyn, P.S.; Vleggaar, R. Tremorgenic neurotoxins from perennial ryegrass causing ryegrass staggers disorder of livestock: Structure elucidation of lolitrem B. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1984**, 614-616.

(61) de Jesus, A.E.; Steyn, P.S.; van Heerden, F.R.; Vleggaar, R.; Wessels, P.L.; Hull, W.E. Tremorgenic mycotoxins from *Penicillium crustosum*: Isolation of penitrems A-F and the structure elucidation and absolute configuration of penitrem A. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1983**, 1847-1856.

(62) Tagami, K.; Liu, C.; Minami, A.; Noike, M.; Isaka, T.; Fueki, S.; Shichijo, Y.; Toshima, H.; Gomi, K.; Daiiri, T.; Oikawa, H. Reconstitution of biosynthetic machinery for indole-diterpene paxilline in *Aspergillus oryzae*. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260-1263.

(63) Liu, C.; Minami, A.; Noike, M.; Toshima, H.; Oikawa, H.; Daiiri, T. Regiospecificities and prenylation mode specificities of the fungal indole diterpene prenyltransferases AtmD and PaxD. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 7298-7304.

- (64) Wallaart, T.E.; Bouwmeester, H.J.; Hille, J.; Poppinga, L.; Majers, N.C. Amorpha-4,11-diene synthase: Cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin. *Planta* **2001**, *212*, 460-465.
- (65) Wildung, M.R.; Croteau, R. A cDNA clone for taxadiene synthase, the diterpene cyclase that catalyzes the committed step of taxol biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9201-9204.
- (66) Pristic, S.; Xu, M.; Wilderman, P.R.; Peters, R.J. Rice contains two disparate ent-copalyl diphosphate synthases with distinct metabolic functions. *Plant Physiol.* **2004**, *136*, 4228-4236.
- (67) Sung, C.; Shibuya, M.; Sankawa, U.; Ebizuka, Y. Molecular cloning of cDNA encoding human lanosterol synthase. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, *18*, 1459-1461.
- (68) Lin, H.-C.; Chooi, Y.-H.; Dhingra, S.; Xu, W.; Calvo, A.M.; Tang, Y. The fumagillin biosynthetic gene cluster in *Aspergillus fumigatus* encodes a cryptic terpene cyclase involved in the formation of β -trans-bergamotene. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4616-4619.
- (69) Chooi, Y.-H.; Hong, Y.J.; Cacho, R.A.; Tantillo, D.J.; Tang, Y. A cytochrome P450 serves as an unexpected terpene cyclase during fungal meroterpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16805-16808.
- (70) Guo, C.-J.; Knox, B.P.; Chiang, Y.-M.; Lo, H.-C.; Sanchez, J.F.; Lee, K.-H.; Oakley, B.R.; Bruno, K.S.; Wang, C.C. Molecular genetic characterization of a cluster in *A. terreus* for biosynthesis of the meroterpenoid Terretonin. *Org. Lett.* **2012**, *14*, 5684-5687.
- (71) Noike, M.; Ono, Y.; Araki, Y.; Tanio, R.; Higuchi, Y.; Nitta, H.; Hamano, Y.; Toyomasu, T.; Sassa, T.; Kato, N.; Daiiri, T. Molecular breeding of a fungus producing a precursor diterpene suitable for semi-synthesis by dissection of the biosynthetic machinery. *PLoS One* **2012**, *7*, e42090.
- (72) Tsunematsu, Y.; Ishiuchi, K.i.; Hotta, K.; Watanabe, K. Yeast-based genome mining, production and mechanistic studies of the biosynthesis of fungal polyketide and peptide natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 1139-1149.
- (73) Sakai, K.; Kinoshita, H.; Nihira, T. Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2012**, *93*, 2011-2022.
- (74) Wasil, Z.; Pahirulzaman, K.A.; Butts, C.; Simpson, T.J.; Lazarus, C.M.; Cox, R.J. One pathway, many compounds: Heterologous expression of a fungal biosynthetic pathway reveals its intrinsic potential for diversity. *Chemical Science* **2013**, *4*, 3845-3856.
- (75) Tagami, K.; Minami, A.; Fujii, R.; Liu, C.; Tanaka, M.; Gomi, K.; Daiiri, T.; Oikawa, H. Rapid reconstitution of biosynthetic machinery for fungal metabolites in *Aspergillus oryzae*: Total biosynthesis of

aflatrem. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2076-2080.

(76) Chiang, Y.-M.; Oakley, C.E.; Ahuja, M.; Entwistle, R.; Schultz, A.; Chang, S.-L.; Sung, C.T.; Wang, C.C.; Oakley, B.R. An efficient system for heterologous expression of secondary metabolite genes in *Aspergillus nidulans*. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7720–7731.

(77) Nielsen, M.T.; Nielsen, J.B.; Anyaogu, D.C.; Holm, D.K.; Nielsen, K.F.; Larsen, T.O.; Mortensen, U.H. Heterologous reconstitution of the intact geodin gene cluster in *Aspergillus nidulans* through a simple and versatile PCR based approach. *PLoS One* **2013**, *8*, e72871.

(78) Shiomi, K.; Uchida, R.; Inokoshi, J.; Tanaka, H.; Iwai, Y.; Ōmura, S. Andrastins A–C, new protein farnesyltransferase inhibitors, produced by *Penicillium* sp. FO-3929. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 1265-1268.

(79) Ōmura, S.; Inokoshi, J.; Uchida, R.; Shiomi, K.; Masuma, R.; Kawakubo, T.; Tanaka, H.; Iwai, Y.; Kosemura, S.; Yamamura, S. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. I. Producing strain, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 414-417.

(80) Uchida, R.; Shiomi, K.; Inokoshi, J.; Tanaka, H.; Iwai, Y.; Ōmura, S. Andrastin D, novel protein farnesyltransferase inhibitor produced by *Penicillium* sp. FO-3929. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 1278-1280.

(81) Nicoletti, R.; Ciavatta, L.; Buommino, E.; Tufano, M.A. Antitumor extrolites produced by *Penicillium* species. *Int. J. Biomed. Pharm. Sci.* **2008**, *2*, 1-23.

(82) Oliff, A. Farnesyltransferase inhibitors: Targeting the molecular basis of cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1423*, 19-30.

(83) Rho, M.-C.; Toyoshima, M.; Hayashi, M.; Uchida, R.; Shiomi, K.; Komiyama, K.; Ōmura, S. Enhancement of drug accumulation by andrastin A produced by *Penicillium* sp. FO-3929 in vincristine-resistant KB cells. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 68-72.

(84) Okamoto, R.; Takeda, K.; Tokuyama, H.; Ihara, M.; Toyota, M. Toward the total synthesis of (±)-andrastin C. *J. Org. Chem.* **2013**, *78*, 93-103.

(85) Uchida, R.; Shiomi, K.; Inokoshi, J.; Sunazuka, T.; Tanaka, H.; Iwai, Y.; Takayanagi, H.; Omura, S. Andrastins A-C, new protein farnesyltransferase inhibitors produced by *Penicillium* sp. FO-3929. II. Structure elucidation and biosynthesis. *J. Antibiot.* **1996**, *49*, 418-424.

(86) van den Berg, M.; Albang, R.; Albermann, K.; Badger, J.; Daran, J.-M.; Driessen, A.; Garcia-Estrada, C.; Fedorova, N.; Harris, D.; Heijne, W.; Joardar, V.; Kiel, J.; Kovalchuk, A.; Martín, J.; Nierman, W.; Nijland, J.; Pronk, J.; Roubos, J.; van der Klei, I.; van Peij, N.; Veenhuis, M.; von Döhren, H.; Wagner, C.; Wortman, J.; Bovenberg, R. Genome sequencing and analysis of the filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*. *Nat.*

Biotechnol. **2008**, *26*, 1161-1168.

- (87) Jin, F.J.; Maruyama, J.; Juvvadi, P.R.; Arioka, M.; Kitamoto, K. Development of a novel quadruple auxotrophic host transformation system by *argB* gene disruption using *adeA* gene and exploiting adenine auxotrophy in *Aspergillus oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *239*, 79-85.
- (88) Kosemura, S.; Matsunaga, K.; Yamamura, S.; Kubota, M.; Ohba, S. The structures of citreohybridone A and B novel sesterterpenoid-type metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 3543-3546.
- (89) Kosemura, S.; Yamamura, S. Isolation and biosynthetic pathway for citreohybridones from the hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium* species. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 6221-6224.
- (90) Kosemura, S. Structure and absolute configuration of citreohybridones isolated from *Penicillium* species. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 1253-1256.
- (91) Kosemura, S.; Matsunaga, K.; Yamamura, S. Citreohybridones A and B and related terpenoids, new metabolites of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Chem. Lett.* **1991**, *20*, 1811-1814.
- (92) Kosemura, S. Meroterpenoids from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200 hybrid. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 5055-5072.
- (93) Kosemura, S.; Matsuo, S.; Yamamura, S. Citreohybridone C, a meroterpenoid of a hybrid strain KO 0031 derived from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 6200 and 4692. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1231-1234.
- (94) Dalsgaard, P.W.; Petersen, B.O.; Duus, J.Ø.; Zidorn, C.; Frisvad, J.C.; Christophersen, C.; Larsen, T.O. Atlantinone A, a meroterpenoid produced by *Penicillium ribeum* and several cheese associated *Penicillium* species. *Metabolites* **2012**, *2*, 214-220.
- (95) Bok, J.W.; Chiang, Y.-M.; Szewczyk, E.; Reyes-Dominguez, Y.; Davidson, A.D.; Sanchez, J.F.; Lo, H.-C.; Watanabe, K.; Strauss, J.; Oakley, B.R.; Wang, C.C.; Keller, N. Chromatin-level regulation of biosynthetic gene clusters. *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 462-464.
- (96) Nielsen, M.L.; Nielsen, J.B.; Rank, C.; Klejnstrup, M.L.; Holm, D.K.; Brogaard, K.H.; Hansen, B.G.; Frisvad, J.C.; Larsen, T.O.; Mortensen, U.H. A genome - wide polyketide synthase deletion library uncovers novel genetic links to polyketides and meroterpenoids in *Aspergillus nidulans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2011**, *321*, 157-166.
- (97) Ahmed, S.A.; Scott, F.E.; Stenzel, D.J.; Simpson, T.J.; Moore, R.N.; Trimble, L.A.; Arai, K.; Vederas, J.C. Studies on the biosynthesis of the mycotoxin austin, a meroterpenoid metabolite of *Aspergillus ustus*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1989**, 807-816.

- (98) Stierle, D.; Stierle, A.; Patacini, B.; McIntyre, K.; Girtsman, T.; Bolstad, E. Berkeleyones and related meroterpenes from a deep water acid mine waste fungus that inhibit the production of interleukin 1- β from induced inflammasomes. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 2273-2277.
- (99) Geris dos Santos, R.M.; Rodrigues-Fo, E. Meroterpenes from *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. *Phytochemistry* **2002**, *61*, 907-912.
- (100) Fill, T.P.; Pereira, G.K.; Geris dos Santos, R.M.; Rodrigues-Fo, E. Four additional meroterpenes produced by *Penicillium* sp found in association with *Melia azedarach*. Possible biosynthetic intermediates to austin. *Z. Naturforsch.* **2007**, *62*, 1035-1044.
- (101) Geris dos Santos, R.M.; Rodrigues-Fo, E. Further meroterpenes produced by *Penicillium* sp., an endophyte obtained from *Melia azedarach*. *Z. Naturforsch.* **2003**, *58*, 663-669.
- (102) Jansen, G.A.; Mihalik, S.J.; Watkins, P.A.; Jakobs, C.; Moser, H.W.; Wanders, R.J. Characterization of phytanoyl-Coenzyme A hydroxylase in human liver and activity measurements in patients with peroxisomal disorders. *Clin. Chim. Acta* **1998**, *271*, 203-211.
- (103) Myllyharju, J. Prolyl 4-hydroxylases, the key enzymes of collagen biosynthesis. *Matrix Biol.* **2003**, *22*, 15-24.
- (104) Tsukada, Y.-i.; Fang, J.; Erdjument-Bromage, H.; Warren, M.E.; Borchers, C.H.; Tempst, P.; Zhang, Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **2006**, *439*, 811-816.
- (105) Jansen, G.A.; Oftnan, R.; Ferdinandusse, S.; Ijlst, L.; Muijsers, A.O.; Skjeldal, O.H.; Stokke, O.; Jakobs, C.; Besley, G.T.; Wraith, J.E.; Wanders, R.J. Refsum disease is caused by mutations in the phytanoyl-CoA hydroxylase gene. *Nat. Genet.* **1997**, *17*, 190-193.
- (106) Bollinger, J.M.; Price, J.C.; Hoffart, L.M.; Barr, E.W.; Krebs, C. Mechanism of taurine: α -ketoglutarate dioxygenase (TauD) from *Escherichia coli*. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2005**, *2005*, 4245-4254.
- (107) Kovaleva, E.G.; Lipscomb, J.D. Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions. *Nat. Chem. Biol.* **2008**, *4*, 186-193.
- (108) Halsall, T.; Jones, E.R.; Tan, E.; Chaudhry, G. The chemistry of triterpenes and related compounds. Part XLV. The acid-catalysed rearrangements of the 5 α , 6 α -diols and 5, 6-epoxides of some 4, 4-dimethylsteroids. *J. Chem. Soc. C* **1966**, 1374-1383.
- (109) Maione, A.M.; Torrini, I.; Romeo, A. Acid-catalysed ring contraction of steroidal 4 β ,5 β -epoxy-1-en-3-ones. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 775-776.
- (110) Cox, R.J. Oxidative rearrangements during fungal biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1405-1424.
- (111) Zhou, J.; Kelly, W.L.; Bachmann, B.O.; Gunsior, M.; Townsend, C.A.; Solomon, E.I. Spectroscopic

studies of substrate interactions with clavamate synthase 2, a multifunctional α -KG-dependent non-heme iron enzyme: Correlation with mechanisms and reactivities. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 7388-7398.

(112) Simpson, T.J. Studies on fungal metabolites. Part 1. The structures of andibenins-A and-C, and andilesins-A,-B, and-C, meroterpenoids from *Aspergillus variegator*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1979**, 2118-2121.

(113) Foyere Ayafor, J.; Kimbu, S.F.; Ngadjui, B.T.; Akam, T.M.; Dongo, E.; Sondengam, B.L.; Connolly, J.D.; Rycroft, D.S. Limonoids from *Carapa grandiflora* (meliaceae). *Tetrahedron* **1994**, *50*, 9343-9354.

(114) Dunn, A.W.; Johnstone, R.A.W.; Sklarz, B.; Lessinger, L.; King, T.J. Andilesin, a C₂₅ polyisoprenoid from *Aspergillus* sp. X-ray crystallographic and spectroscopic determination of structure. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 533-534.

(115) Liangsakul, J.; Pornpakakul, S.; Sangvichien, E.; Muangsins, N.; Sihanonth, P. Emervaridione and varioxiranediol, two new metabolites from the endophytic fungus, *Emericella variegator*. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 6427-6430.

(116) Holker, J.S.E.; Simpson, T.J. Biosynthesis of andibenin, a novel polyketide-terpenoid metabolite of *Aspergillus variegator*. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1978**, 626-627.

(117) Simpson, T.J. Biosynthesis of highly modified meroterpenoids in *Aspergillus variegator*. Incorporation of ¹³C-labelled acetates and methionine into anditomin and andilesin C. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 3785-3788.

(118) Bartlett, A.J.; Holker, J.S.; O'Brien, E.; Simpson, T.J. Biosynthesis of the meroterpenoid metabolite, andibenin B: Aromatic precursors. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1981**, 1198-1200.

(119) Simpson, T.J.; Ahmed, S.A.; McIntyre, C.R.; Scott, F.E.; Sadler, I.H. Biosynthesis of polyketide-terpenoid (meroterpenoid) metabolites andibenin B and andilesin A in *Aspergillus variegator*. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 4013-4034.

(120) Kim, H.J.; Rusczycky, M.W.; Liu, H.-w. Current developments and challenges in the search for a naturally selected Diels-Alderase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2012**, *16*, 124-131.

(121) Hansen, B.G.; Mnich, E.; Nielsen, K.F.; Nielsen, J.B.; Nielsen, M.T.; Mortensen, U.H.; Larsen, T.O.; Patil, K.R. Involvement of a natural fusion of a cytochrome P450 and a hydrolase in mycophenolic acid biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 4908-4913.

(122) Tsunematsu, Y.; Ichinoseki, S.; Nakazawa, T.; Ishikawa, N.; Noguchi, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. Overexpressing transcriptional regulator in *Chaetomium globosum* activates a silent biosynthetic pathway: Evaluation of shanorellin biosynthesis. *J. Antibiot.* **2012**, *65*, 377-380.

(123) Steffan, N.; Grundmann, A.; Afiyatullof, S.; Ruan, H.; Li, S.-M. FtmOx1, a non-heme Fe(II) and

α -ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 4082-4087.

(124) Kato, N.; Suzuki, H.; Takagi, H.; Uramoto, M.; Takahashi, S.; Osada, H. Gene disruption and biochemical characterization of verruculogen synthase of *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 711-714.

(125) Nicholson, M.J.; Koulman, A.; Monahan, B.J.; Pritchard, B.L.; Payne, G.A.; Scott, B. Identification of two aflatoxin biosynthesis gene loci in *Aspergillus flavus* and metabolic engineering of *Penicillium paxilli* to elucidate their function. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 7469-7481.

(126) Cohen, E.; Koch, L.; Thu, K.M.; Rahamim, Y.; Aluma, Y.; Ilan, M.; Yarden, O.; Carmeli, S. Novel terpenoids of the fungus *Aspergillus insuetus* isolated from the Mediterranean sponge *Psammocinia* sp. collected along the coast of Israel. *Biorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 6587-6593.

(127) Spangler, J.E.; Sorensen, E.J. A nature-inspired Diels–Alder reaction facilitates construction of the bicyclo[2.2.2]octane core of andibenin B. *Tetrahedron* **2009**, *65*, 6739-6745.

(128) Kanchanabancha, C.; Tao, W.; Hong, H.; Liu, Y.; Hahn, F.; Samborsky, M.; Deng, Z.; Sun, Y.; Leadlay, P.F. Unusual acetylation–elimination in the formation of tetronate antibiotics. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 5785–5788.

(129) Wu, L.-F.; He, H.-Y.; Pan, H.-X.; Han, L.; Wang, R.; Tang, G.-L. Characterization of QmnD3/QmnD4 for double bond formation in quartromicin biosynthesis. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 1578-1581.

(130) Grothe, T.; Lenz, R.; Kutchan, T.M. Molecular characterization of the salutaridinol 7-*O*-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 30717-30723.

(131) Fisinger, U.; Grobe, N.; Zenk, M.H. Thebaine synthase: A new enzyme in the morphine pathway in *Papaver somniferum*. *Nat. Prod. Commun.* **2007**, *2*, 249-253.

(132) Matsuda, Y.; Iwabuchi, T.; Wakimoto, T.; Awakawa, T.; Abe, I. Uncovering the unusual D-ring construction in terretonin biosynthesis by collaboration of a multifunctional cytochrome P450 and a unique isomerase. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 3393–3401.

(133) Fernández-Bodega, M.; Mauriz, E.; Gómez, A.; Martín, J. Proteolytic activity, mycotoxins and andrastin A in *Penicillium roqueforti* strains isolated from Cabrales, Valdeón and Bejes–Tresviso local varieties of blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* **2009**, *136*, 18-25.

(134) Chooi, Y.-H.; Cacho, R.; Tang, Y. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 483-494.

(135) Fujii, T.; Yamaoka, H.; Gomi, K.; Kitamoto, K.; Kumagai, C. Cloning and nucleotide sequence of the

ribonuclease T1 gene (*rntA*) from *Aspergillus oryzae* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1869-1874.

(136) Yamada, O.; Na Nan, S.; Akao, T.; Tominaga, M.; Watanabe, H.; Satoh, T.; Enei, H.; Akita, O. *dffA* Gene from *Aspergillus oryzae* encodes L-ornithine N^5 -oxygenase and is indispensable for deferriferrichrysin biosynthesis. *J. Biosci. Bioeng.* **2003**, *95*, 82-88.

(137) Yamada, O.; Lee, B.R.; Gomi, K.; Iimura, Y. Cloning and functional analysis of the *Aspergillus oryzae* conidiation regulator gene *brlA* by its disruption and misscheduled expression. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *87*, 424-429.

(138) Jin, F.; Maruyama, J.; Juvvadi, P.; Arioka, M.; Kitamoto, K. Adenine auxotrophic mutants of *Aspergillus oryzae*: Development of a novel transformation system with triple auxotrophic hosts. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 656-662.

(139) Kubodera, T.; Yamashita, N.; Nishimura, A. Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: Cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 1416-1421.

(140) Inoue, H.; Nojima, H.; Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **1990**, *96*, 23-28.

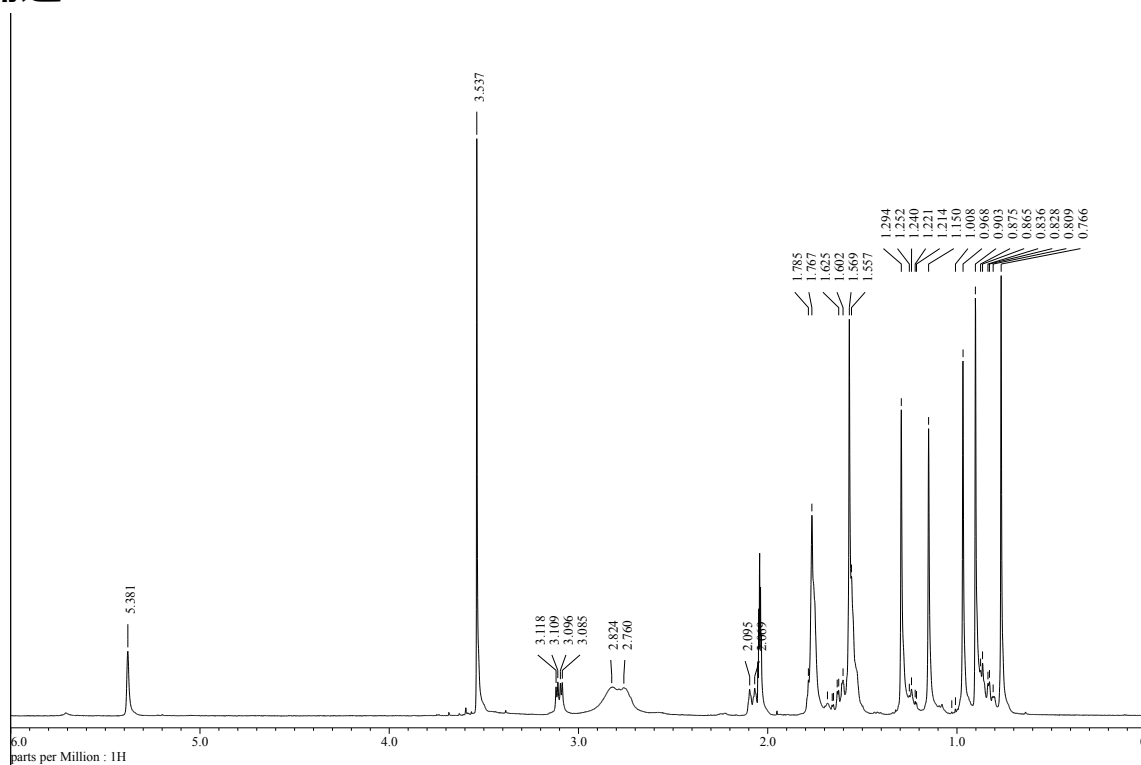
(141) Gomi, K.; Iimura, Y.; Hara, S. Integrative transformation of *Aspergillus oryzae* with a plasmid containing the *Aspergillus nidulans argB* gene. *Agric. Biol. Chem.* **1987**, *51*, 2549-2555.

(142) Zerbino, D.R.; Birney, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res.* **2008**, *18*, 821-829.

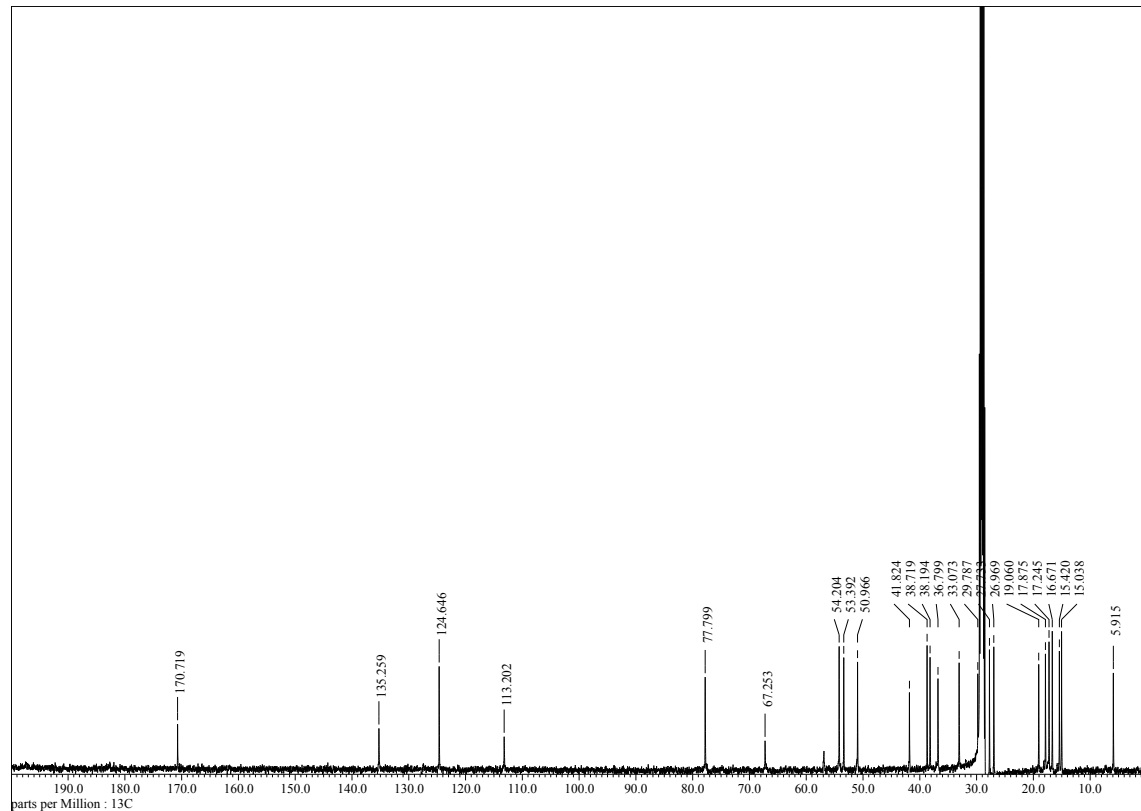
(143) Stanke, M.; Schöffmann, O.; Morgenstern, B.; Waack, S. Gene prediction in eukaryotes with a generalized hidden Markov model that uses hints from external sources. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 62.

(144) Pall, M.L.; Brunelli, J. A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites. *Fungal Genet. Newsl.* **1993**, *40*, 59-62.

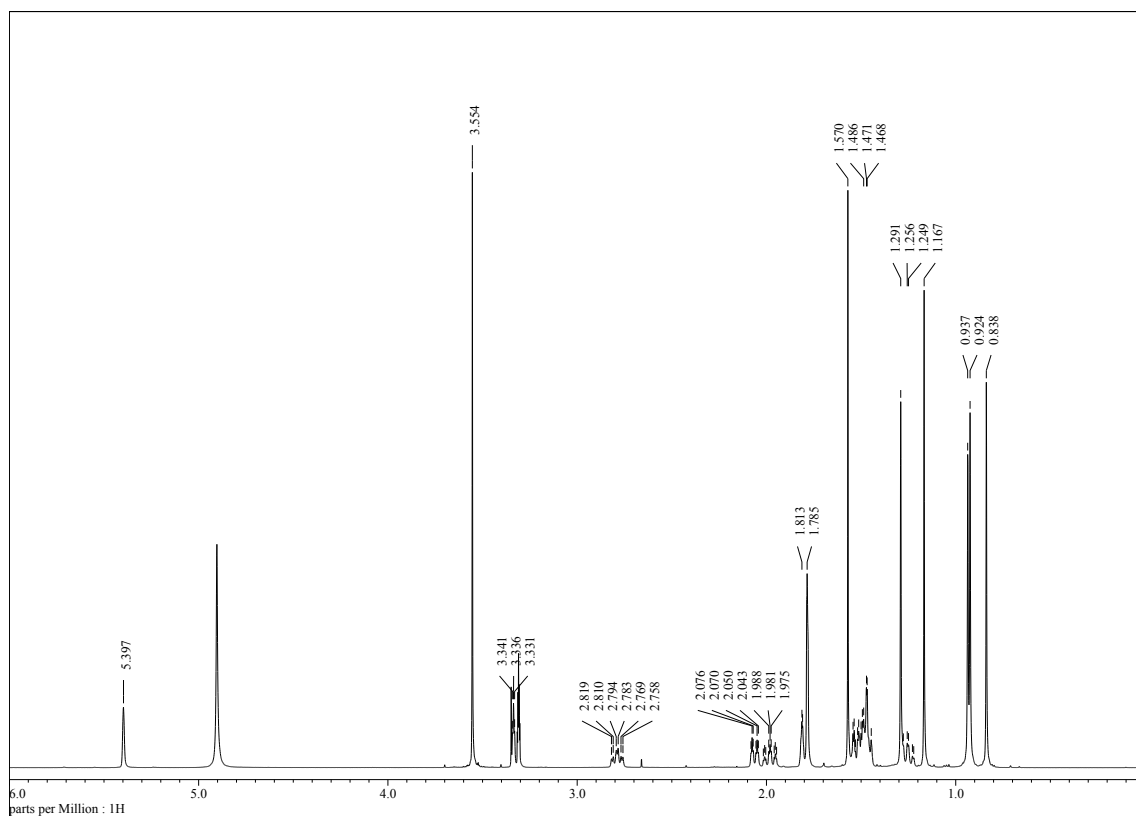
補遺



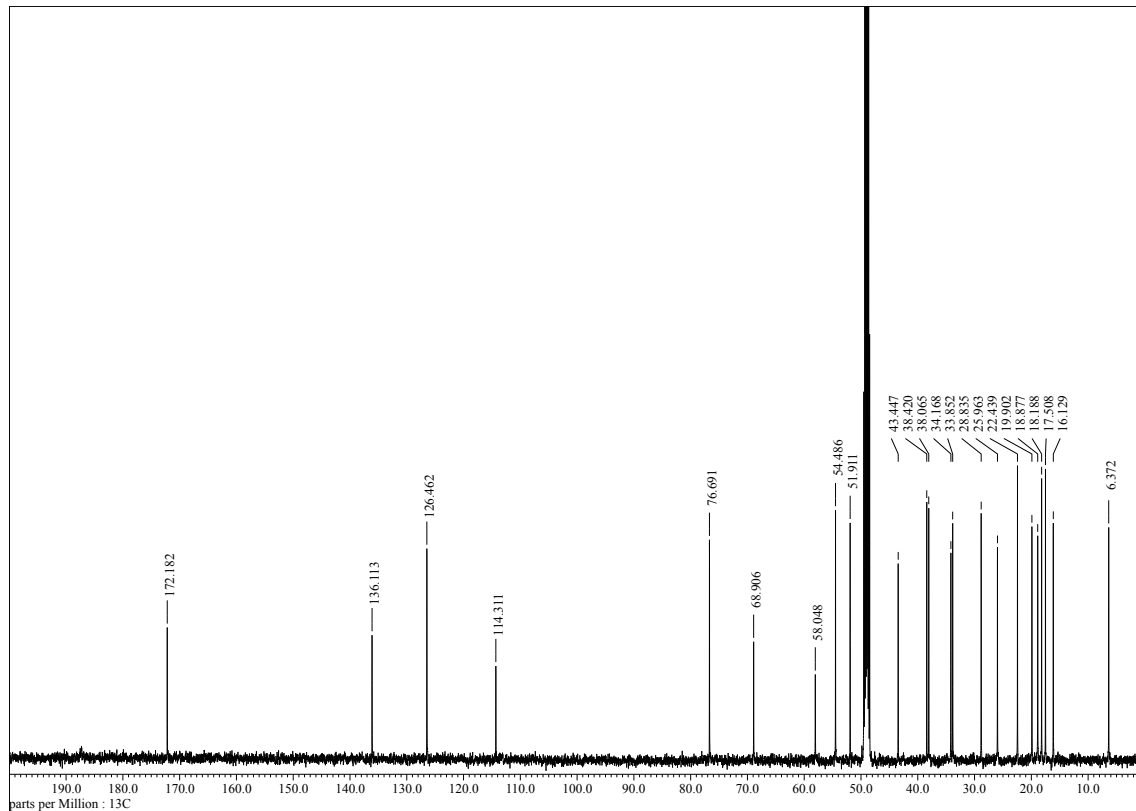
¹H NMR spectrum of andrastin E (7)



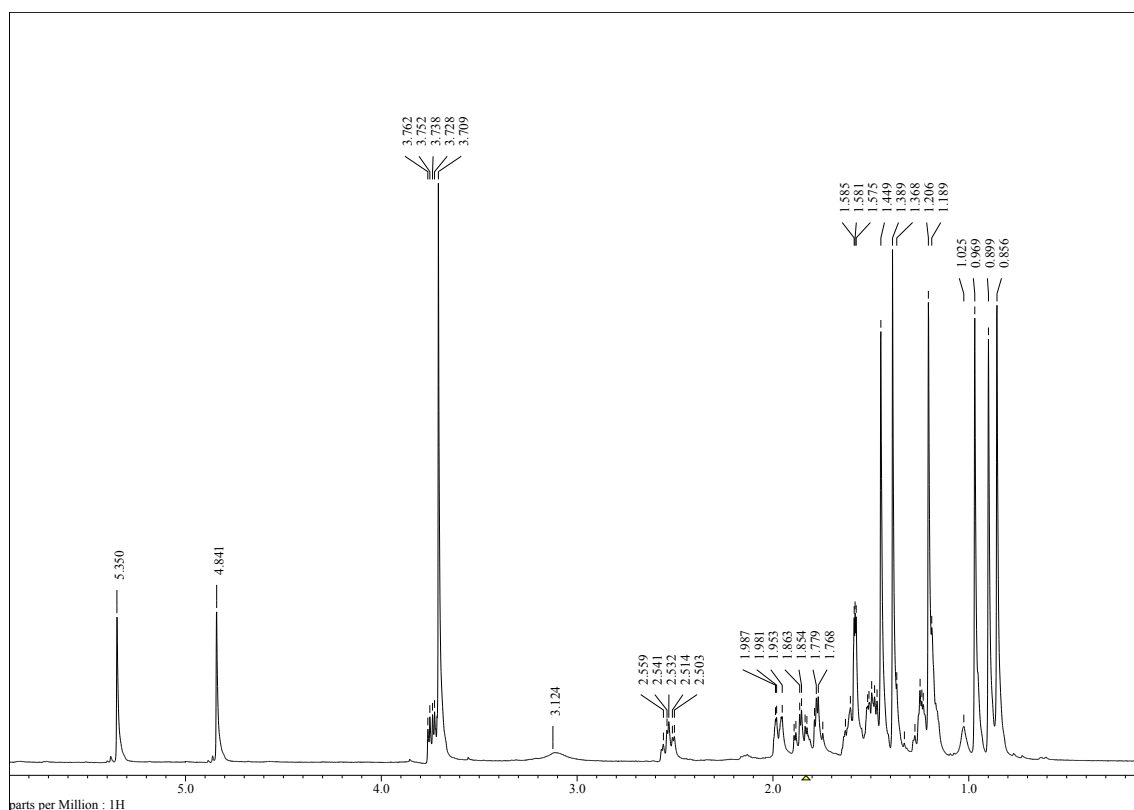
¹³C NMR spectrum of andrastin E (7)



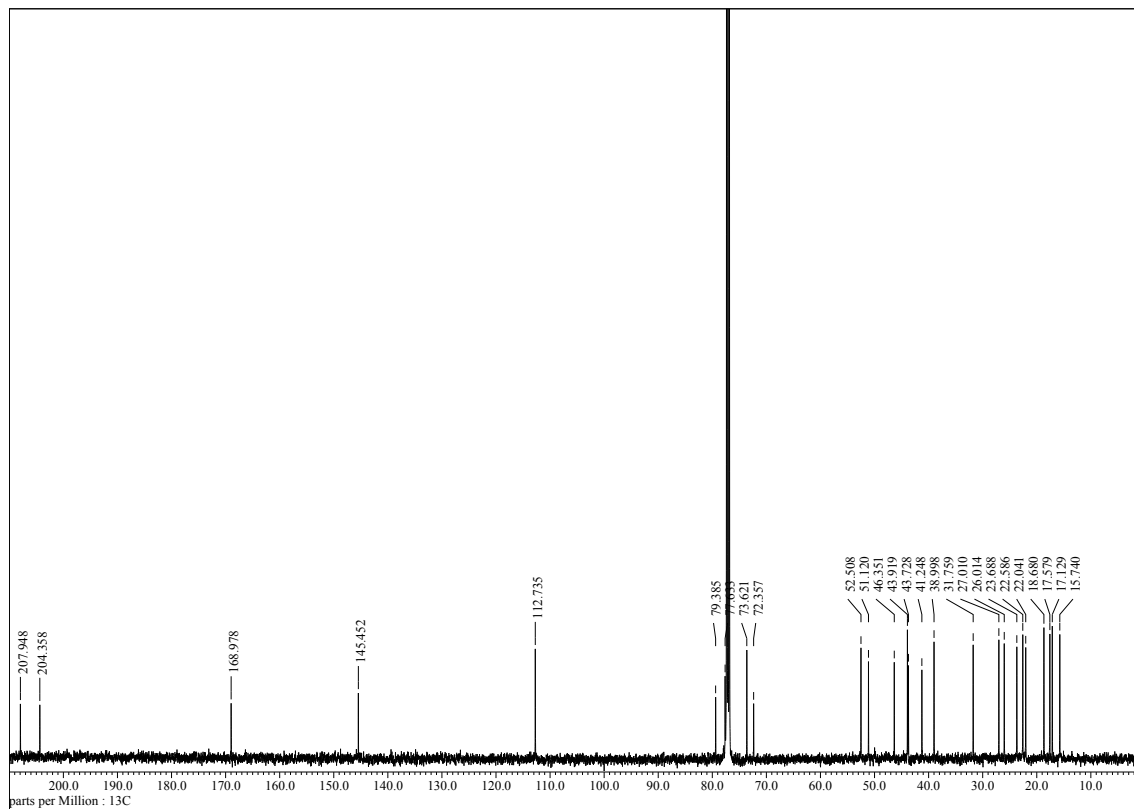
¹H NMR spectrum of andrastin F (**8**)



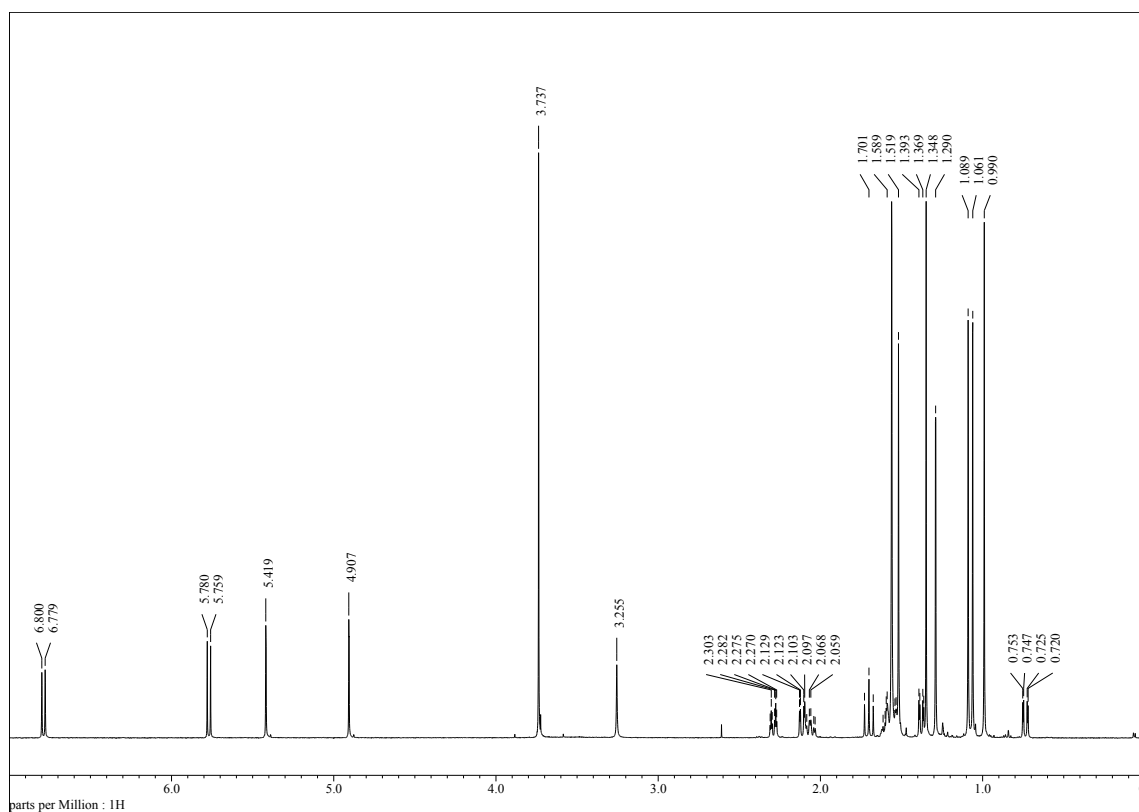
¹³C NMR spectrum of andrastin F (**8**)



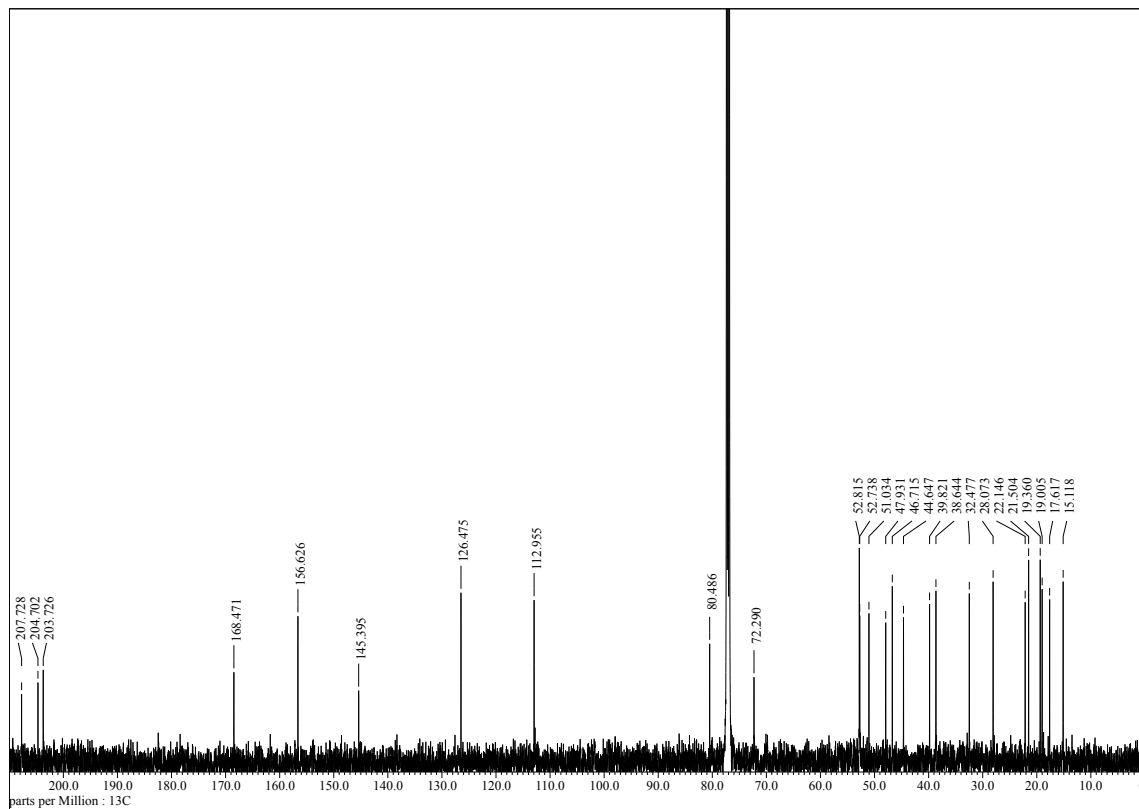
¹H NMR spectrum of 5-hydroxyberkeleyone A (18)



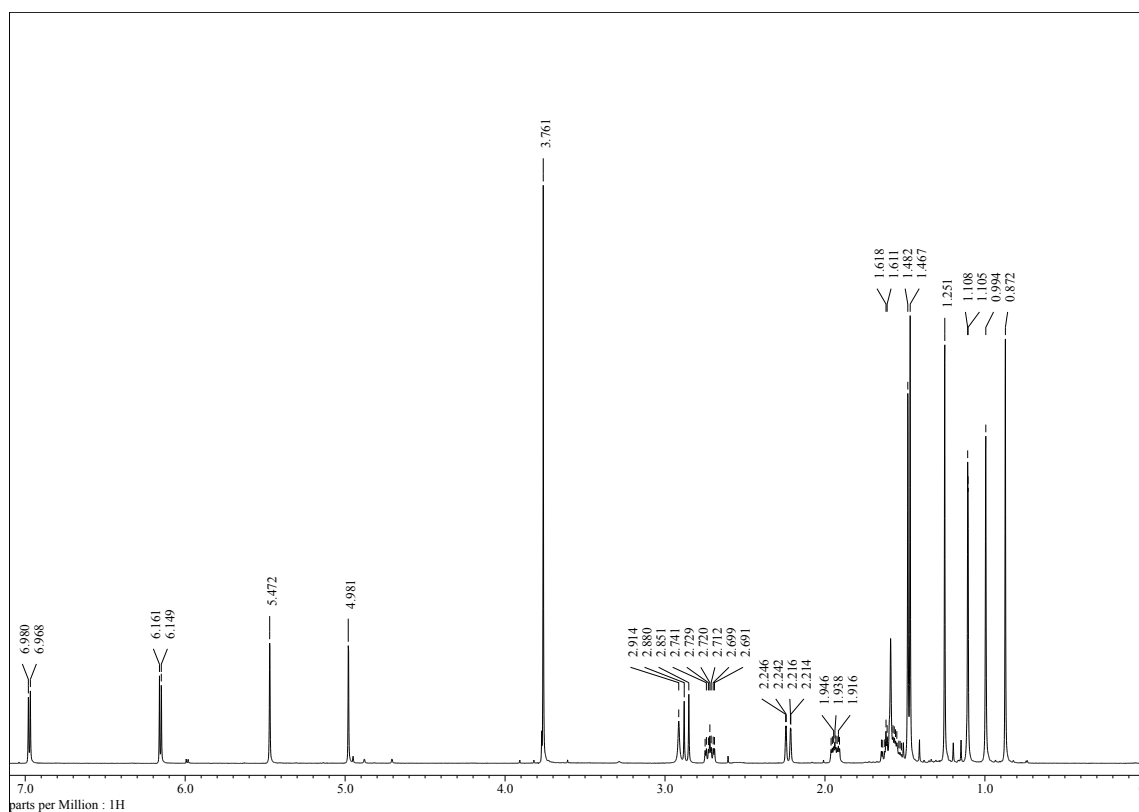
¹³C NMR spectrum of 5-hydroxyberkeleyone A (18)



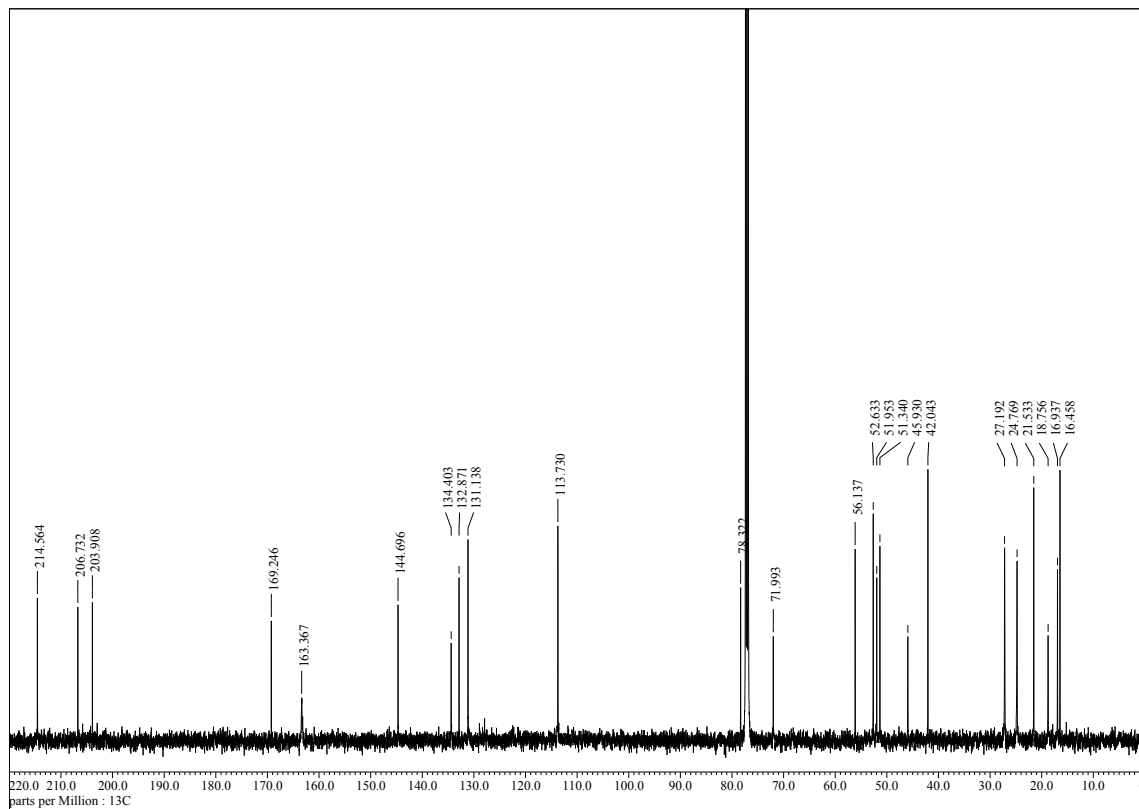
¹H NMR spectrum of preaustinoid C (19)



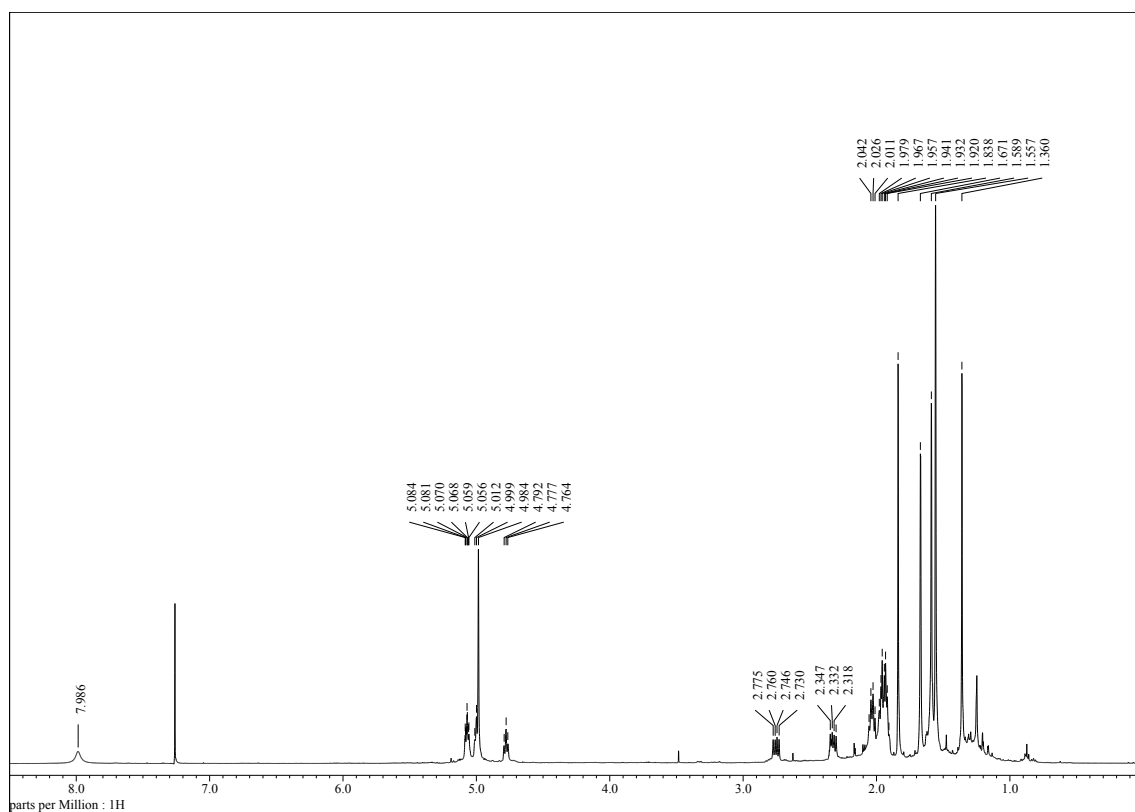
¹³C NMR spectrum of preaustinoid C (19)



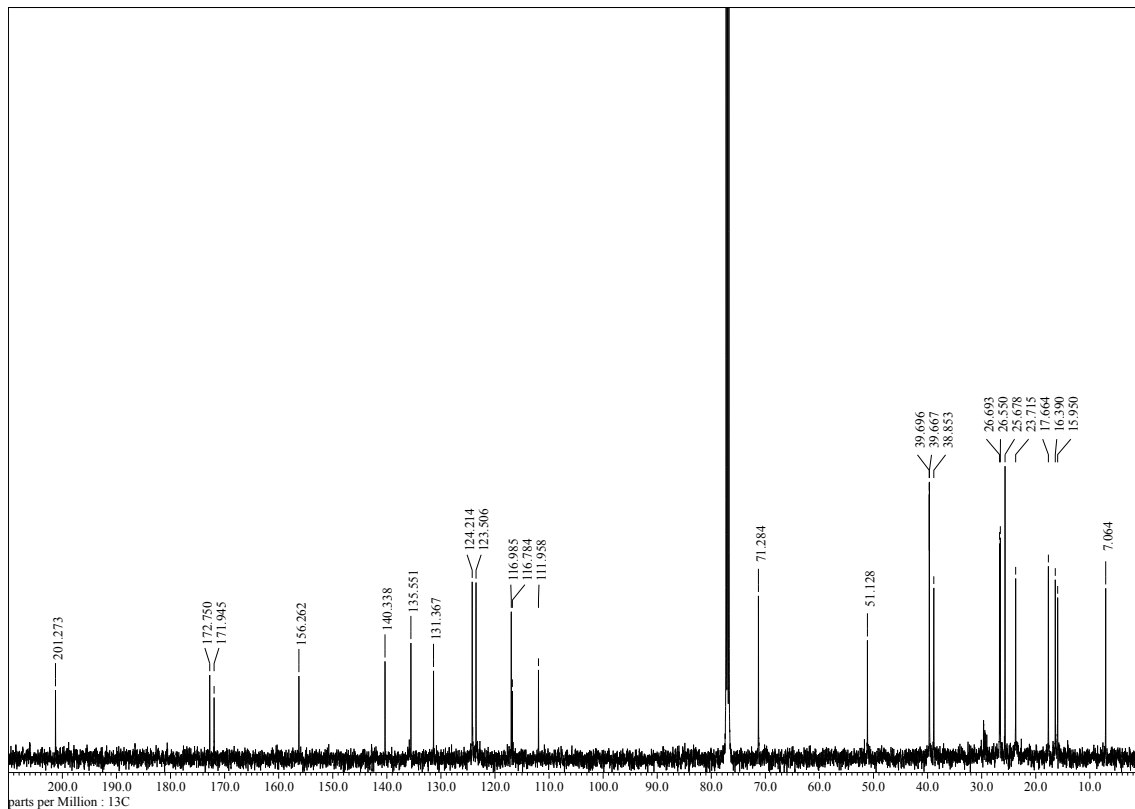
¹H NMR spectrum of austinoid C (20)



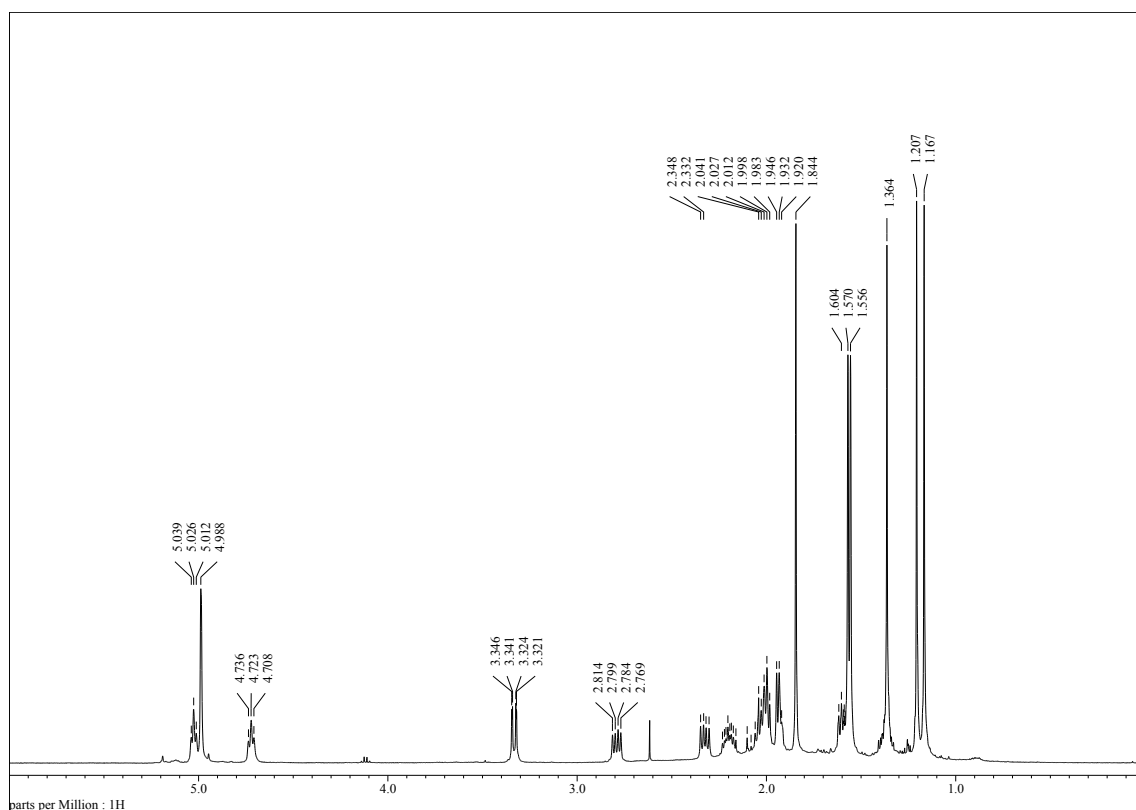
¹³C NMR spectrum of austinoid C (20)



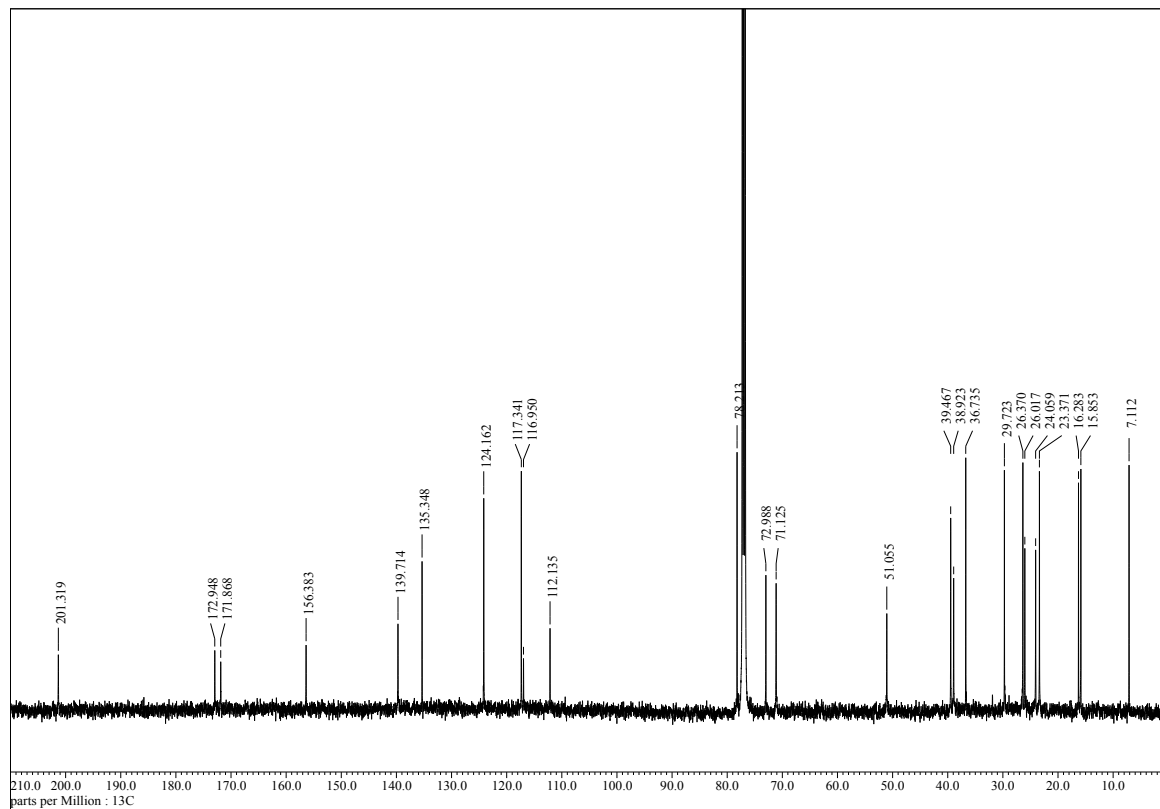
¹H NMR spectrum of farnesyl-DHDMP (27)



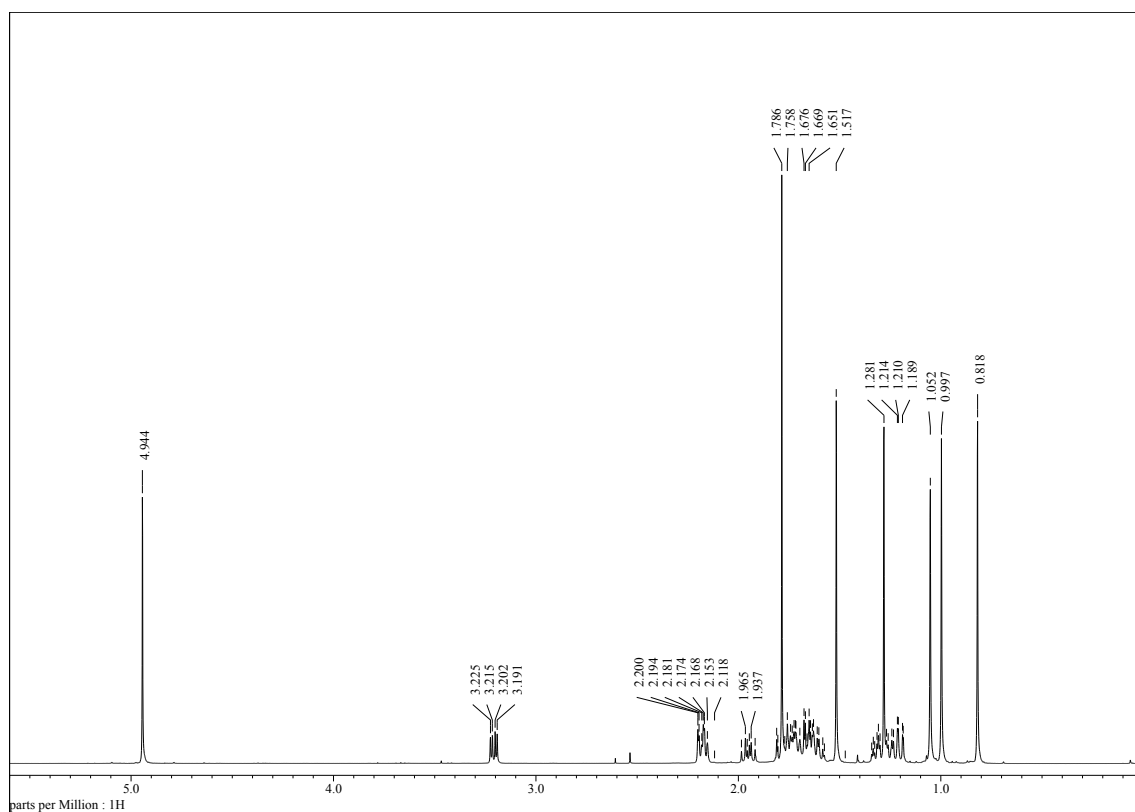
¹³C NMR spectrum of farnesyl-DHDMP (27)



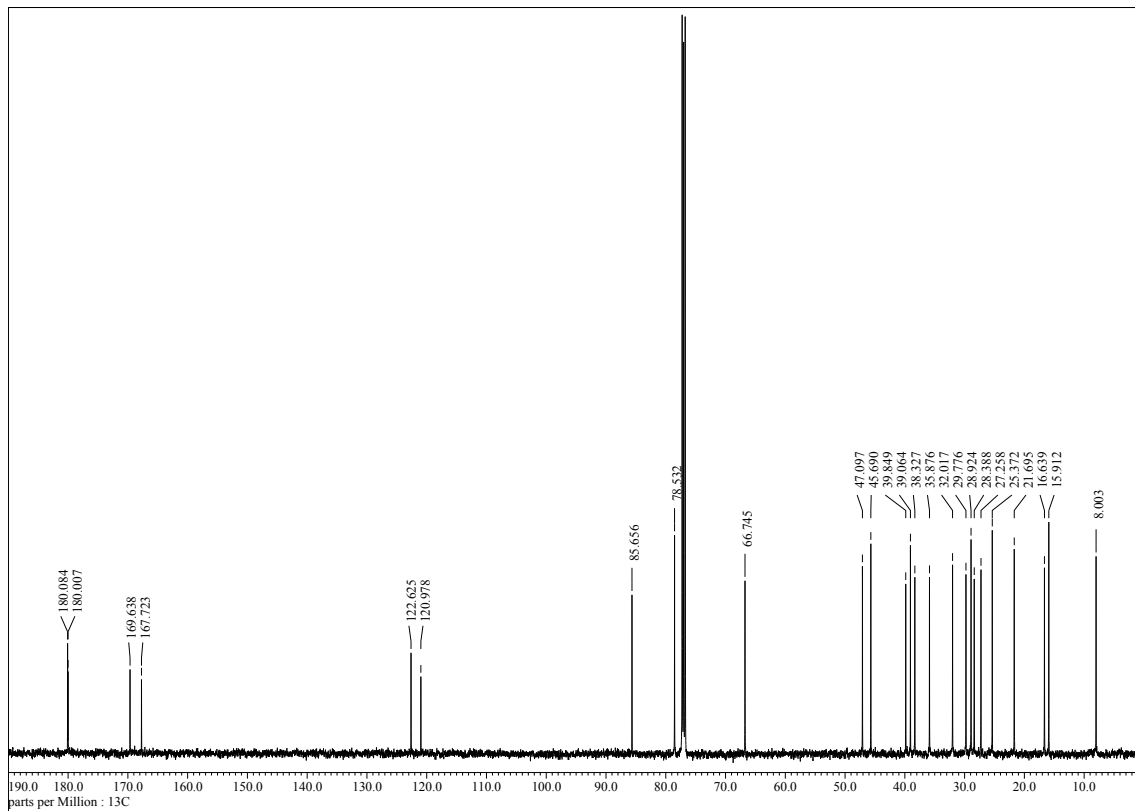
¹H NMR spectrum of dihydroxyfarnesyl-DHDMP (28')



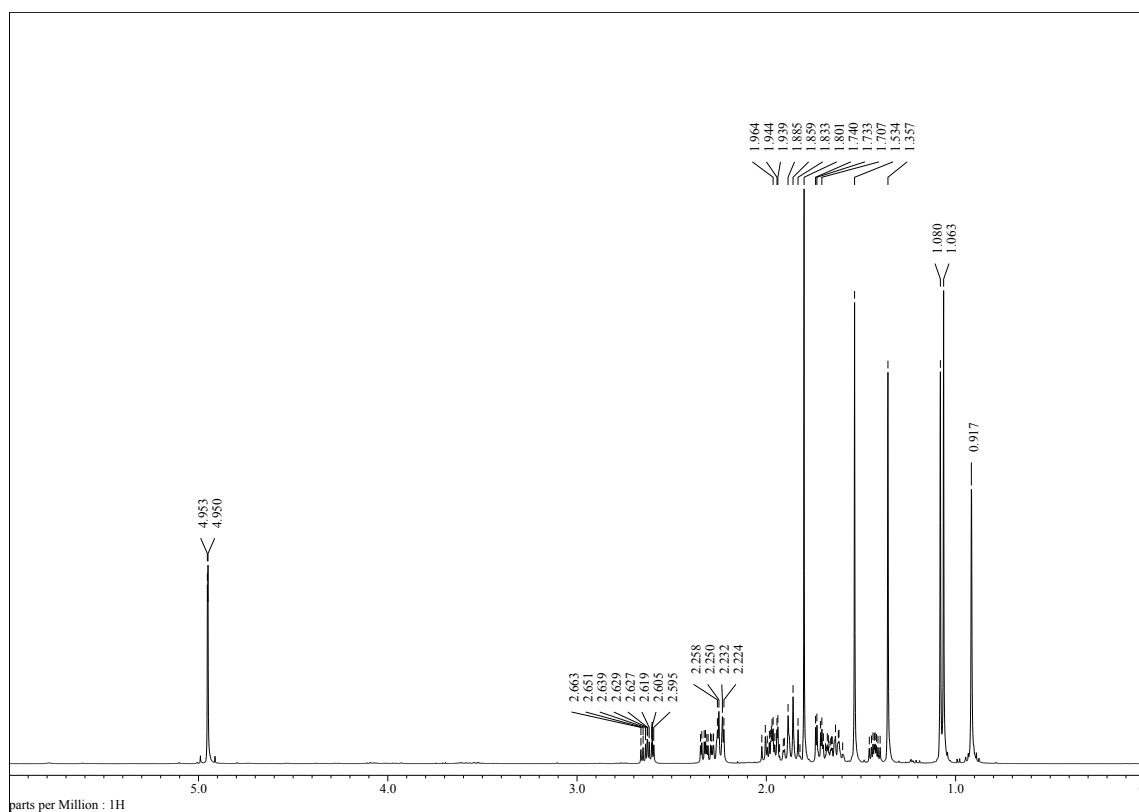
¹³C NMR spectrum of dihydroxyfarnesyl-DHDMP (28')



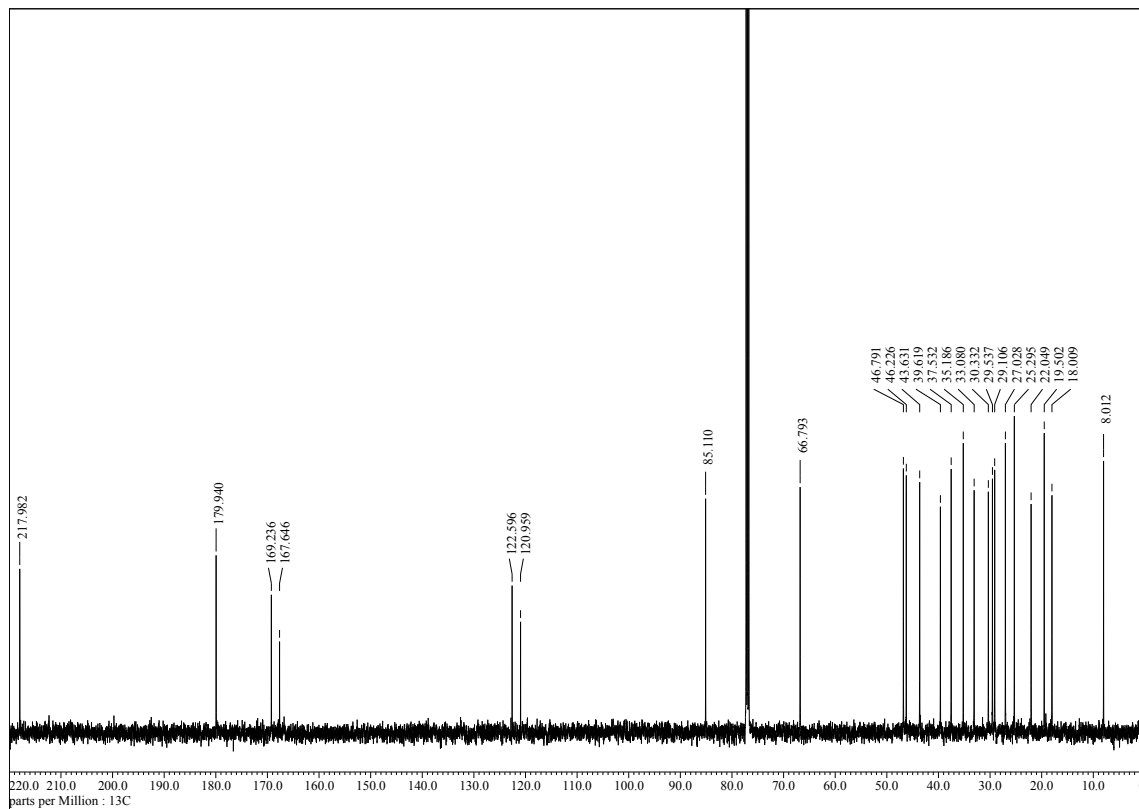
¹H NMR spectrum of preandiloid A (29)



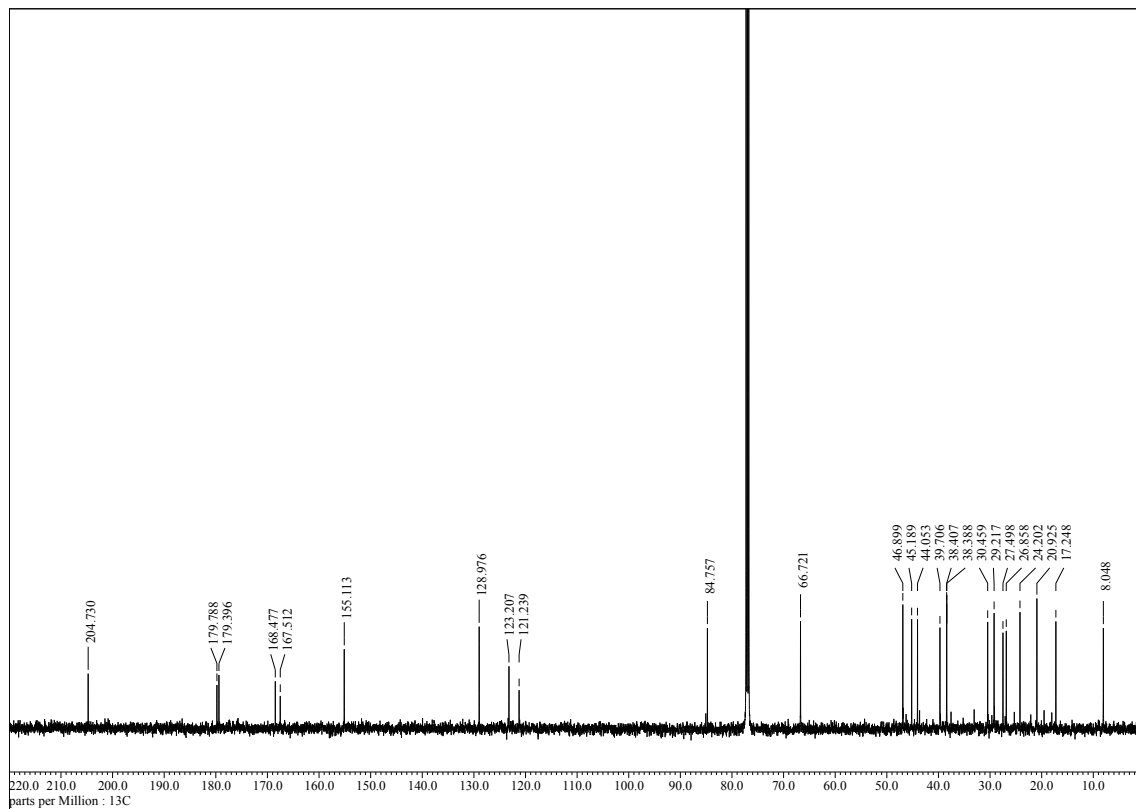
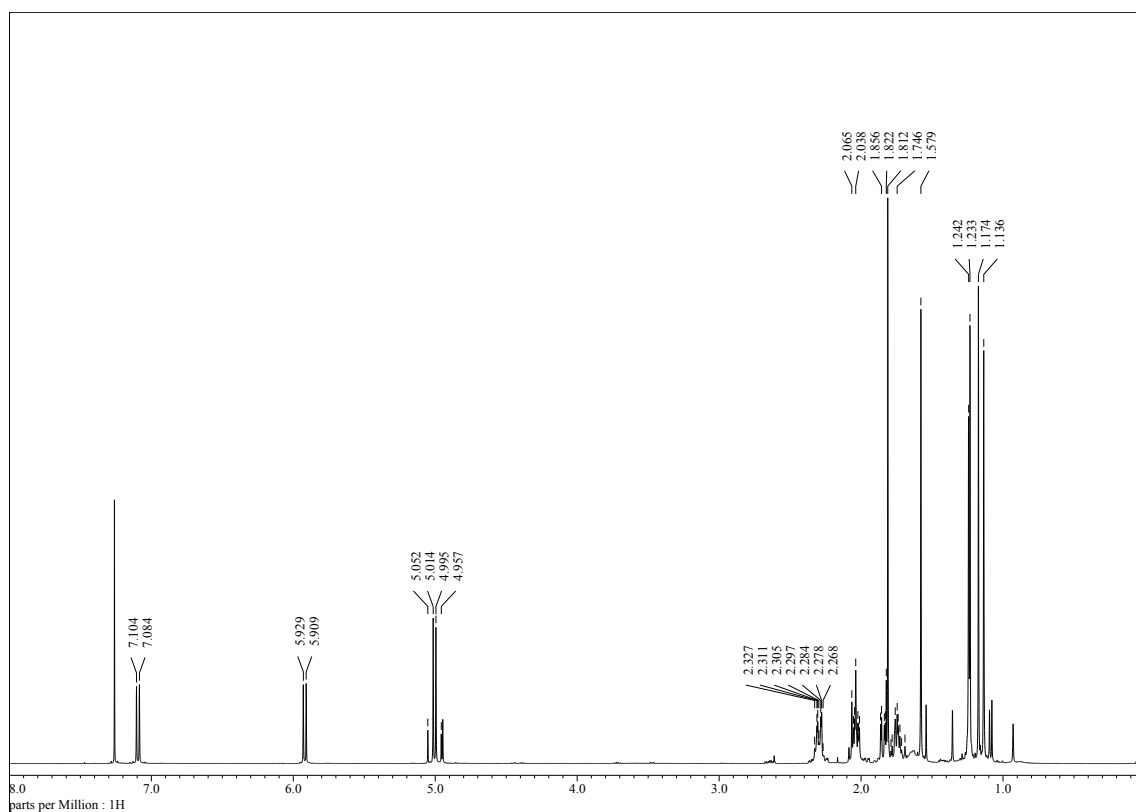
¹³C NMR spectrum of preandiloid A (29)

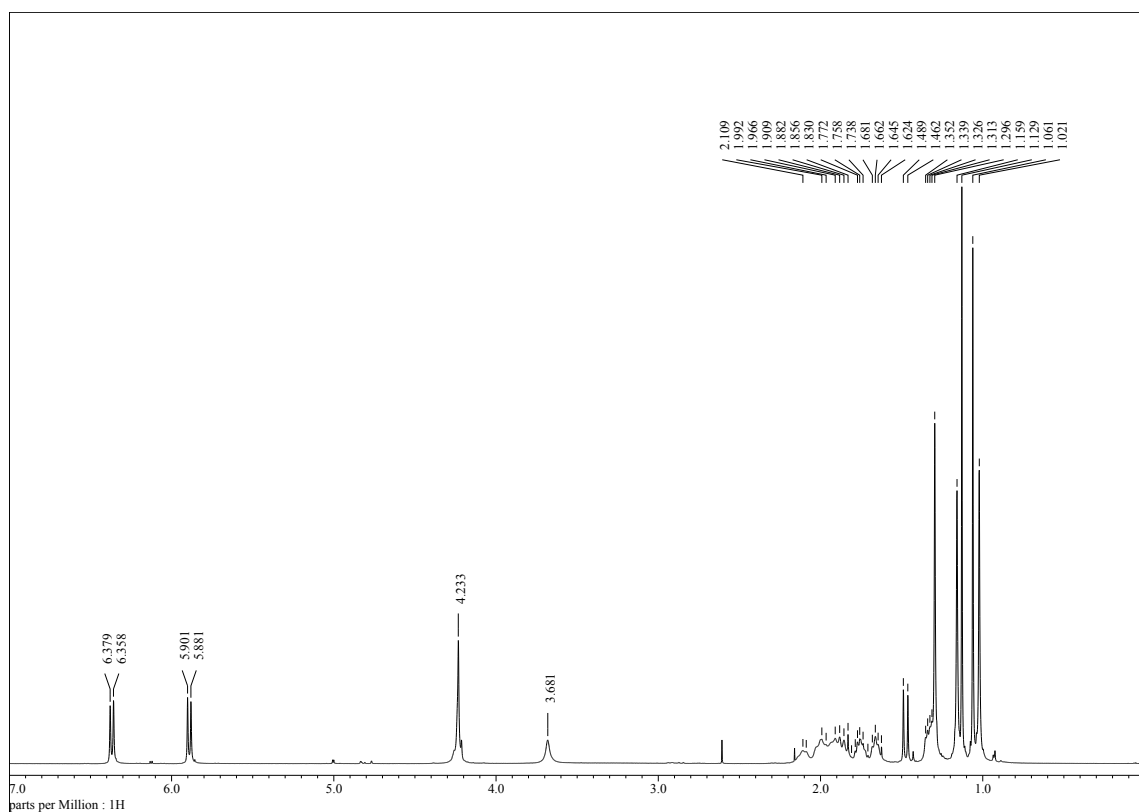


¹H NMR spectrum of preandiloid B (**30**)

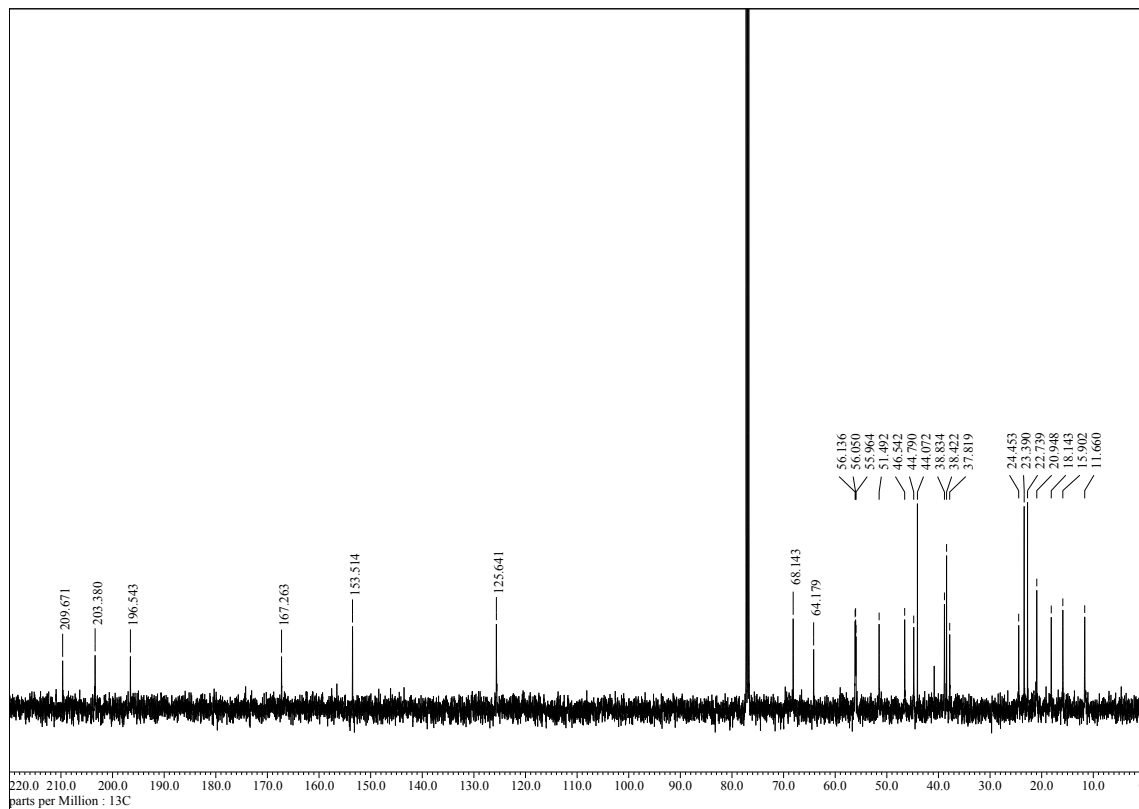


¹³C NMR spectrum of preandiloid B (**30**)

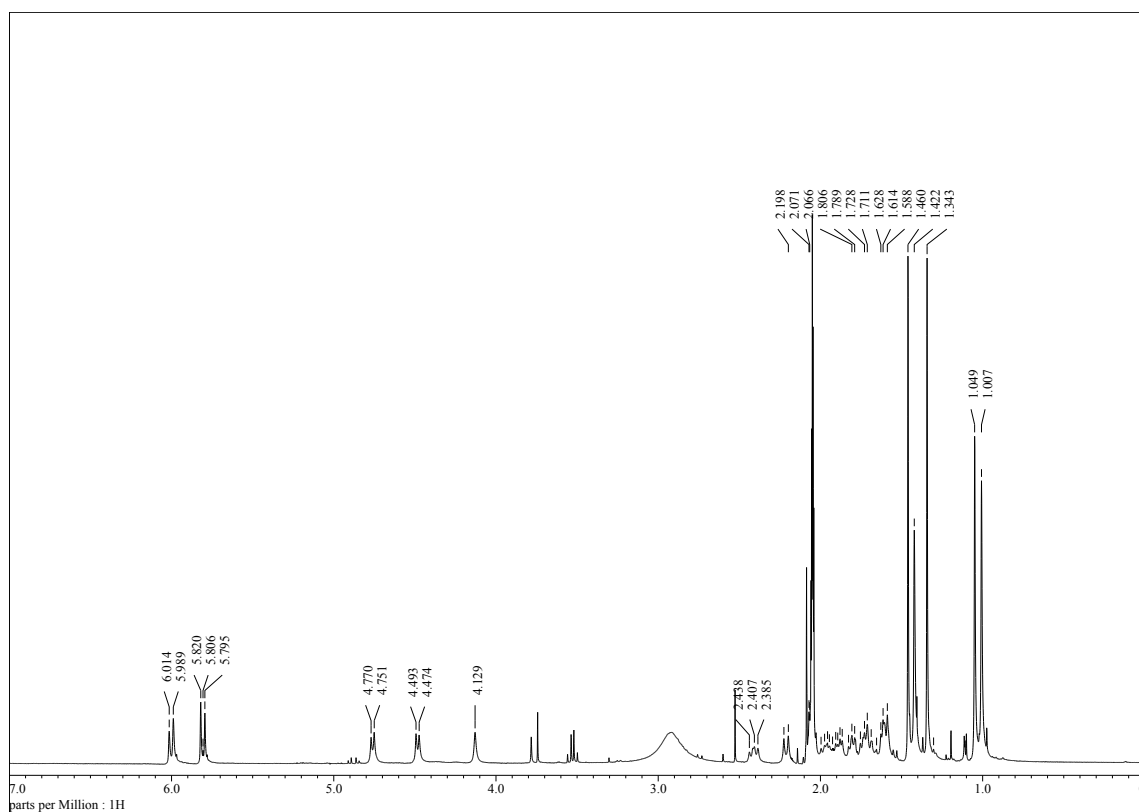




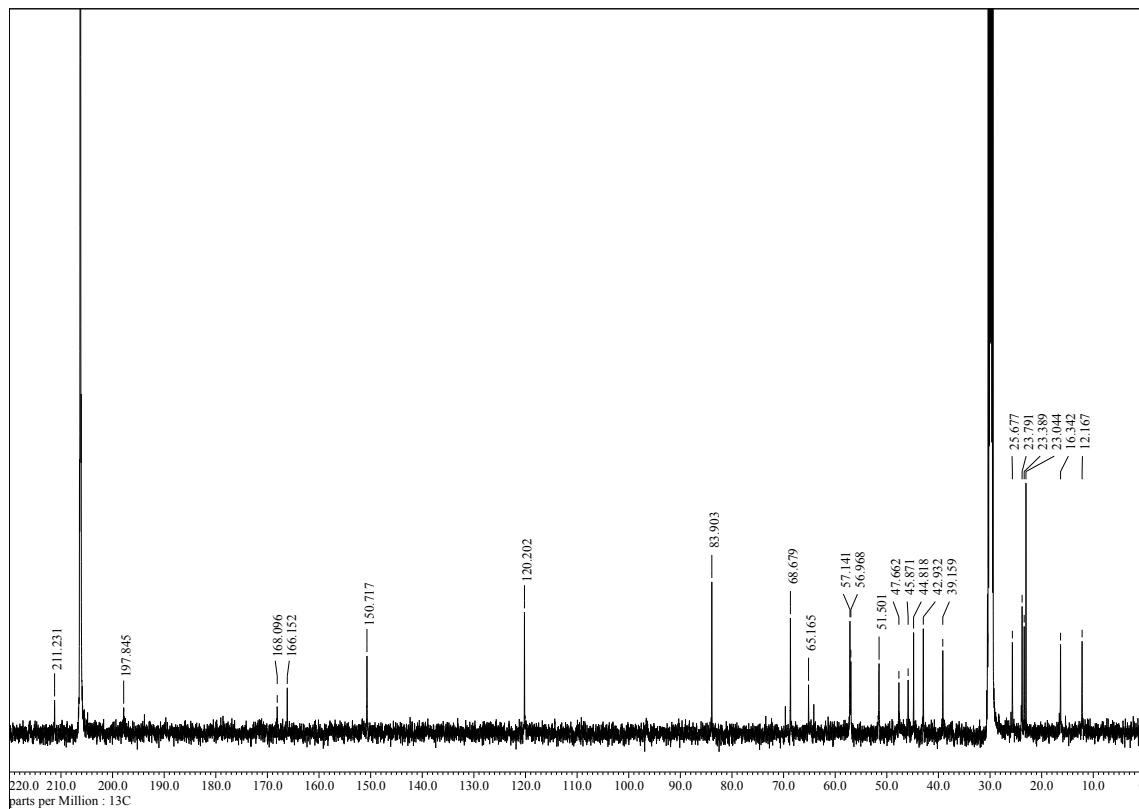
¹H NMR spectrum of andiconin (**32**)



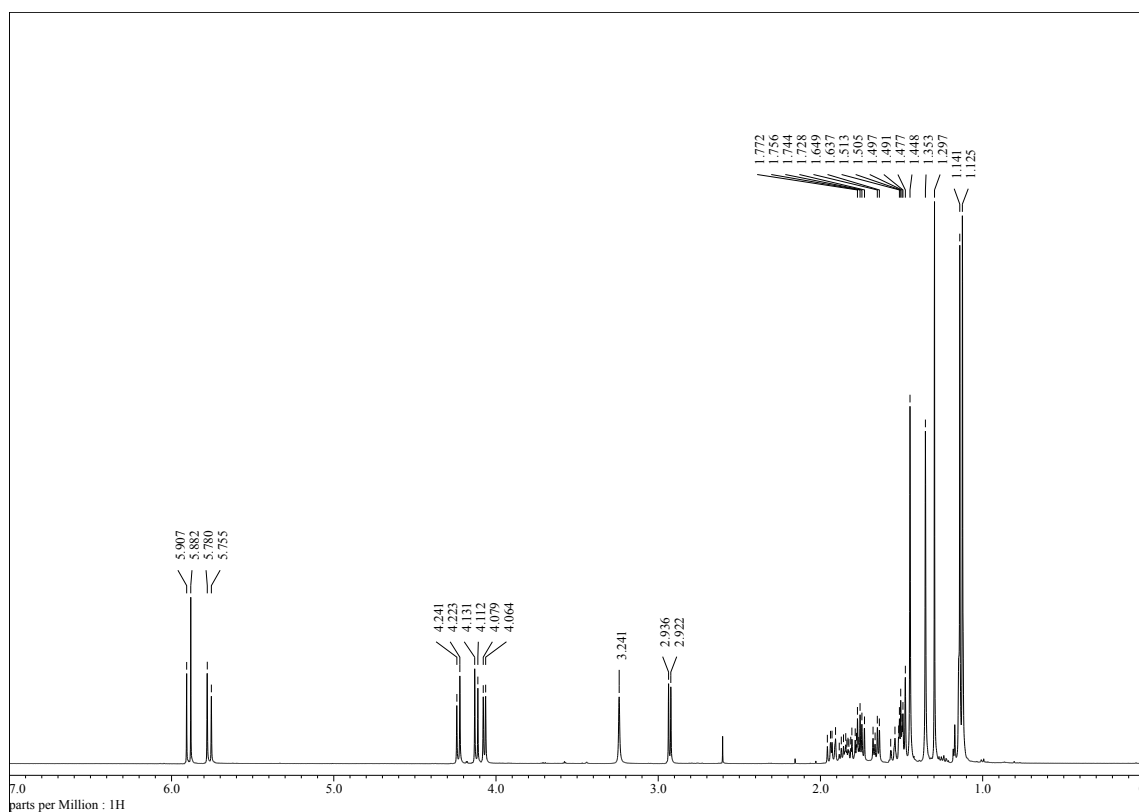
¹³C NMR spectrum of andiconin (**32**)



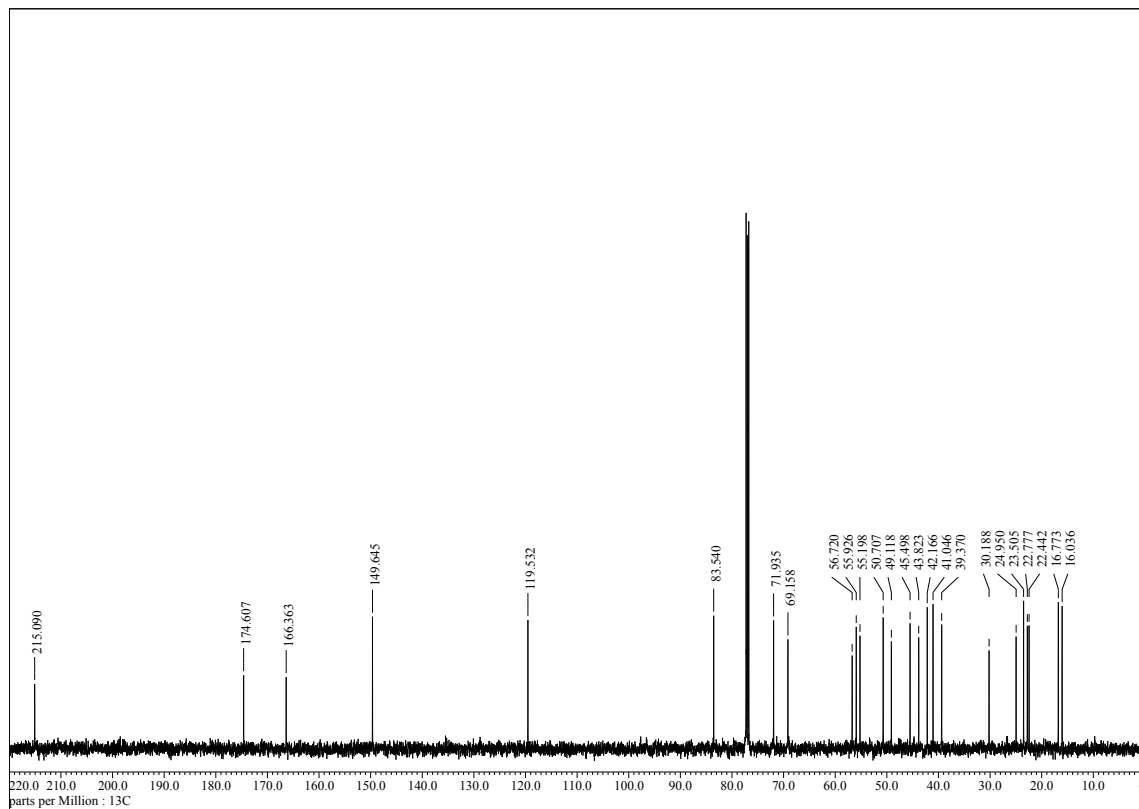
¹H NMR spectrum of andilesin D (33)



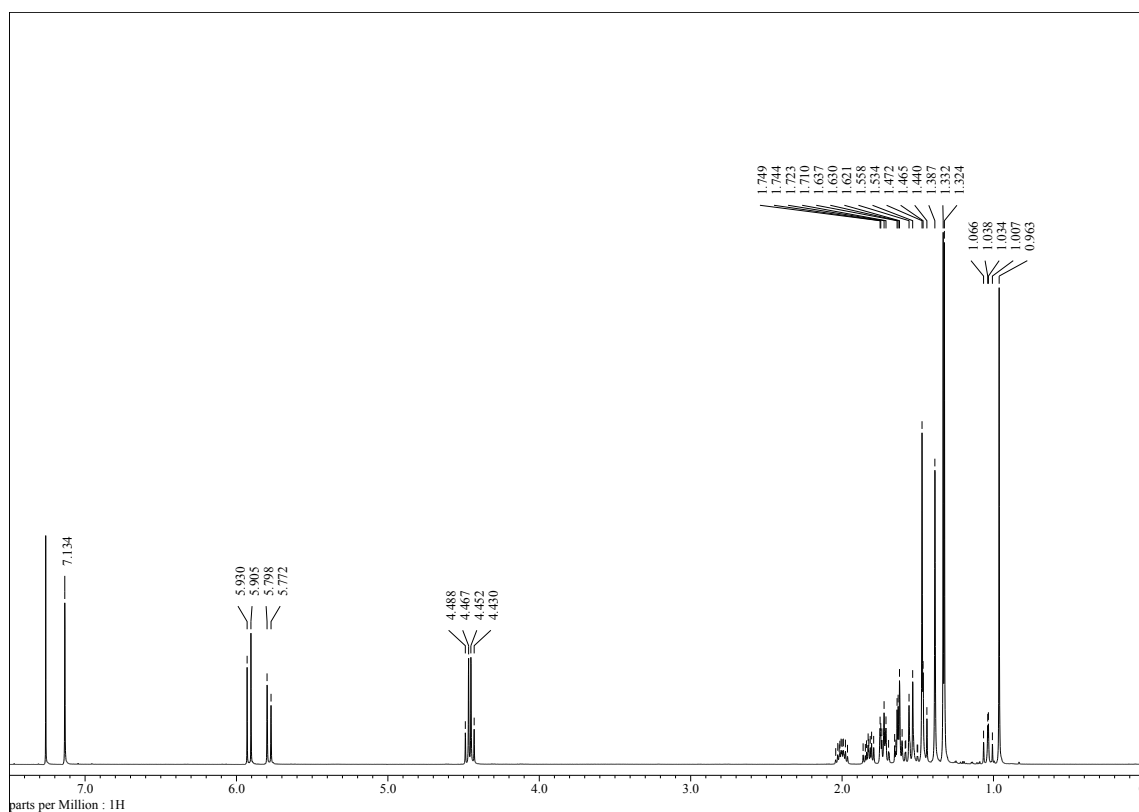
¹³C NMR spectrum of andilesin D (33)



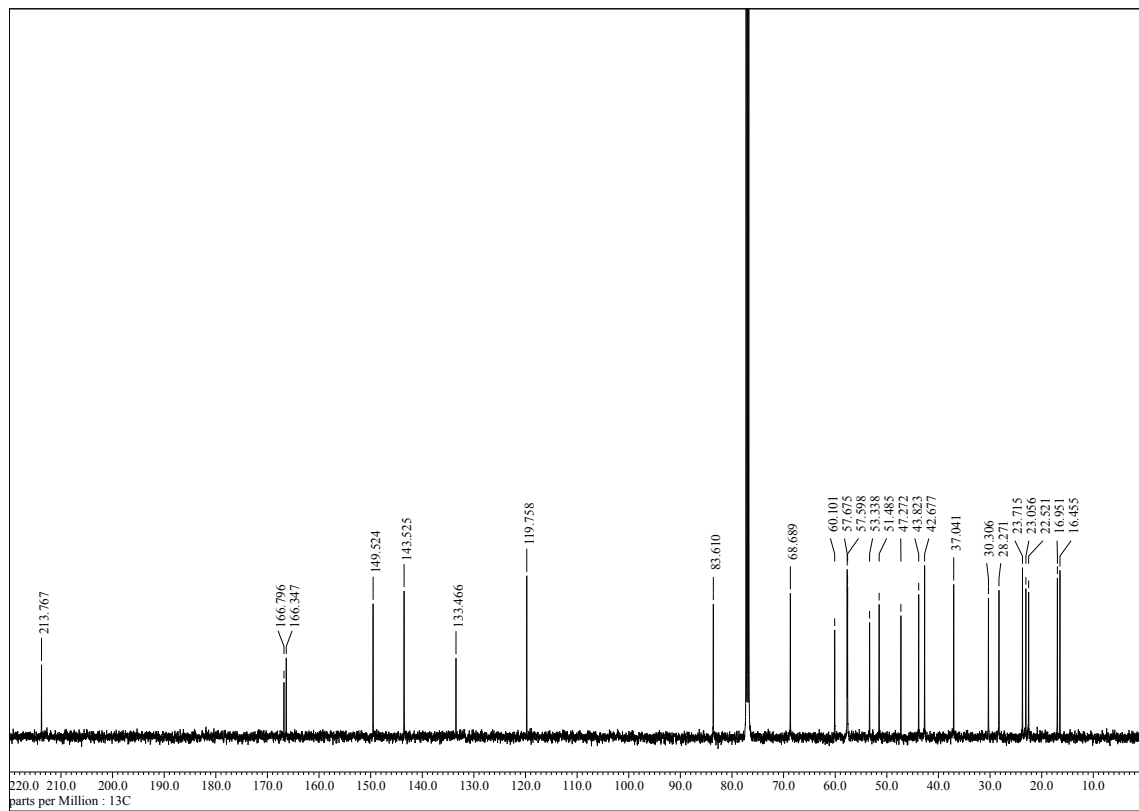
¹H NMR spectrum of andilesin A (22)



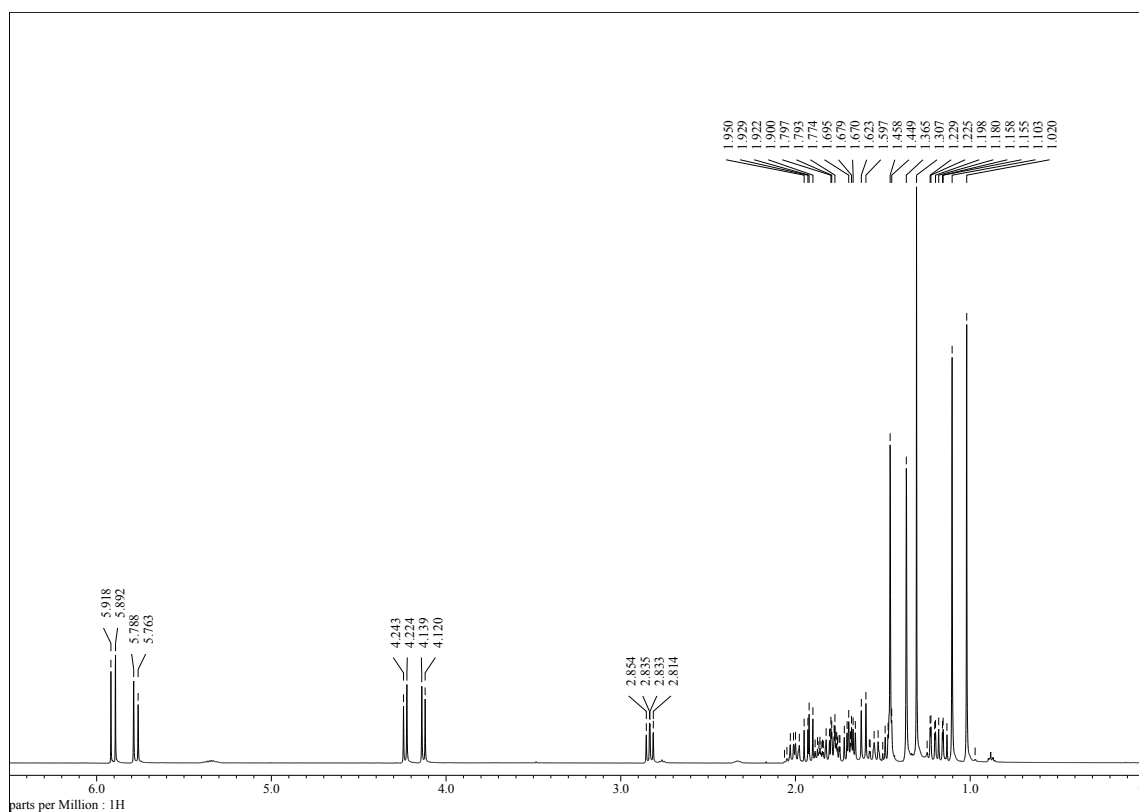
¹³C NMR spectrum of andilesin A (22)



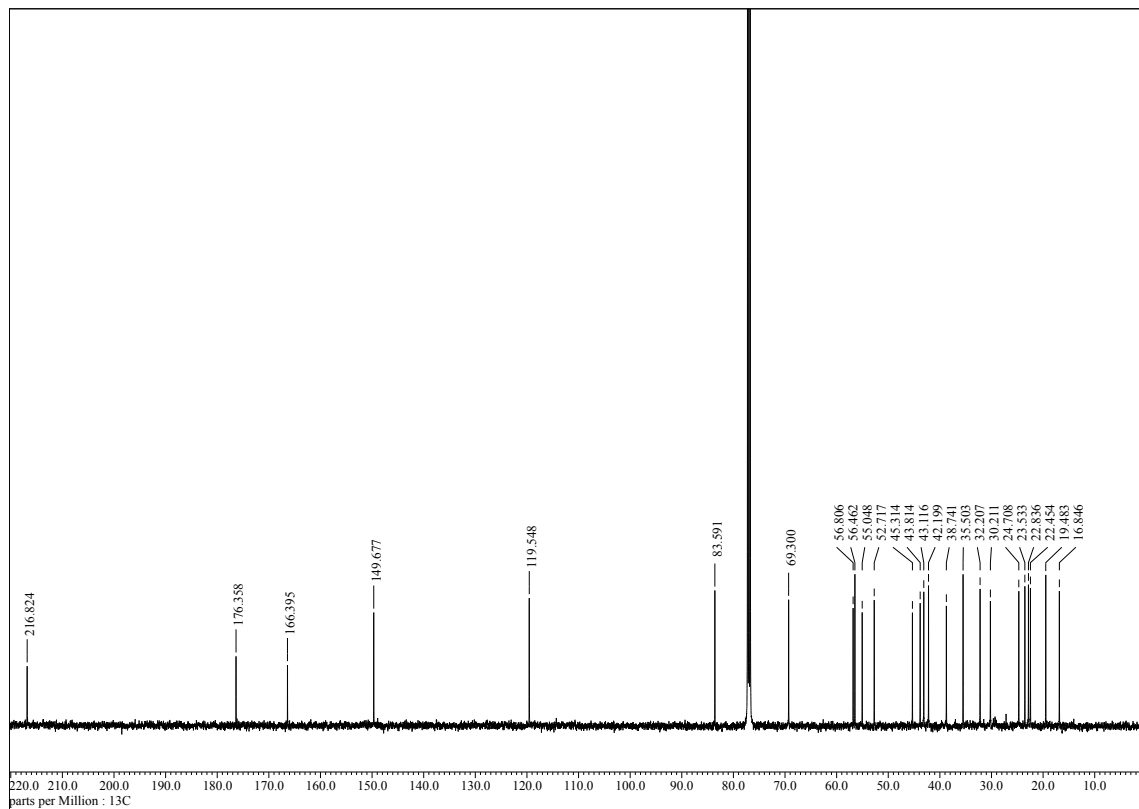
¹H NMR spectrum of andilesin B (**23**)



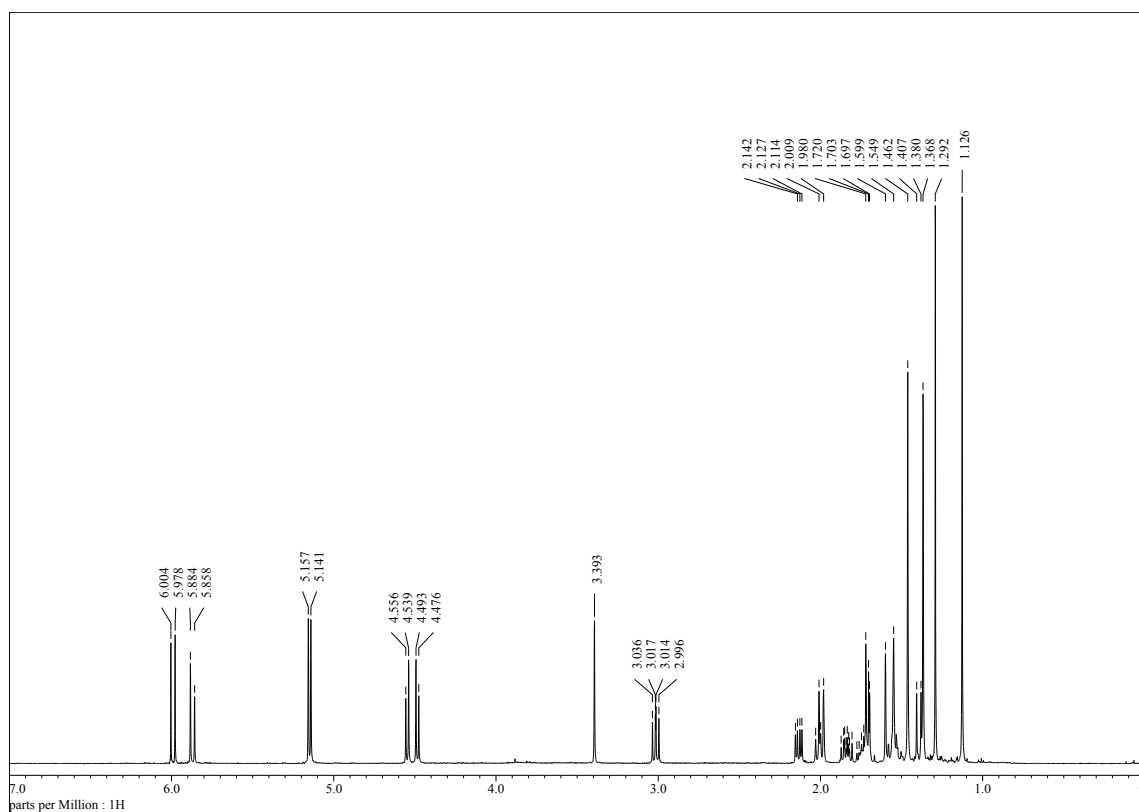
¹³C NMR spectrum of andilesin B (**23**)



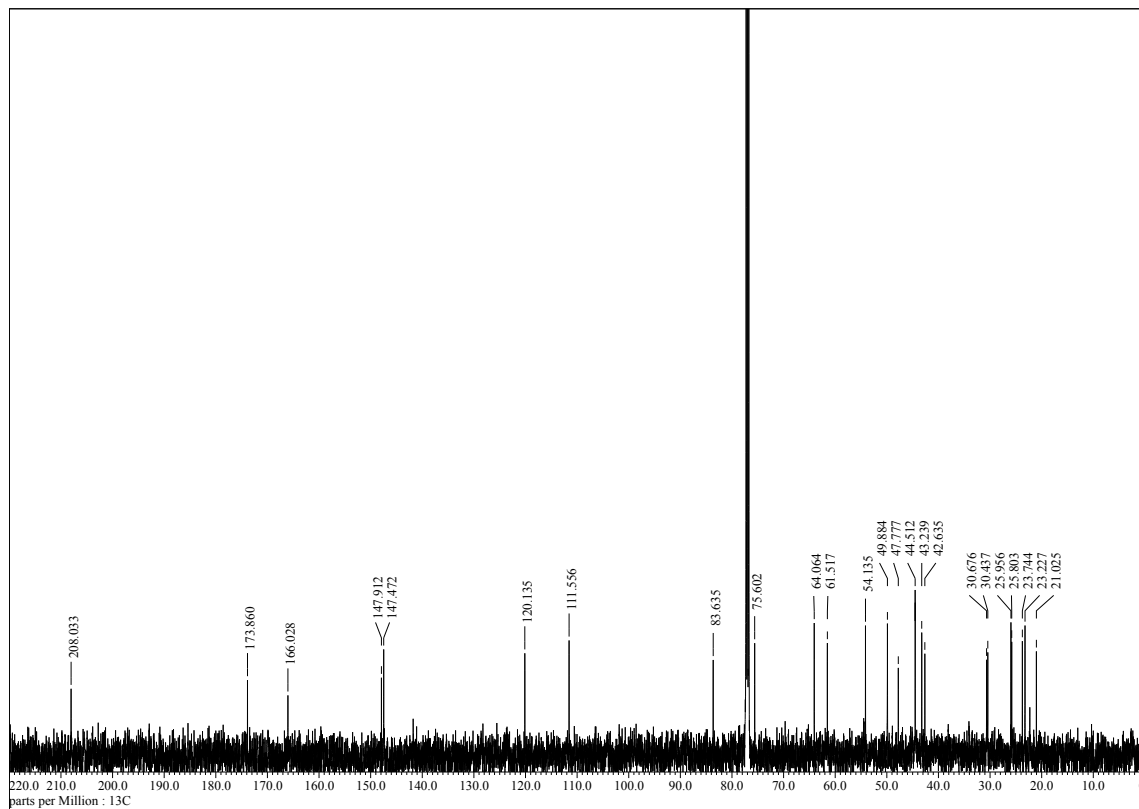
¹H NMR spectrum of andilesin C (24)



¹³C NMR spectrum of andilesin C (24)



¹H NMR spectrum of anditomin (21)



¹³C NMR spectrum of anditomin (21)

謝辞

本研究を行うにあたり、特任研究員ついで助教として採用いただくとともに、終始懇切なご指導を賜りました、東京大学大学院薬学系研究科 天然物化学教室教授 阿部郁朗先生に深甚なる謝意を申し上げます。

北海道大学大学院薬学研究院 教授 脇本敏幸先生には、有機合成、構造解析ならびに反応機構の考察などにおいて貴重な御助言を賜るとともに、研究者としての在り方や文書の表現方法に至るまで多くのことを学ばせていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

天然物化学教室 助教 淡川孝義先生には、本研究の根幹である糸状菌発現系の構築において多大なる御支援ならびに御助言を賜るとともに、些細なことまで相談させていただきました。ここに深く感謝申し上げます。

天然物化学教室 助教 森貴裕先生には酵素タンパク質の精製方法や取り扱いなどを基本的なところからご教授いただきました。また、学生時代からの同期として、苦楽をともにし、互いに切磋琢磨しあう良き競争相手でありました。ここに深く感謝申し上げます。

当研究室において糸状菌メロテルペノイド化合物生合成研究の礎を築かれた明治大学農学部 准教授 久城哲夫先生には、学部学生時代という研究を始めるにあたり最も重要な時期に、直接の指導を賜るとともに、広く科学に関する知識を教えていただきました。深く感謝申し上げます。

富山大学和漢医薬学総合研究所 教授 森田洋行先生には、当研究室に在籍中、酵素反応の取り扱いなどについてご指導を賜りました。ここに深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に大きく寄与した *Aspergillus oryzae* NSAR1 株ならびに pAdeA ベクターを供与していただいた東京大学大学院農学生命科学研究科教授 北本勝ひこ先生、pUSA ベクターならびに pUNA ベクターを供与していただいた東北大学大学院農学研究科教授 五味勝也先生に深く感謝申し上げます。

伊藤崇敬博士が当研究室博士課程において成し遂げられた業績は、糸状菌メロテルペノイド化合物合成研究における先駆的な成果であるとともに、本研究の出発点でもありました。また、一学年先輩にあたる徳永欽也氏には、学部学生時代の研究テーマを決定していただき実験のご指導を賜るのみならず、研究に関する多くの有意義な議論をしていただきました。両氏が私の研究に与えた影響は無論至大であり、ここに心より感謝申し上げる次第です。

私が直接の指導を行っている、または行っていた、岩渕大輝氏、三橋隆章氏、藤本貴之氏、全智揚氏、顔廷祐氏は本研究への直接の貢献はないものの、関連する研究を行っていただき、その成果から本研究に関わる新たな知見も得られています。学生諸氏とともに、研究成果を挙げることは私にとって大きな喜びであり、ここに感謝申し上げます。

天然物化学教室 秘書 馬場友華子氏、同 尾崎日映氏には、研究の遂行上不可欠な事務的な面において、多大なる御支援を賜っております。ここに深謝いたします。

過去六年間に渡り、天然物化学教室の皆様には、研究生活を続けていく上で大変お世話になりました。ここに感謝いたします。

最後に、これまでの研究生活を支えてくれた両親、祖父母ならびに妻に心から感謝いたします。

平成 27 年 8 月 松田 侑大

松田 侑大