

博士論文

放線菌の生産する中分子ポリケタイドの
生合成マシナリーに関する研究

橋本 拓哉

目次

略語一覧	1
序論	3
第1章 異種発現による versipelostatin の生合成遺伝子クラスターの同定	29
第1節 ドラフトゲノムシーケンスからの推定 VST 生合成遺伝子クラスター領域の探索と各遺伝子の機能予想による推定生合成経路	30
第2節 Versipelostatin 生合成遺伝子クラスターの異種発現	41
考察	44
第2章 Versipelostatin 生合成における糖鎖構造を形成する糖転移酵素遺伝子 <i>vstH</i>、<i>vstI</i> の機能解析	45
第1節 <i>vstI</i> 遺伝子破壊株の解析	46
第2節 <i>vstH</i> 遺伝子破壊株の解析	51
第3節 $\Delta vstH$ 株と $\Delta vstI$ 株の共培養による VST 生産の相補	58
考察	60
第3章 スピロテロン酸化合物の大環状化反応を担う [4+2] 環化付加反応に必須な遺伝子 <i>vstJ</i> の発見と機能解析	62
第1節 スピロテロン酸化合物生合成遺伝子クラスターの比較による候補遺伝子の探索	63
第2節 遺伝子破壊による機能未知遺伝子 <i>vstJ</i> の機能解析	67
第3節 VstJ 組換え酵素の調製	73
第4節 組換え VstJ の活性検出と反応産物の構造決定	74
第5節 VstJ による反応の至適 pH と金属依存性の検討	77
第6節 VstJ の酵素動力学解析	78
第7節 NOESY 測定と分子動力学シミュレーションによる VstJ 基質のジエン部位の配座および分子全体の柔軟性についての考察	80
考察	84

第 8 節	VstJ および abyssomicin 生合成遺伝子クラスター中の VstJ ホモログ酵素 Abycyc の結晶構造解析とホモロジーモデリングによる VstJ の基質認識 機構の推定	87
第 9 節	VstJ 変異体の活性測定による活性残基の探索	97
	考察	103
第 4 章	4083-SVS6 株のドラフトシーケンス内に見出された trans-AT 型 type I PKS を 中心とする生合成遺伝子クラスターの異種発現	105
第 1 節	<i>in silico</i> 解析による未利用生合成遺伝子クラスターの探索	106
第 2 節	推定生合成遺伝子クラスター領域を含む BAC クローンの取得と異種発 現株による化合物の生産	109
	考察	111
第 5 章	Bafilomycin の側鎖生合成に関わる酵素 BfmI と BfmJ の機能解析	113
第 1 節	BfmIJ による BFMA から BFM C への変換反応	114
第 2 節	BfmJ 単独反応の反応産物の検出	116
第 3 節	3''-hydroxy-succinyl-AMP (7) と BfmI による BFMA へのアシル基転移 反応の検討	120
第 4 節	共発現による BfmIJ 相互作用の解析	122
	考察	125
	総括	127
	実験項	135
	分光学的データ	154
	参考文献	180
	謝辞	191

略語一覧

試薬・化合物

AcOH	acetate
ACN	acetonitrile
ADP	adenosine diphosphate
AEBSF	4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride
AMP	adenosine monophosphate
ATP	adenosine triphosphate
BFM	bafilomycin
CoA	coenzyme A
DMSO	dimethyl sulfoxide
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
EtOH	ethanol
EtBr	ethidium bromide
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
MeOH	methanol
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ODS	octadecylsilane
PEG	polyethyleneglycol
SDS	sodium dodecyl sulfate
Se-Met	Seleno-L-methionine
TDP	thymidine diphosphate
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
VST	versipelostatin
x-gal	5-bromo-4-chloro-1H-indol-3-yl β -D-galactopyranoside

抗生物質 抗生物質名の右の濃度で培地に添加して使用した

amp	ampicillin 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
apr	apramycin 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$
kan	kanamycin 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$
neo	neomycin 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$

遺伝子・酵素類

ACP	acyl carrier protein
-----	----------------------

AT	acyl transferase
C	condensation
CY	cyclase
DH	dehydratase
ER	enoyl reductase
KS	ketosynthase
KR	ketoreductase
NRPS	nonribosomal peptide synthetase
OX	oxidase
PCP	peptidyl carrier protein
PKS	polyketide synthase
TE	thioesterase

実験手法・機器関連

BAC	bacterial artificial chromosome
COSY	double quantum filtered correlate spectorscopy
ESI	electro spray ionization
HMBC	¹ H-detected heteronuclear multiple bond correlation
HPLC	high performace liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
HSQC	¹ H-detected heteronuclear single quantum coherence
LC	liquid chromatography
MS	mass spectrometry
NMR	nuclear magnetic resonance
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PDA	photo diode array
PFGE	pulse field gel electrophoresis
SAD	single anomalous diffraction
UV	ultra violet
XAFS	X-ray absorption fine structure

菌名

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

序論

医薬資源としての二次代謝産物

天然において生物は多様な構造を持つ化合物を創り出し、色素や香料、抗生物質などさまざまな機能を持つ化合物が存在する。微生物、植物、海洋生物などを探索源としてこれまでに数多くの天然物化合物が取得されてきた。これら天然化合物のうち、アミノ酸、糖、脂質、核酸など、生物の生育に必須なものを、一次代謝産物と呼び、生育に必須ではないものを二次代謝産物と呼んで区別する。多くの場合、これら二次代謝産物が、生産する生物にとってどのような意義を持ち、なぜ生産されているのかは不明である。一方で、これら二次代謝産物はユニークな構造を持ち、ヒトや他の生物に対してもさまざまな生物活性を示す。それらの中には薬として有用な化合物も含まれており、古来よりヒトは経験から動植物をすりつぶした生薬など、伝承薬という形でこれら二次代謝産物を薬として利用してきた。

科学の進展に伴い、生薬の中の活性成分を単一化合物として単離し、西洋薬として用いるようになった。1804年にドイツの Sertürner により阿片の有効成分として、植物アルカロイドである morphine が活性本体として初めて単離された。morphine は今でもがん鎮痛剤として広く用いられている。1820年にはフランスの Pelletier および Caventou によって、キノの樹皮からマラリアの特効薬である quinine が単離された。そのおよそ 100 年後、1928年の Fleming による青カビからの penicillin の発見を端緒にし、微生物からの生物活性物質の探索が盛んに行われることとなった。当初は抗生物質をターゲットとした生物活性物質のスクリーニングであったが、次第にがんや免疫抑制剤など幅広い疾患へとスクリーニング対象が広げられて、多数の有用な生物活性物質が微生物から取得されてきた。

二次代謝産物生産者としての放線菌とそのゲノム情報

1943年に Waksman が結核の特効薬となる streptomycin を単離して以来、臨床薬を始めとしてさまざまな生物活性物質が放線菌（ここでは actinomycetales、放線菌目に分類される *Streptomyces* 属を始めとする属を指す）から単離され、医薬品や農薬として用いられてきた。これまでに微生物から単離された二次代謝産物約 22,500 種のうち、45%は放線菌 (Actinomycetales) が生産することが示されており、放線菌の二次代謝産物生産能の高さとリソースとしての利用しやすさが示されている¹。多くの二次代謝産物の生合成遺伝子は放線菌のゲノム上で遺伝子クラスターを形成することが知られている²。2000年代から *Streptomyces* 属を始めとして、20種を超える放線菌の全ゲノム配列が解読され公開されている³⁻⁵。さらに、近年は次世代シーケンサーの台頭により、ドラフトシーケンスを廉価で迅速に取得できるようになり、菌株ライブラリ中の多様な放線菌ゲノムの網羅的な解析が行われている。その結果、放線菌はゲノムのサイズあたりの二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの数が、他のバクテリアと比較して有意に多いことが示されている^{6,7}。一方、放

線菌ゲノムに見られる遺伝子クラスターの種類と比べて、実験室で培養したサンプルで生産が見られる化合物の数が僅かしかないことから、遺伝子上に存在する多くの遺伝子クラスターは実験室の培養条件では、眠った (= “silent”) 状態で存在していることが示唆された⁴。遺伝子クラスターが利用されない理由には実験室内での培養条件では、遺伝子制御の刺激が与えられないために発現しない可能性や、内因性の生合成遺伝子クラスター間での基質競合によって、化合物生産に必要な基質が、発現量が優位な遺伝子産物に利用されてしまうため、限られた培養条件では得られる化合物が限定されてしまうなどの可能性が考えられている。ゲノム情報の取得が容易になったことから遺伝子配列情報を手掛かりに既知遺伝子との相同性からの生産物の予測、培養条件の検討や遺伝子の転写量や発現量の探索などを行うことで新規化合物が取得されている⁸⁻¹¹。また、発現していない遺伝子クラスターについて、異種の放線菌へと導入して発現させることで化合物を取得する方法も可能である。これらの手法は **genome mining** と呼ばれ、微生物のゲノム情報から新規化合物を効率的に探索する有効な手段の一つと考えられる¹²。

さらに、大規模シーケンスによって得られた生合成遺伝子クラスターどうしを比較解析した結果、類似の構造を持つ化合物どうしについては、生合成遺伝子クラスターに相同性を持つ遺伝子の組み合わせがカセットとして存在することが示唆された¹³。つまり、全体として多様に見える二次代謝産物も個々の特徴的な部分構造については共通した生合成機構を持ち、これらが組み合わせられることにより、更なる二次代謝産物の構造多様性が創出されていると考えられる¹³。

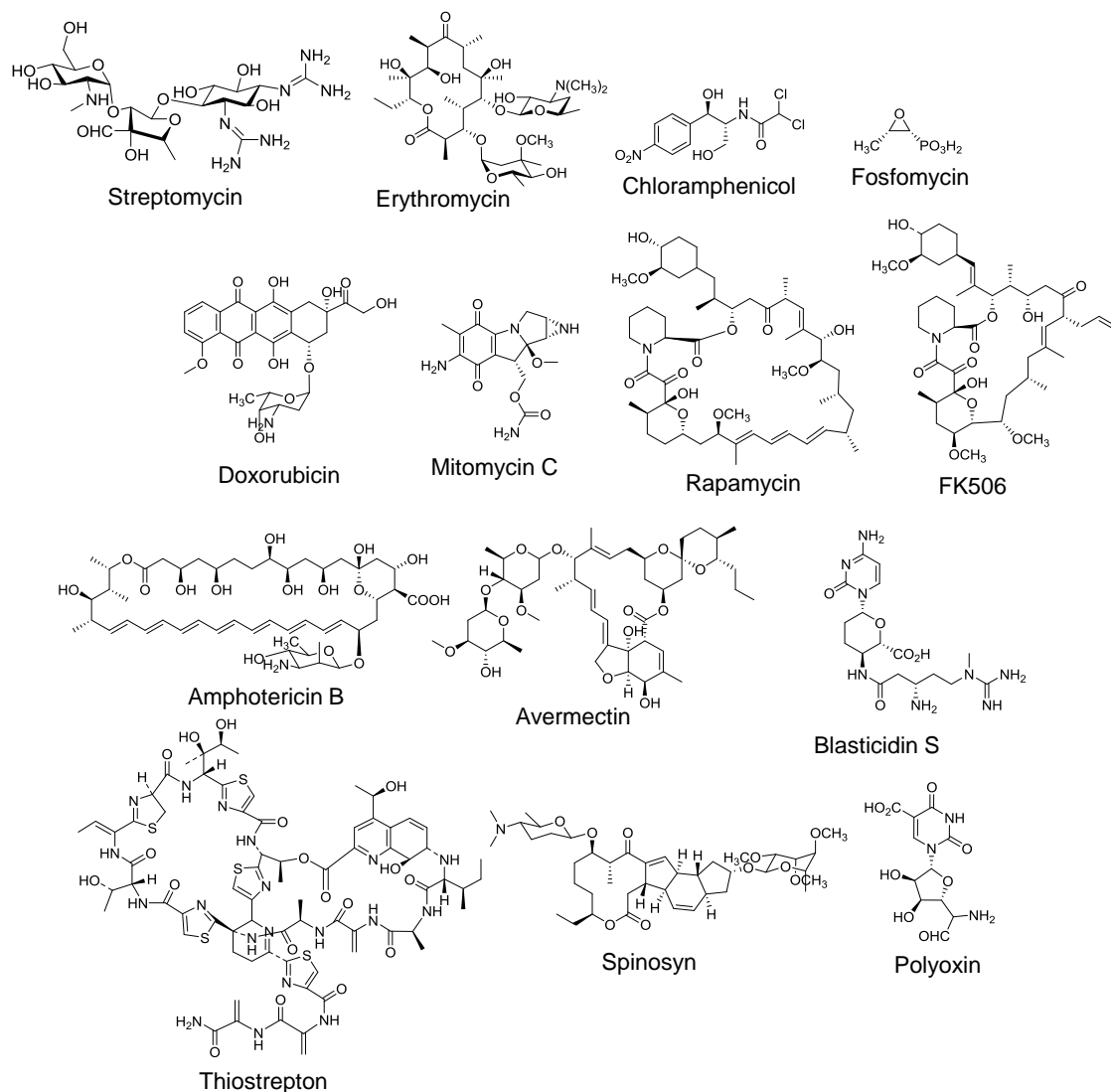


図 1 放線菌から単離され、医薬品等として用いられている天然化合物の例

中分子化合物ライブラリとしての天然物化合物

90年代から欧米を中心としたメガファーマは合成化合物を中心とした100万にもおよぶ化合物ライブラリをスクリーニング源とした High throughput screening (HTS) へと軸足を移した。その際、化合物選択の指標として、経口薬としての体内動態の良い化合物の特徴を考慮した経験則 Lipinski の rule of five (1. 水素結合のドナーとなる官能基が5個以下、2. 水素結合のアクセプターとなる官能基が10個以下、3. 分子量が500以下、4. LogP値が5以下) が考慮されている。一方、天然化合物には500以上の分子量のものが多く、分子量が

大きいために、多数の官能基を持ち、LogP 値も大きくなる傾向から rule of five を適用した際には大部分が除外され、忌避されてきた。

しかしながら、既に上市された薬の 80% 近くが、天然物もしくは天然物の誘導体や天然物を模した構造であることから一部で天然物を見直す動きもある^{14,15}。これまで、主な創薬ターゲットの分子は、酵素や、G-タンパク質共役受容体 (GPCR) といったリガンド結合型のタンパク質であり、その活性中心ポケットに薬剤分子が結合することでアゴニストまたはアンタゴニストとして作用を示す作用機序が多かった。しかし、薬剤標的タンパク質となるリガンド結合タンパク質の数が頭打ちとなりつつあり、今後の標的としてタンパク質間相互作用 (Protein-Protein interaction PPI) の阻害剤が新たな創薬標的の候補として挙げられている¹⁶。PPI は細胞内シグナル伝達や、エピジェネティクス、転写、翻訳といったさまざまな細胞内イベントに関与するため、創薬標的となる分子数も多い^{17,18}。

分子量 400 から 4000 の化合物は中分子化合物と呼ばれており、ペプチドライブラリと天然物ライブラリなどが挙げられる。中分子化合物では、rule of five を満たさないような化合物が多く存在する。比較的広い接触面でタンパク質と相互作用することで、タンパク質間相互作用の阻害剤としての機能できると期待されている。特にペプチドのライブラリと比較して天然物では骨格の多様性が豊富であることから、再び化合物ライブラリとしての天然物に注目が集まりつつある^{19,20}。

ポリケタイド化合物とその生合成

ポリケタイドは酢酸単位の縮合反応によって形成される化合物群の総称であり、きわめて多様な構造を持つ。医薬品として用いられている化合物も多く、抗生物質の erythromycin、免疫抑制剤の FK-506、rapamycin (抗がん剤としても使用されている)、抗寄生虫薬 avermectin、抗がん剤の doxorubicin などがその例である (図 1)。

これらのポリケタイドはアシル CoA を前駆体とし、polyketide synthase (PKS) と呼ばれる酵素の作用により合成される。PKS による生合成は脂肪酸合成酵素 (FAS) の反応と非常に類似している。PKS と FAS ではともに acyltransferase (AT) によってアシル ACP と malonyl-ACP が形成し malonyl-ACP が脱炭酸を伴う縮合反応によってアシル ACP との C-C 結合が形成され β 位にケト基が生じる。FAS では、このケト基が順次、ketoreductase (KR)、dehydratase (DH)、enoylreductase (ER) の作用によってメチレンにまで還元され、次のサイクルの伸長反応が行われるが、炭素鎖が十分に伸長された後は、thioesterase (TE) によって切り離される (図 2)。一方、PKS では、KR、DH、ER の一部、または全部を欠いた構造をとるため、ケト基の還元が完全には行われず、ケト基や水酸基、二重結合を持った構造多様性に富んだ炭素鎖が形成される (図 2)。

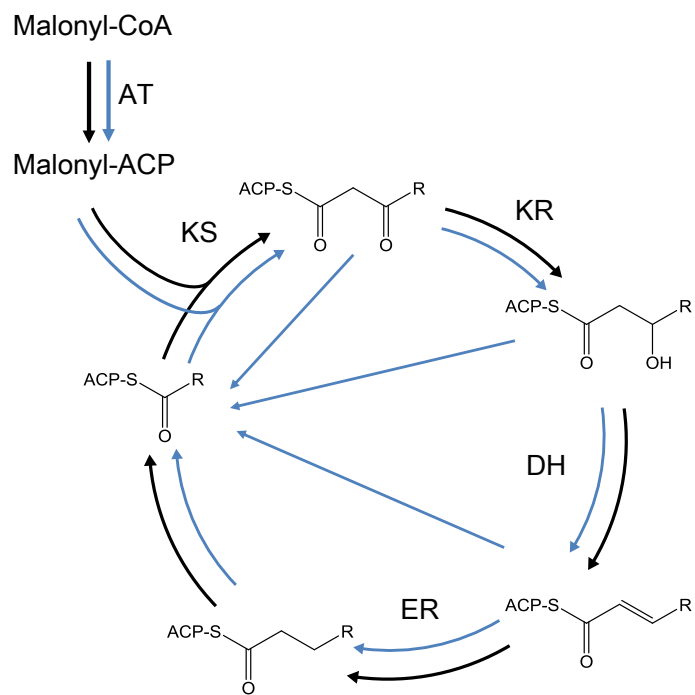


図 2 PKS および FAS によって触媒される炭素鎖伸長反応
PKS による反応を青の矢印で示し、FAS による反応を黒の矢印で示した。

PKS は酵素の構造からいくつかのタイプに分類でき、タイプごとに生物界での分布が異なる (表 1)²¹。まず同一モジュールで反復して反応を行うか否かで 2 通りに分類できる。次に、酵素の形状から I 型、II 型、III 型の 3 つのタイプに分類できる²²。I 型 PKS では各ドメインが連なって 1 つの巨大酵素を形成する。I 型 PKS には反復型とモジュラー型の 2 つのタイプがある。また AT ドメインがモジュール内に存在する *cis*-AT 型と、モジュール外の単独の AT ドメインが ACP へのアシル基の導入を担うタイプの *trans*-AT 型とが存在する。II 型 PKS は反復型で KS、AT、DH、KR などの各機能を持った酵素が複合体を形成したものであり、III 型 PKS も反復型で KS のホモダイマーのみからなる。ここでは、本研究で対象とした I 型 PKS についてのみ詳細に述べる。

表 1 既知のポリケタイド合成酵素の生物種の分布

PKSの分類	生物種
モジュラー型 type I (非反復型)	細菌
反復型 type I	真菌、一部の細菌
type II (反復型)	細菌
type III (反復型)	植物、一部の細菌と真菌
PKS-NRPS hybrid	細菌(非反復型)、真菌(反復型)

I型 PKS は、AT がモジュール内に存在するものと、モジュール内に存在しないものに分けられ、それぞれを *cis*-AT type と *trans*-AT type と呼称する (図 3)。*cis*-AT type の I型 PKS では loading module の AT ドメインによって ACP に開始基質がロードされる。開始基質はアセチル CoA やプロピオニル CoA であることが多いが、アミノ酸や、benzoate の誘導体がいられる場合もある²³。Loading module 内に ketosynthase (KS) に類似した KSQ ドメインと呼ばれるドメインを持つ場合は、マロニル CoA が KSQ ドメインによる脱炭酸反応を伴って開始基質として load される^{24,25}。ロードされたアシル ACP はマロニル CoA を主とするさまざまな伸長単位²⁶ が KS ドメインによって付加し、KR、DH、ER ドメインによる還元を受けながら各モジュールの ACP を順次受け渡される。*trans*-AT type の I型 PKS ではモジュール内に AT ドメインが存在しないため、伸長基質の ACP へのロードは非連結型 (discrete) の AT ドメインを持つ酵素が行う。また、ER ドメインや DH ドメインについても discrete な単独の酵素として存在し、複数のモジュールに関与して機能するものも知られている²⁷。一部の PKS では同一ドメインで繰り返し反応が行われることもある^{28,29}。最終モジュール上にはアシル側鎖の切り出しを担う TE ドメインが存在する。TE ドメインによってエステル形成が行われ、PKS から切り出される。多くの場合 TE ドメインからの切り出しは分子内のラクトン形成反応を伴うため、大環状ポリケタイドが I型 PKS によって生合成される。*trans*-AT type では直鎖の形で切り出されることもある²⁷。

I型 PKS では 1 回の炭素鎖伸長反応各ドメインが連なったモジュール構造を取り、1 つのモジュールは 200 kDa 程度の分子量を持つ。各モジュールが炭素鎖の伸長回数だけ連なって 1 つのポリペプチド鎖となっているため、5 モジュール以上の PKS は約 1 MDa を越える巨大なタンパク質である。さらに複数のタンパク質が相互作用して複合体として機能するため、全体としては数 MDa と、リボソームにも匹敵する巨大複合体として細胞内で機能すると考えられている。^{30,31}

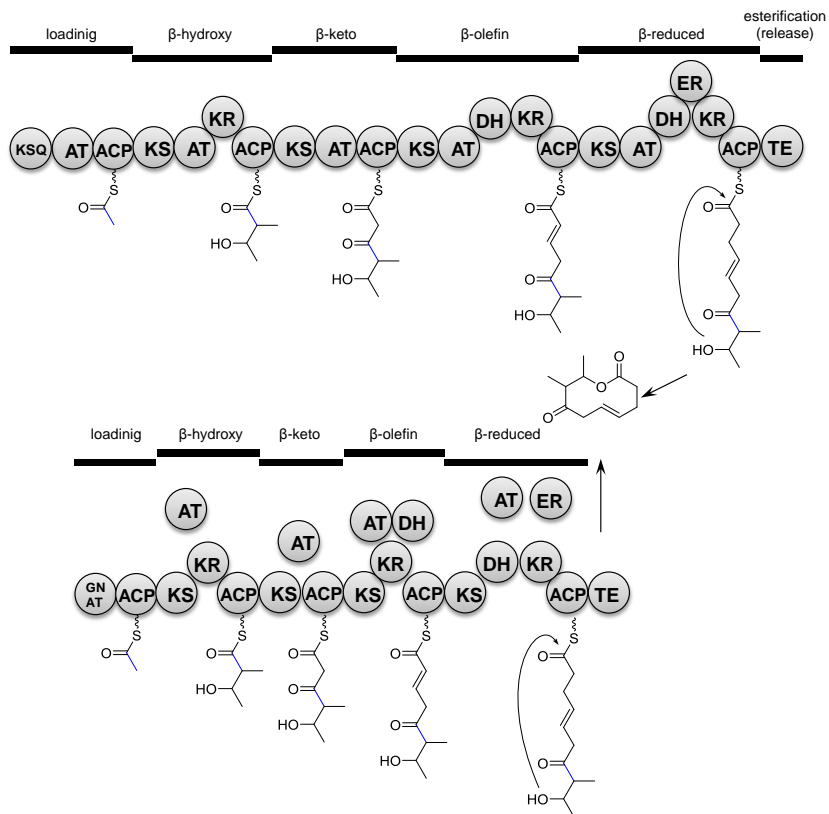


図 3 ポリケタイドの還元様式の模式図。

上段には架空の *cis*-AT 型の I 型 PKS の模式図、下段には架空の *trans*-AT 型の I 型 PKS の模式図を示し、双方が 10 員環ラク톤を生成する例を示した。²⁷ それぞれのドメインの組み合わせにより、 β 位の還元度が異なる。AT ドメインが基質となるアシル CoA を認識して ACP へ結合させ KS ドメインに依る脱炭酸を伴う縮合反応によって炭素鎖が伸長される。DH、KR、ER ドメインの組み合わせが β 位の還元度を決定づける。組み合わせに対応する β 位の構造を *cis*-AT 型の I 型 PKS の上に示した。PKS からの放出は、TE ドメインに依る水酸基によるチオエステルへの求核攻撃が触媒され、エステル形成に伴う放出を受け、分子内ラク톤を持つマクロライド構造となる。

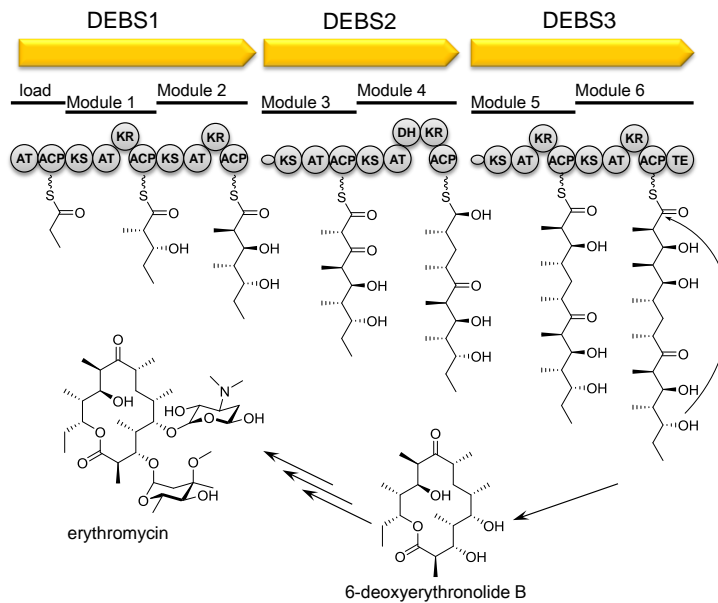


図 4 代表的な *cis*-AT type の I 型 PKS、6-deoxyerythronolide B 合成酵素³²

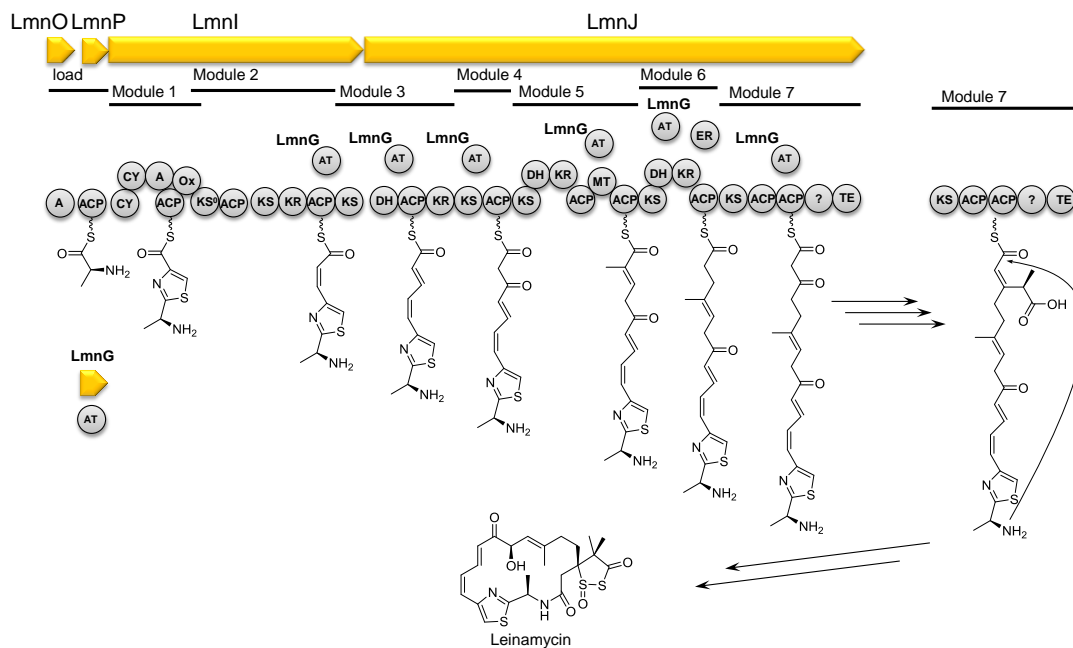


図 5 leinamycin 生合成を行う *trans*-AT type I 型 PKS (LmnG, LmnO, LmnP, LmnI, LmnJ) *trans*-AT である LmnG はモジュール 2 から 7 の ACP へマロニル CoA をロードする³³

BACによる生合成遺伝子クラスターの異種発現

放線菌が生産する大環状の中分子ポリケタイド化合物は多くが上述したI型PKSによって生合成される。前述したように反応を担うドメインが一つのポリペプチド鎖に集約していることから、これらタンパク質をコードする遺伝子も長くなる。そのため、モジュラー型PKSやNRPSには、生合成遺伝子クラスターのサイズが100 kbを越えるものも多く存在する。もし、この長大な生合成遺伝子の全長を取得し、酵素の部分構造を λ -Red recombinaseなどの遺伝子組み換え技術を用いてその機能を損なわないように、機能改変できるなら、これらが生産する中分子化合物の類縁体を生産する化合物ライブラリの作製が可能となるだろう。

しかし生合成遺伝子取得の上でハードルとなるのは、遺伝子クラスターの大きさである。平均的なコスミドベクターのインサート長は40 kbであるので、100 kbを越えるクラスターの取得の際には、クラスターを2つ以上に分断して別々のベクターに乗せる方法や、組換え技術を用いてゲノム上にクラスターを1つにつなげる方法で異種発現が行われてきた³⁴。また、PKS遺伝子では、相同性の高いモジュールが繰り返し並んでいることから、コスミドのような大腸菌内で複数コピーのクローンが保持されるベクターでは、クローン間の組換えが起こりやすく、ライブラリの安定性が問題となる。この長さでゲノムの安定性の問題を解消できるのが細菌人工染色体(BAC)を用いたライブラリである。BACによるライブラリはインサート長が最大で300 kbであり、ライブラリ宿主内に1コピーのベクターのみが存在するため、遺伝子の欠損が起こりにくい。^{35, 36}

BACライブラリは巨大生合成遺伝子クラスターを取得するのに好都合な技術であり、これまでに geldanamycin (60 kb)、migrastatin (50 kb)、erythromycin (55 kb)、bafilomycin B₁ (87 kb)、nemadectin (63 kb)、leptomycin (86 kb)、tautomycetin (80 kb)の生合成遺伝子クラスターがBACを用いて異種発現されてきた³⁷⁻³⁹。これまで異種発現された最大の遺伝子クラスターはNRPSによって形成される daptomycin のもので、そのサイズは128 kbである⁴⁰。Daptomycinでは生合成遺伝子クラスターを、類似の化合物であるA54145、CDAの生合成遺伝子と遺伝学的に組み合わせ、構造類縁体の生物的生産が実施されている⁴¹。

Versipelostatin の構造と類縁体およびその生物活性

固形がん細胞は組織内で低グルコース、低酸素の特殊なストレス環境に存在する。ストレス環境下においては折畳み（フォールディング）が正しく行われずタンパク質ががん細胞内に蓄積する。このタンパク質を正しくフォールディングさせるための細胞応答として小胞体ストレス応答（ER response）が知られている。がん細胞では小胞体ストレス応答のための分子シャペロン GRP78 が正常細胞よりも強く誘導されることが知られている。GRP78 は細胞内に蓄積した異常タンパク質を正しくフォールディングさせるために発現される。GRP78 が機能しない場合には異常タンパク質が蓄積し、アポトーシスへ至る⁴²。そのため、GRP78 は抗がん剤の標的分子となる。Versipelostatin (VST) はレポーター遺伝アッセイを用いた GRP78 の発現誘導阻害スクリーニングによって *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 から単離された化合物であり、正常細胞に対しては高濃度においても毒性を示さないことから、その活性に関心がもたれている⁴³⁻⁴⁵。VST は真核生物翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 1 (eIF4EBP1) を活性化させることで GRP78 の発現を抑制しているという報告がされている⁴⁶。天然物から調製したアグリコンを用いた活性試験からアグリコンのみでは VST の生物活性は見られないことから生物活性の創出については糖構造を形成することが重要であることが示された。さらに当研究室において 4083-SVS6 株から単離された VST 類縁体の活性試験によって、その生物活性には側鎖糖の β -D-digitoxose-(1,4)- α -L-oleandrose-(1,4)- β -D-digitoxose の 3 糖構造、特に β -D-digitoxose-(1,4)- α -L-oleandrose 部位が重要であることが示された⁴⁷⁻⁴⁹。

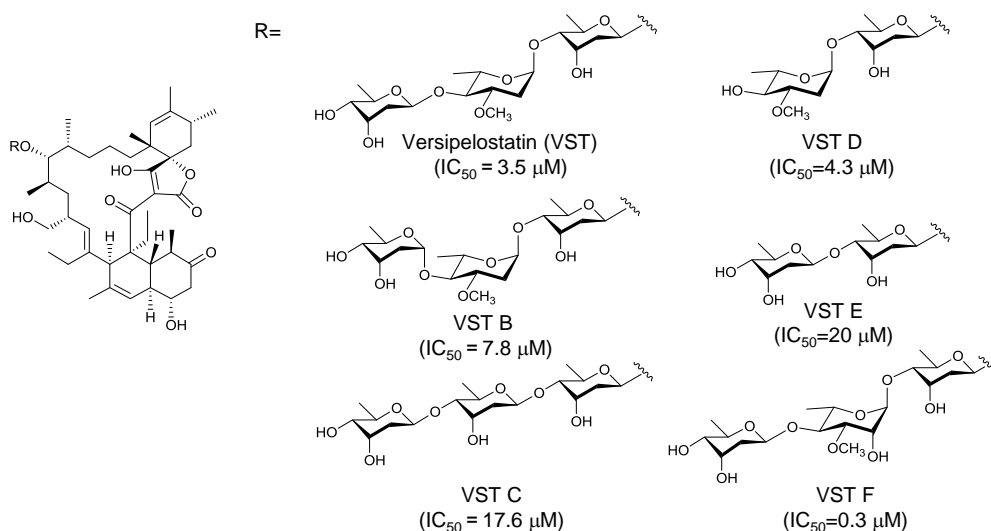


図 6 VST および VST 類縁体の構造

GRP78 の発現誘導阻害活性についての IC_{50} 値についてそれぞれの構造の下に示した。

スピロテロン酸化合物の生物活性と生合成経路

VST はスピロ炭素に連なったテトロン酸構造（以下スピロテロン酸構造と呼ぶ）を持つスピロテロン酸化合物という化合物に分類される。類似のスピロテロン酸を持つ化合物として、chlorothricin⁵⁰、tetrocarcin A⁵¹、kijanimitin⁵²、abyssomicin、quartromicin⁵³、lobophorin⁵⁴をはじめとして多数のスピロテロン酸化合物が報告されている（図 8）。chlorothricin はコレステロール生合成の阻害活性⁵⁰、abyssomicin はコリスミ酸ムターゼ阻害による抗菌活性⁵⁵、lobophorin は抗炎症作用⁵⁴、tetrocarcin A はアポトーシスを制御する Bcl-2 タンパク質を阻害し、アポトーシス誘導活性を示す⁵⁶など、これらスピロテロン酸化合物がさまざまな生物活性を持つことが報告されている。一方、スピロ炭素を持たないテトロン酸構造を持つ化合物は放線菌以外からも単離され、RK-682 や agglomerin、tetronomycin などが知られている（図 7）。テトロン酸構造はカルボン酸やリン酸のミミックとして機能し、ホスファターゼを阻害し、シグナル伝達経路を阻害することで生物活性を示す。⁵⁷

これまでにテトロン酸化合物である、RK-682⁵⁸ や agglomerin⁵⁹、tetronomycin⁶⁰ の生合成遺伝子クラスター、およびスピロテロン酸化合物 tetrocarcin A⁶¹、chlorothricin^{61, 62}、kijanimitin⁶³、abyssomicin⁶⁴、quartromicin⁶⁵、lobophorin⁶⁶ の生合成遺伝子クラスターが取得されている。それらの比較から、両者は共通した生合成機構によって生合成されることが示唆されており、これらからスピロテロン酸形成までの生合成経路が推定できる（図 9）。⁵⁷

両者の生合成経路ではテトロン酸形成に必要な、ポリケタイド合成酵素、 β -ケトアシル合成酵素、ACP、Fkb-H like protein が遺伝子クラスターとして保存されている。まず Fkb-H like protein によって 1,3-glycerol-diphosphate と、保存された ACP を基質として、glycerol-S-ACP が形成する⁵⁸。テトロン酸生合成に関与する PKS には最終モジュール上の TE ドメインが存在しない。そのため、分子内エステル化による PKS からの切り出しは行われない。代わりに β -ケトアシル ACP 合成酵素により、glycerol-S-ACP の水酸基がアシル鎖に求核攻撃を行うことで PKS の ACP から切り出される。次いで、切り出されたアシル ACP は分子内 Claisen 縮合 (Dieckmann 環化) によって ACP から切り出され、テトロン酸構造が形成される（図 9）⁵⁸。さらに agglomerin の生合成経路の解析から、末端の水酸基に対してアセチル化反応と、脱酢酸反応が行われることで、末端オレフィンを持つ中間体が形成する（図 9）⁵⁹。

その後、スピロテロン酸の生合成においては、PKS によって形成された共役二重結合と、*exo* オレフィンとの間の分子内 Diels-Alder 反応が起こることで、アグリコンのスピロテロン酸構造が形成するという生合成経路が提唱されてきた（図 10）⁵⁷。しかしながら、この分子内 Diels-Alder 反応を触媒する酵素については既知のスピロテロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターから見出されておらず、その存在についても不明であった^{63, 64}。

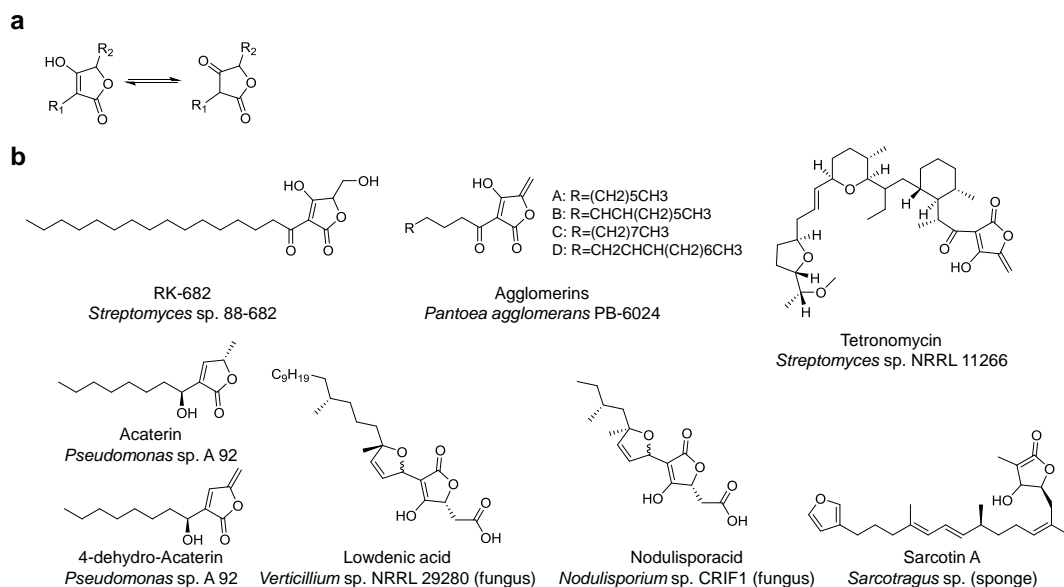


図 7 テトロン酸を有する鎖状の天然化合物の例

a. テトロン酸の構造。互変異性体の構造を示した。**b.** 天然から単離された鎖状のテトロン酸化合物の構造。単離源となった生物を示した。

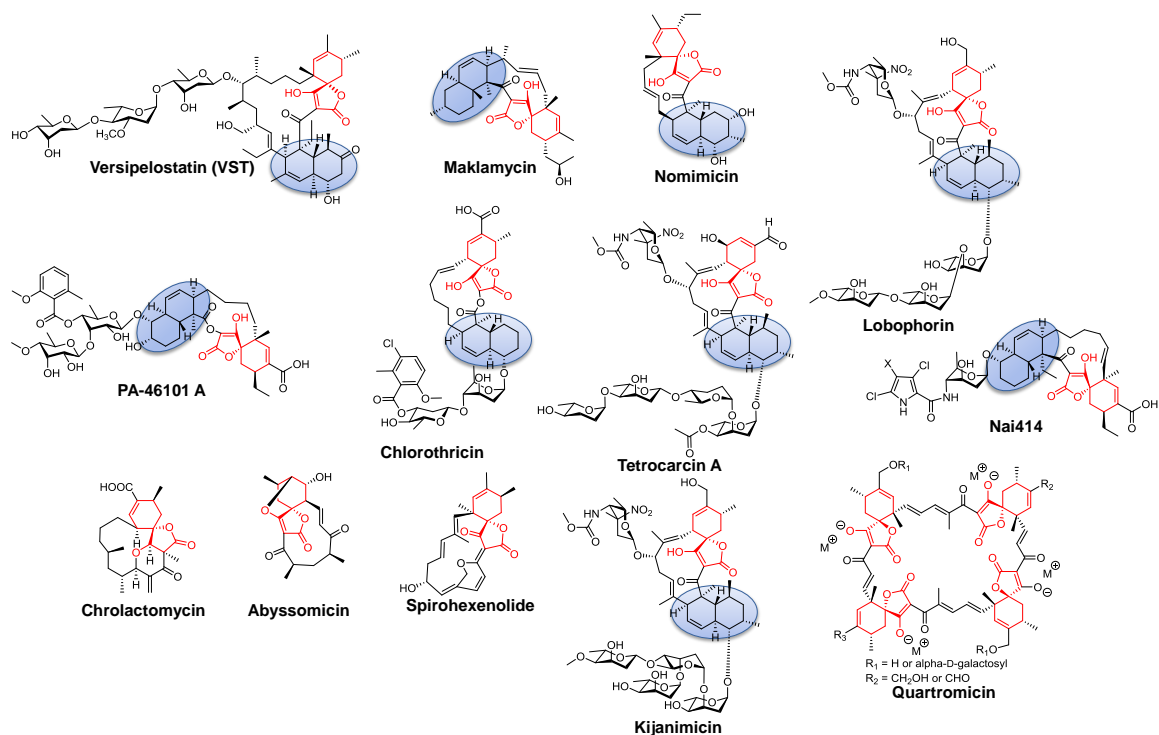


図 8 スピロテトロン酸構造を持つ化合物の例

赤でスピロテトロン酸骨格を示した。青で *trans*-decalin 構造を囲んだ。ここに示した全てのスピロテトロン酸化合物は放線菌目の細菌から単離されている。

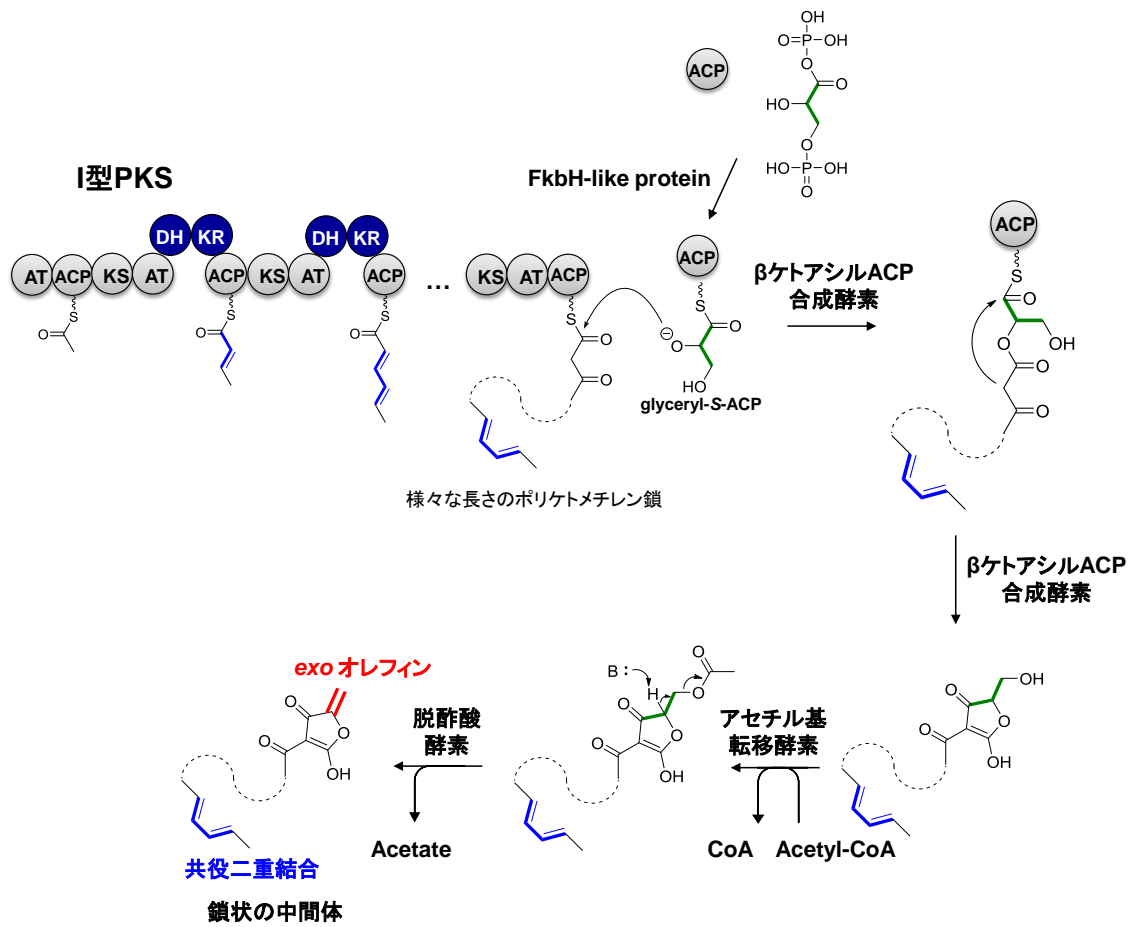


図 9 テトロン酸とスピロテトロン酸化合物に共通した生合成機構

Fkb-H like protein によって 1,3-glycerol-diphosphate と ACP を基質として、glyceryl-S-ACP が形成する。次に β-ケトアシル ACP 合成酵素により、glyceryl-S-ACP の水酸基がアシル鎖に求核攻撃を行うことで PKS の ACP から切り出される。切り出されたアシル ACP は分子内 Claisen 縮合 (Dieckmann 環化) によって ACP から切り出され、テトロン酸構造が形成される。さらに agglomerin の生合成経路の解析から、水酸基に対してアセチル化、脱酢酸反応が行われることで、exo オレフィンを持つ中間体が形成する。

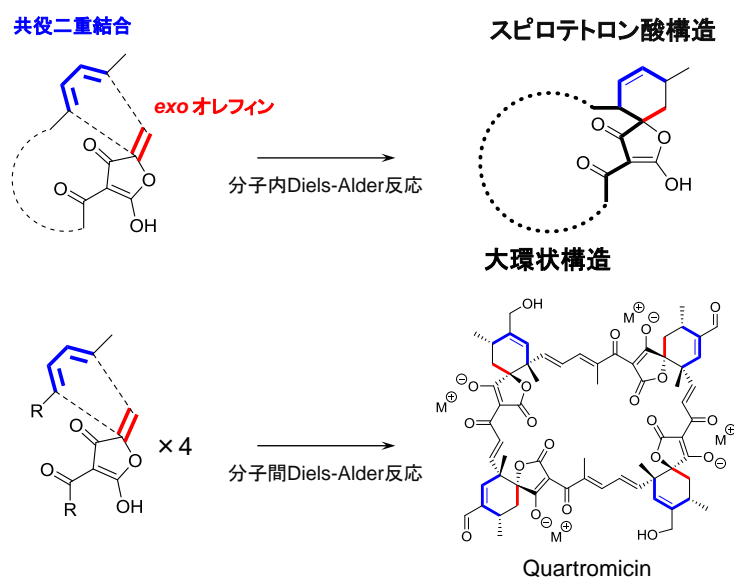


図 10 スピロテトロン酸化合物の生合成過程で起こると考えられる[4+2]環化付加反応
 上段: 多くのスピロテトロン酸化合物の生合成において起こる分子内 Diels-Alder 反応
 下段: Quartromycin の生合成に見られる分子間 Diels-Alder 反応。分子間での Diels-Alder 反応が 4 回起こり、大環状構造が形成されると考えられている。

生合成を模倣したスピロテトロン酸化合物の合成研究

これまでに、abyssomicin および chlorothricin については生合成経路を模倣した [4+2]環化付加反応を鍵反応としたアグリコン部の合成が達成されている。それぞれについて述べる(図 11)。

Abyssomicin の合成は Zou ら⁶⁷と Sorensen ら⁶⁸のそれぞれによって報告されており、いずれの場合も 80%近い収率で目的の立体化学の化合物を取得している。Zou らは 25°C で 7 日保温すると 40%の収率で生成物が得られるため、生合成経路においても酵素なしで反応が進行すると予想した⁶⁷。また、Sorensen らは遷移状態の立体配座について HF/3-21G による計算から図 11B のような立体配座で反応が進行することを示した⁶⁸。

一方、chlorothricin のアグリコン部である chlorothricolide の合成は Yoshii らによって報告された⁶⁹。o-dichlorobenzene 中にて 180°C で 7.5 h 反応させ、立体の異なる 4 種の生成物の混合物が得られた⁶⁹。面選択性は反応物の decalin 部位のコンフォメーションによって決定されていると考えられる。また、スピロテトロン酸部の *exo/endo* 選択性は 1 対 2.4 と *endo* 付加体が優先であることが示された。*endo* 体が選択的な理由は二次軌道間相互作用、または立体配座による影響のためと述べられている。⁶⁹

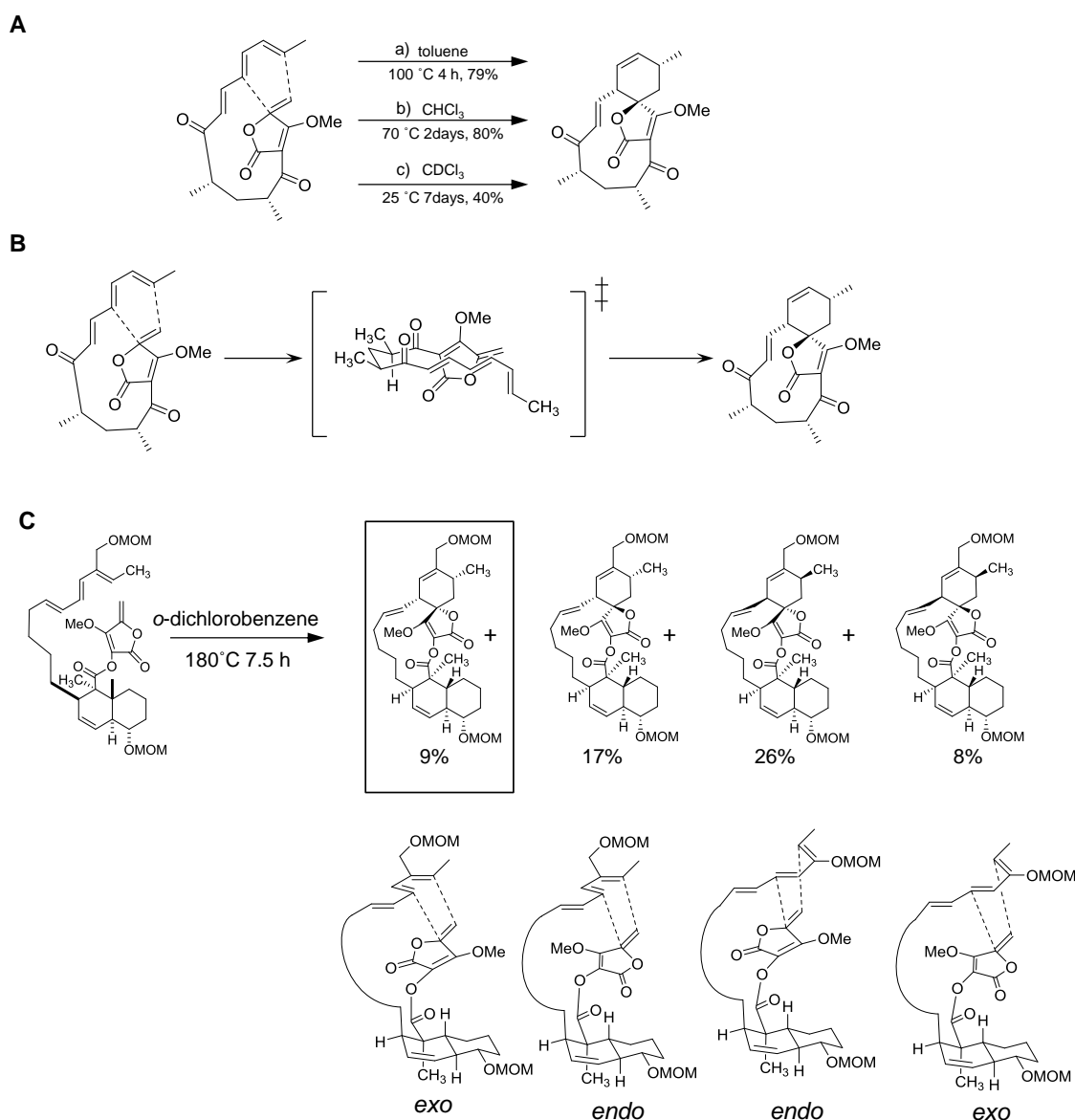


図 11 Abyssomicin と chlorothricin のアグリコンの合成研究において用いられた分子内 [4+2] 環化付加反応の例

A. Abyssomicin の合成。a)⁶⁸ と b)⁶⁷ のどちらの条件でも約 80%の収率で abyssomicin と一致する立体化学を持つ化合物が形成する。c)の 25 °C の条件でも 40%の収率で得られたため、abyssomicin の生合成においても同様な非酵素的な環化反応が進行することが予想された。

⁶⁷**B.** HF/3-21G による計算から遷移状態の立体配座を示した。生成物の立体化学は[4+2] 環化付加反応を受ける反応物によって規定されると考えられる⁶⁸。**C.** [4+2] 環化付加反応を鍵反応とした chlorothricin アグリコン部の合成の例。各生成物に対応する遷移状態のコンフォメーションを下に示した。chlorothricin と一致する立体化学の生成物を枠で囲った。共役ジエンと求ジエン体の面選択性は *trans*-decalin 部の立体によって制御されていると考えられる。

69

[4+2] 環化付加反応を触媒する酵素の例

スピロテロン酸化合物の生合成において見られた、Diels-Alder 反応はその高い反応性と高度な立体選択性のため、合成化学における 6 員環構築に広く用いられる反応である。一方で、天然物の生合成経路の中には数多くの Diels-Alder 反応のような [4+2] 環化付加反応によって形成されると考えられるシクロヘキセン骨格を持つ天然化合物が多数単離され、これらの骨格形成には、Diels-Alder 反応を触媒する酵素”Diels-Alderase”が存在することが示唆されてきた⁷⁰。一方で、Diels-Alder 反応は非常に進行しやすい反応であるため、生体内における非酵素的な環化反応を伴って天然物が形成される例も知られており⁷¹、実際に”Diels-Alderase”を単離した例はいまだ少ない。

本研究に着手する以前、Diels-Alder 反応のような[4+2]環化付加反応を触媒する酵素のうち、生化学的に解析されたものは次に挙げる 5 例、即ち、ソラナピロン合成酵素 (SPS)、マクロフォミン酸合成酵素 (MPS)、リボフラビン合成酵素、ロバスタチン生合成における LovB、SpnF のみであった。以下にそれぞれの詳細を述べる (図 12)。

Solanapyrone はジャガイモ夏疫病菌が生産する植物毒素である。その生合成過程において、最初の Diels-Alderase の報告例となるソラナピロン合成酵素 (SPS) が見出された⁷²。組換え酵素を用いた試験の結果、presolanapyrone I が、SPS による末端水酸基の酸化を受け presolanapyrone II へと変換された後、分子内 [4+2] 環化付加反応により decalin 構造が形成され、solanapyroneA が形成することが明らかにされた (図 12)⁷³。

ロバスタチン生合成酵素 (LovB) はロバスタチン生合成に関与する真菌由来の繰り返し型の I 型ポリケタイド合成酵素である⁷⁴。LovB は通常のポリケタイド生合成と同様に、malonyl-CoA を基質に炭素鎖伸長反応を繰り返して ACP と結合したアシル中間体を形成する。形成したアシル中間体が LovB の作用により [4+2] 環化付加反応を触媒され、trans-decalin 構造を形成する⁷⁵。

SPS と LovB の[4+2] 環化付加反応の基質はその高い反応性のために、酵素なしの条件でも非酵素的な環化付加反応による産物が生じることが示されている。酵素を加えることによって、立体選択的な反応が触媒され、最終産物と同じ立体化学の化合物が形成する。

マクロフォミン酸合成酵素 (MPS) は真菌 *Macrophoma commlinae* が生産するマクロフォミン酸の生合成過程にて、2-pyrone と oxaloacetate を基質とし、脱炭酸を伴う環化反応により、マクロフォミン酸を形成する^{76, 77}。MPS については X 線結晶構造解析によって構造が解かれ、2-pyrone と pyruvate が活性中心へと結合することが示された⁷⁸。しかしこの酵素の反応過程には 2 回の脱炭酸反応が含まれるため、脱炭酸の後、Michael 付加に続いて Aldol 縮合が起こり、段階的に C-C 結合が形成される反応機構も考えられる。この可能性について計算科学による反応過程のエネルギー計算⁷⁹ と、さまざまな基質を用いた酵素の機能解析により検討され、MPS は Diels-Alder 反応ではなく、Aldol 縮合を触媒する Aldolase であることが示された⁸⁰。

リボフラビン合成酵素は、一次代謝産物である riboflavin の生合成において、2 分子の 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine の間で [4+2] 環化付加反応を引き起こす。しかしながら、その詳細な反応メカニズムは明らかになっていない。2つの反応経路が推定できる。もし [4+2] 環化付加反応を経由するならば、その前に脱プロトン化反応が触媒されることが推定される⁸¹。

Spinosyn 生合成中の [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素 SpnF は、[4+2] 環化付加反応のみを触媒する酵素であることが初めて証明された。反応性の高い基質を用いるため、SpnF を加えない条件においても [4+2] 環化付加反応によって反応産物が形成する。しかし酵素を加えた場合には非酵素的な 1 次反応の反応定数の 500 倍 ($k_{\text{cat}}/k_{\text{non}}$ 比) も加速されることが酵素動力学試験によって示された⁸²。

特筆すべきこととして、これらの酵素は互いにアミノ酸配列上の相同性を持たない。SPS は FAD 結合型酸化還元酵素、マクロフォミン酸合成酵素は HpcH_HpaI aldolase、リボフラビン合成酵素は Lumazine 結合ドメインを 2 つ持つタンパク質、ロバスタチン生合成における LovB はポリケタイド合成酵素、SpnF は *O*-メチルトランスフェラーゼと相同性を示す。このことから、既知のタンパク質との配列相同性から [4+2] 環化付加反応を見出すことは難しいと考えられる。SpnF を除いた酵素については酵素動力学的な解析も報告されていない。酵素の多くは二機能性であり、酸化や脱炭酸などを触媒する過程、もしくは反応を終えた際に基質が同じ活性中心内で [4+2] 環化付加反応が引き起こされる。

[4+2] 環化付加反応の触媒機構は次に述べる 2 つの作用によるものと推定されている。まず 1 つ目として、多くの Diels-Alderase の基質は求ジエン体と共役したカルボニル酸素を持つ。酵素内の金属、もしくはアミノ酸残基がこのカルボニル酸素に対して Lewis 酸として働くことで求ジエン体の最低被占有軌道 (Lowest Unoccupied Molecular Orbital, LUMO) のエネルギー準位を下げ、Diels-Alder 反応が進行しやすくなることが推定できる⁸³。もう 1 つは疎水的な作用によって基質の立体配座を制御し、求ジエン体と共役ジエンとを反応が起こりやすいような配向で近づけると推定されている⁸⁴。これまでに、MPS と SpnF についてはその結晶構造が解かれている。しかし、MPS は前述したように Michael 付加と Aldol 縮合を触媒する Aldolase であった。また SpnF は基質となる化合物が結晶内に入っていない apo 体の構造のみしか報告されていない。Apo 体の構造を元に反応経路についての計算結果が示された⁸⁵が、SpnF による [4+2] 環化付加反応の詳細は実験的には明らかにされていない。

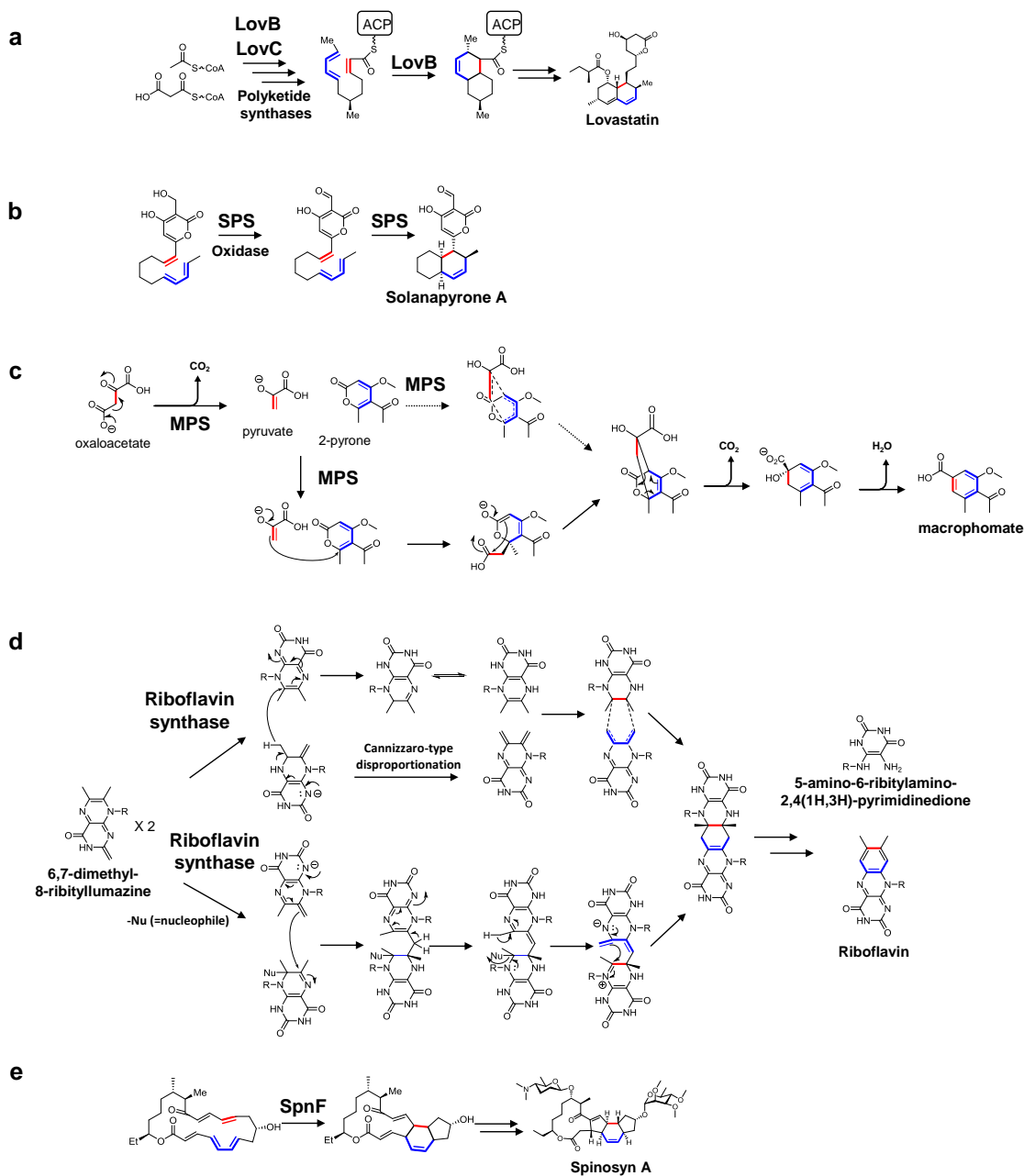


図 12 本研究が行われる以前に生化学的に解析された [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素の例

a. LovB によるポリケタイトドの伸長反応と続く *trans*-decalin 環構築のための [4+2] 環化付加反応。**b.** SPS による酸化反応と続く *trans*-decalin 環構築のための [4+2] 環化付加反応。**c.** MPS による [4+2] 環化付加反応。発見当初提唱された Diels-Alder 反応を経由する反応経路を点線で示し⁷⁶、Michael 付加とアルドール縮合による反応経路を実線で示した⁷⁹。**d.** riboflavin synthase による [4+2] 環化付加反応を介したリボフラビン合成。反応機構は 2 通り考えられるため、両者を併記した⁸⁴。**e.** Spinosyn 生合成における SpnF による [4+2] 環化付加反応。

bafilomycin の構造と類縁体、およびその生物活性と作用機序

Bafilomycin (BFM) は特徴的な 16 員環マクロライド構造を持つ化合物であり、放線菌 *Kitasatospora setae* KM-6054 株によって生産される (図 13)。Bafilomycin B₁ は 1981 年に Omura らによって、setamycin として発見されたが化学構造の決定には至らなかった⁸⁶。その後 Werner らによって BFM A₁、B₁、C₁ の構造が報告された⁸⁷。本論文において BFM A、BFM B、BFM C は bafilomycin A₁、bafilomycin B₁、bafilomycin C₁ を指す。BFM は plecomacrolide 化合物に含まれる。Plecomacrolide とは共役ジエンを持つ 16 員環、または 18 員環マクロライド構造とヘミケタール環とが炭素数 3 のスペーサーによって結合した構造の総称で、BFM の他に concanamycin A、virustomycin A などが知られている。

生体膜上には 3 つのタイプの異なる ATPase (P-ATPase、F-ATPase、V-ATPase) が存在する。BFM はこのうち V-ATPase の活性を選択的に阻害する⁸⁸。そのため、ATPase のタイプを調べる際には、生化学試薬として BFM A による *in vitro* での阻害活性値が利用されている。V-ATPase は真核生物のエンドソームやリソソームなどの細胞内小器官、植物やカビの液胞内の pH を下げる働きをしている。V-ATPase が阻害されると、オルガネラ内の pH が下がらず、オルガネラ内の酵素活性が低下する⁸⁹。V-ATPase と BFM の相互作用の作用点が報告され、BFM は V-ATPase の V₀ 複合体のサブユニット a と c の間に結合することでその活性を阻害すると報告されている⁹⁰。Bafilomycin は抗真菌活性、抗原虫活性、抗グラム陽性菌活性を示し、抗菌活性は BFM A < BFM B < BFM C の順に強くなることが知られており、側鎖構造が活性に関与していることが推察できる⁹¹。

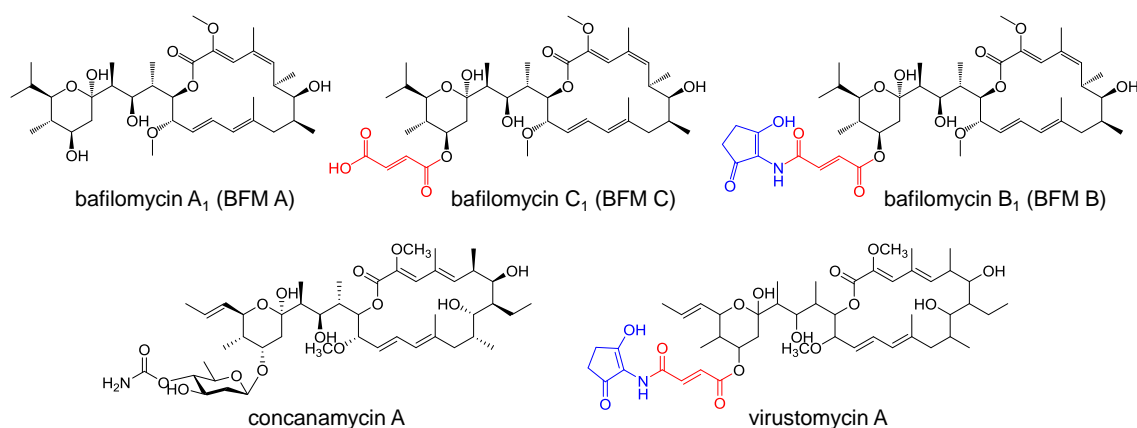


図 13 BFMA、BFMB、BFMC の構造と、plecomacrolide 化合物である concanamycin A と virustomycin A の構造

フマル酸由来の構造を赤、C₅N unit を青で示した。

BFM の推定生合成経路

BFM 生産菌である *Kitasatospora setae* KM-6054 株の全ゲノム配列解析が行われ、bafilomycin の生合成遺伝子クラスター領域が推定されている (表 2)⁹²。さらに、*Kitasatospora setae* KM-6054 株で作製した BAC クローンを用いて、*S. avermitilis* SUKA 22 を宿主とした異種発現が達成されている³⁹。また、*S. griseus* DSM 2608 と、*S. lohii* から bafilomycin の生合成遺伝子クラスターが報告されている^{93, 94}。*Kitasatospora setae* KM-6054 株の BFM 生合成遺伝子クラスター領域を表 2 に示した。PKS である BfmA1 から BfmA5 によって基本骨格である BFM A が形成した後、*bfmIJ* によるフマル酸エステルの付加反応によって BFMA から BFMC へ変換されること、*bfmKLM* による C₅N unit の付加反応によって BFM C から BFM B へ変換されることが本研究室の沼田淳による遺伝子破壊実験と生物変換実験によって示唆されていた (図 14)⁹⁵。

BFM C から BFM B への C₅N unit の付加反応については、分子内に C₅N unit を持つ化合物 ECO-02301 での C₅N unit 生合成遺伝子の解析との類推から次のように推定された⁹⁶。まずグリシンとスクシニル CoA の縮合反応を BfmK が触媒してアミノレブリン酸が生成する。形成したアミノレブリン酸に対し、BfmM による CoA 付加によって形成アミノレブリン CoA が形成する。次に BfmK が環化反応を行い C₅N ユニットが生成し、最後にアミド合成酵素である BfmL により、BFM C と C₅N unit との間でアミド形成反応が触媒されて BFM B が形成する。

一方、BfmIJ による BFMA から BFMC への変換反応については組換え酵素による *in vitro* 試験によって、BFM A から BFM C への変換には BfmIJ が関与することが示された⁹⁵が、各酵素単独の機能については明らかにならなかった (図 14)。

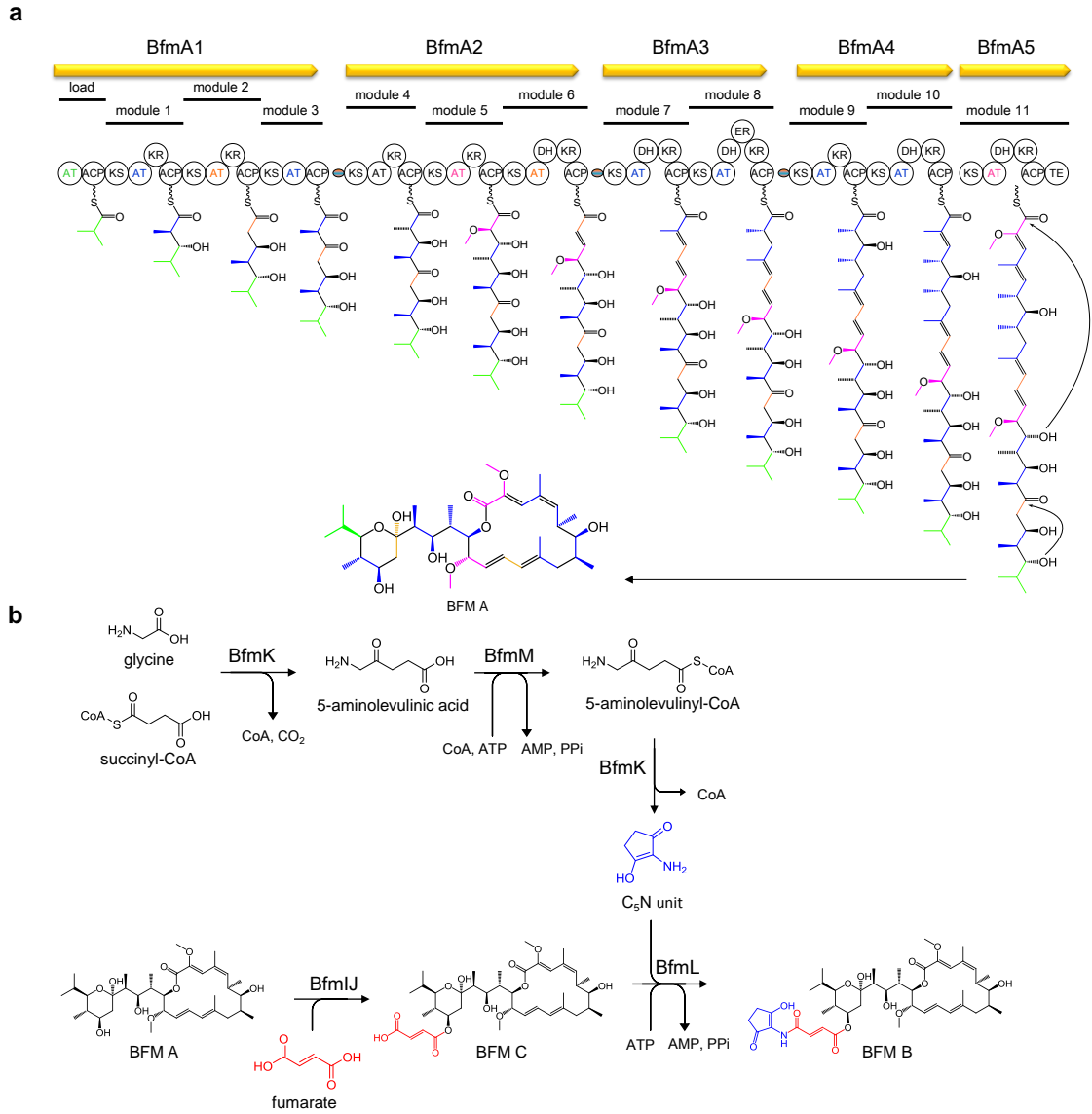


図 14 BFM の推定生合成経路

a. BFM A1 から BFM A5 までの PKS による BFM A への生合成。**b.** BFM A のフマル化による BFM C への変換反応と、BFM C への C₅N unit の付加による BfmB への変換反応。

本研究の目的と要約

本研究では、versipelostatin と bafilomycin の 2 つの中分子ポリケタイドについて、その生物活性を創出する修飾反応を担う酵素について解析し、活性創出の生合成マシナリーの解明を目指した。VST と BFM はそれぞれ、スピロテロン酸化合物、plecomacrolide 化合物に分類される。VST と BFM の生合成を例として、これらおよび類縁化合物の骨格がどのように生体内で形成されるのかについての知見を得ることを目指した。ポリケタイド合成酵素による炭素鎖の生合成についてはこれまでの知見からアミノ酸配列情報から生成物の構造がある程度可能なレベルへと到達している。一方で、多様な骨格形成に関与する修飾反応についてはその報告は少ないため、遺伝学、生化学的な解析をして初めてその機能が明らかとなる。放線菌についてのドラフトゲノム情報が豊富に得られる現在では、ある化合物の骨格形成に関与する修飾反応を明らかにすることは、その化合物の生合成機構について知見を得るのみならず、類似の生合成機構によって生合成される共通の構造を持った類縁化合物の探索にも利用できる知見となる。

本論文は 5 章構成から成る。

第 1 章、第 2 章、第 3 章ではスピロテロン酸化合物 VST の生合成について研究を行った。第 1 章ではまず VST 生合成遺伝子クラスター領域を異種発現によって同定した。100 kb を超す生合成遺伝子クラスターの異種発現の成功例はこれまでにわずかしか行われていない。4083-SVS6 株のゲノムライブラリから VST 生合成遺伝子クラスターを含む BAC クローンを取得し、*S. albus* J1074 株を宿主とした異種発現により、VST 生合成遺伝子クラスターを同定した。形質転換体は 4083-SVS6 株に匹敵する生産量を得ることができ、この株を用いて生合成遺伝子の解析を行った。

第 2 章では VST の生物活性に重要な糖構造を形成する糖転移酵素について解析を行った。VST 生合成遺伝子クラスター内に見出された 2 つの糖転移酵素 *vstH* と *vstI* について遺伝子破壊株の解析を行い、*vstI* が VST aglycone へ D-digitoxose を転移する酵素、*vstH* は L-olivose を転移する酵素であることが強く示唆された。また、各遺伝子破壊株の共培養によって、VST の生産が回復したことから、VST の側鎖糖構造 β -D-digitoxose-(1,4)- α -L-oleandrose-(1,4)- β -D-digitoxose の生合成過程で *vstI* が 2 つ存在する D-digitoxose 基の転移反応を共に担うことが強く示唆された。

第 3 章では、既知のスピロテロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターの比較解析により、スピロテロン酸の大環状化の鍵反応である [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素 VstJ を見出した。VstJ はわずか 142 アミノ酸から成り、機能既知のタンパク質と有意な相同性を示さなかった。*vstJ* の遺伝子破壊実験と組換え酵素を用いた *in vitro* 試験によって VstJ が 6 例目の [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素であり、フレキシブルな鎖状中間体の末端同士 [4+2] 環化付加反応を立体選択的に触媒することを示した。また既知の酵素とは異なり、この [4+2] 環化付加反応には VstJ が必須であることを示した。さらに VstJ の触媒機構の詳細

細に迫るため VstJ の立体構造について、モデリングを行い、VstJ が β バレル構造を取り、反応はバレル内部の疎水的なポケットで行われることが示唆された。

第 4 章では第 1 章で利用したドラフトゲノムシーケンスデータおよび、BAC ライブラリを利用して、VST 生産菌である 4083-SVS6 株のゲノム中に見出された 87.7 kb にわたる生合成遺伝子クラスターについて *S. lividans* TK23 株を宿主とした異種発現により新規ポリケタイド化合物 **6** が取得できた。この結果から長いインサートを持つ BAC ライブラリを作製し、これを異種発現することで、新規化合物を取得することが可能であることを示した。この戦略は今後新規中分子化合物を取得する基盤となると考えている。

第 5 章では BFM 生合成における BFMA から BFMC への変換反応を担う BfmI と BfmJ について組換え酵素を用いた解析を行い、各酵素単独の機能を推定した。*In vitro* での BfmJ による反応によって fumaryl-AMP に水分子が付加した 3''-hydroxy-succinyl-AMP が生成した。3''-hydroxy-succinyl-AMP は BfmI の基質として受け入れられなかったことから、BfmI の基質は fumaryl-AMP であることが示唆された。さらに BfmI と BfmJ を大腸菌で共発現させ、プルダウンアッセイを行った結果、両者が相互作用することが示された。これらのことから BfmI と BfmJ とは細胞内で相互作用し、ヘテロ複合体として機能することで水と反応しやすい中間体 fumaryl-AMP を受け渡し、BFMA のフマル酸エステル化反応を触媒していることが示唆された。

第 1 章 異種発現による versipelostatin の生合成遺伝子クラスターの
同定

第1章 異種発現による versipelostatin の生合成遺伝子クラスターの同定

VST は *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6 株が生産する 17 員環マクロサイクリック化合物である。VST はマクロサイクリック化合物であるため、I 型 PKS によって生合成されること考えられる。本章では 100 kb を越えることが予想される生合成遺伝子クラスターについて bacterial artificial chromosome (BAC) ベクターである pKU503D³⁹ を用いて DNA ライブラリを作製し、その全長の取得を行った。pKU503D 上には放線菌染色体への組込サイトである attB と ϕ C31 インテグラーゼがコードされており、取得した VST 生合成遺伝子クラスターを含む BAC を異種放線菌へと導入することができる。このシステムを用いて異種生産による VST 生合成遺伝子クラスター領域の同定を目指した。

第1節 ドラフトゲノムシーケンスからの推定 VST 生合成遺伝子クラスター領域の探索と各遺伝子の機能予想による推定生合成経路

方法

共同研究者の産業技術総合研究所の新家一男博士から分与された 4083-SVS6 株のドラフトゲノムシーケンスデータを利用した。国立遺伝学研究所の MiGAP (<https://migap.lifesciencedb.jp/mgap/jsp/index.jsp>) および BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) を利用し、各遺伝子についての機能予測を行った。ドラフトシーケンスデータの一部には、判読不明な塩基配列が存在したため、生合成遺伝子クラスターの完全な塩基配列については、次節で取得した VST 生合成遺伝子クラスター領域全長を含む BAC クローン、pKU503DverP10N24 の PacBio シーケンスと、部分的なクローニングによる配列解析により全長の遺伝子配列を取得した (Accession number: LC006086)。

結果

表 1-1 に示した 4083-SVS6 株のドラフトゲノムシーケンスを取得した。ドラフトシーケンス内で PKS 遺伝子を中心とした 100 kb 以上の遺伝子クラスターのうち、糖転移酵素を 2 つ以上持つものを精査したところ、図 1-1 に示した I 型 PKS を中心とする全長 108 kb の推定 VST 生合成遺伝子クラスター領域を見出した。各遺伝子の機能予測について表 1-2 に示した。VST 生合成を担うポリケタイド合成酵素 VstA1 から VstA5 については配列情報から基質および中間体について推定した (図 1-2 から図 1-5)。VstA1 の最初のモジュールには、活性中心の Cys 残基が Gln 残基へと置換された KSQ ドメインが存在したため²⁴、この KSQ ドメインに依り、マロニル CoA を基質として脱炭酸を伴ってモジュール 1 の ACP に対して行われることで開始基質がロードされることが推定された (図 1-6)。

各モジュールの AT ドメインの基質認識に関与する残基について、既知の PKS と比較した⁹⁷。まず、各モジュールの基質認識に関与する AT ドメインについて、基質認識に関与する残基について比較し、基質となるアシル-CoA の推定を行った。その結果、loading モジュール、モジュール 3、9、10、13 についてはマロニル CoA を、モジュール 1、2、4、5、6、8、11 については、メチルマロニル CoA、モジュール 7 と 12 についてはエチルマロニル CoA を受け入れることが強く示唆された (図 1-2)⁹⁸。

また KR、DH、ER ドメインについてもアラインメントから比較を行った。

モジュール 13 の KR ドメインは NADPH 結合モチーフを持たず、さらに触媒活性に必要な K112、Y149、N153 も持たないことから不活性型と考えられた。VST の分子構造を考慮するとモジュール 11 の KR ドメインは活性型として作用していないことが示唆された (図 1-3)。KR13 以外の KR ドメインは LD(H)D 残基を持つことから D-configuration 特異的な立体で還元反応を触媒する (B1-type) ことが示唆された⁹⁹。この立体はポリケタイド上のアシル中間体における 19 位と 9 位の水酸基の立体化学が R 体であることと一致した (図 1-6)。

DH ドメインは触媒残基の His と Asp がすべてにおいて保存されていることが確認できた。一方で、モジュール 5 と 10 では、VST の構造で対応する二重結合が存在しないため、機能していないことが予想された (図 1-4、図 1-6)。DH による二重結合の形成時、多くの場合は、*trans* 体で二重結合が形成するが、稀に *cis* 体となる場合もある。上流の KR が B-type の場合には DH によって形成する二重結合はほぼ *trans* 体となる。¹⁰⁰ また、中間体と考えられる **1** において二重結合の立体はすべて *trans* 体であることが予想されることから、DH ドメインによって形成する二重結合は *trans* 体と推定した。

ER ドメインでも触媒残基が保存されていることを確認した。また立体に関与する Tyr 残基が Val へと置換されていたことから、ER ドメインによる還元反応の後の立体は D-体選択的であることが示唆された (図 1-5)。¹⁰¹

PKS によるポリケトメチレン鎖の合成の後にはテترون酸部位が形成される。テترون酸の生合成に関与する遺伝子群 (VstC1-C5) の作用によって PKS からの切り出しが行われる。と同時に、末端に二重結合を持つ鎖状の化合物 **1** が形成すると予想された。その後、2 回の分子内 Diels-Alder 反応が連続して起こり、37-deoxy VST aglycone が形成し、最後にシトクロム P450 と相同性を示す VstD および ferredoxin と相同性を持つ VstE によって、37 位のメチル基に水酸化が起こることで VST aglycone が形成すると推定した。VST aglycone の推定生合成経路を図 1-6 に示した。

次に糖鎖部位の基質の糖ヌクレオチド生合成遺伝子について解析した。oleandomycin を始め、spinocyn¹⁰²、tylosin¹⁰³、mycinamicin¹⁰⁴ などの環状マクロライドの生合成において、デオキシ糖へのメチル基転移反応は、糖転移反応の後に行われることが生化学的に示されている。VstB6 は spinocyn 生合成において rhamnosyl 基が転移された後のメチル基転移反応を触媒する SpnI¹⁰² と 47% の相同性を示すため、VST の oleandrosyl 基の 3'' 基のメチル化についても、L-olivose が転移された後、メチル基転移酵素である VstB6 による O-メチル化によって

L-oleandrosyl 基へ変換されると推定した。

TDP-L-olivose の生合成についての先行研究¹⁰⁵⁻¹⁰⁷を参考に、糖ヌクレオチドである TDP-D-digitoxose および TDP-L-olivose の生合成経路を示した。デオキシ糖の生合成における最初の 2 反応、glucose-1-リン酸 (Glucose-1-P) へのチミジル基の転移反応と、続く TDP-glucose からの 4 位と 6 位の脱水反応は共通の初発反応である。VST 生合成遺伝子クラスター内にはそれぞれを触媒する VstB7 と VstB8 とが存在した。その後の反応は図 1-7 に示した経路で TDP-D-digitoxose と TDP-L-olivose が形成されると推定した。糖転移酵素は VstH と VstI の 2 つが見出された。VST の糖鎖は β -D-digitoxose-(1,4)- α -L-oleandrose-(1,4)- β -D-digitoxose の 3 糖から成るため、D-digitoxose の転移反応を担う糖転移酵素は 2 回はたらくと推定した (図 1-7)。

表 1-1 4083-SVS6 株のドラフトシーケンス結果

総コンティグ数	163
総コンティグ長 (Mb)	11.4
コンティグ長の中央値 (kb)	350.5
最大コンティグ長 (kb)	1171.7
総スカフォールド数	19
スカフォールド長の中央値 (kb)	1119
最大スカフォールド長 (kb)	1753

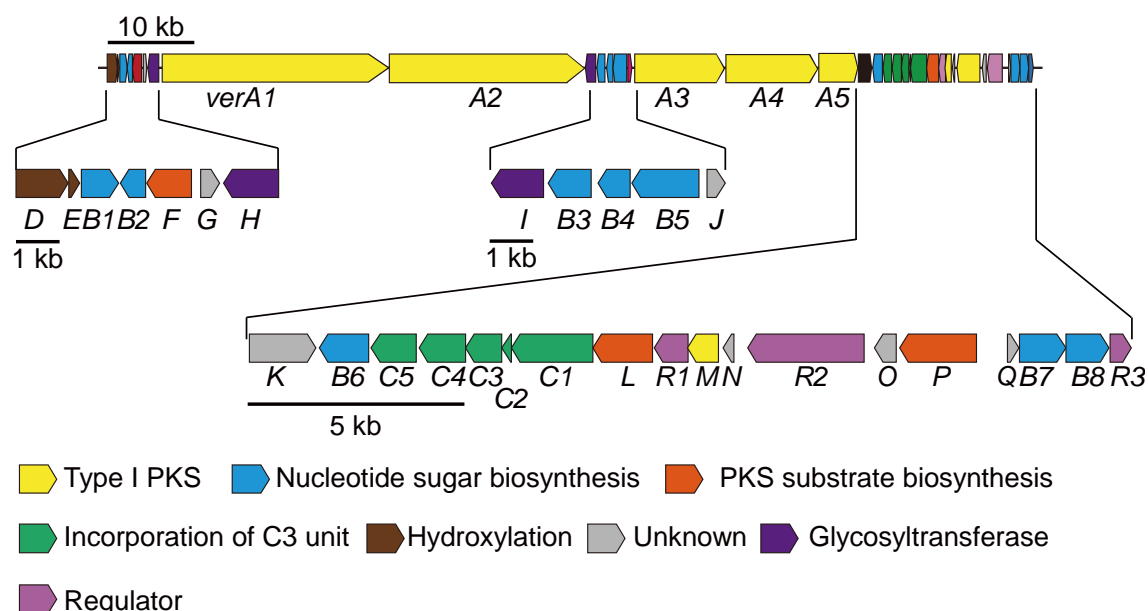


図 1-1 VST 生合成遺伝子クラスター

表 1-2 VST 生合成遺伝子クラスター内の各遺伝子の推定機能

Gene	Amino acids (aa)	Proposed function	Blast hit protein [Origin]	Identity/ Similarity (%)	Accession number
-3	283	rRNA methyltransferase	rRNA methyltransferase [<i>Streptomyces albulus</i>]	77/80	WP_016574500
-2	136	Transcriptional regulator	MerR family transcriptional regulator [<i>Saccharomonospora cyanea</i>]	62/67	WP_005452765
-1	416	MFS transporter	MFS transporter [<i>Saccharomonospora cyanea</i>]	63/73	WP_005452767
D	405	Cytochrome P450 hydroxylase	Cytochrome P450 hydroxylase [<i>Streptomyces sp. Amel2xE9</i>]	68/76	WP_019983477
E	87	Ferredoxin	Ferredoxin [<i>Streptomyces sp. 303MFC05.2</i>]	52/59	WP_020127680
B1	288	dTDP-sugar reductase	dTDP-4-dehydrorhamnose reductase [<i>Streptomyces sp. HGB0020</i>]	64/68	WP_016430997
B2	195	dTDP-sugar 3,5-epimerase	TDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase, partial [<i>Streptomyces peucetius ATCC 27952</i>]	64/70	ACR46366
F	349	3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III	3-Oxoacyl-(acyl carrier protein) synthase III [<i>Streptomyces sp. C</i>]	64/68	WP_007269134
G	146	Unknown	Cyclase/dehydrase [<i>Frankia sp. Eu11c</i>]	23/27	WP_013422986
H	419	Glycosyltransferase	KijA4 [<i>Actinoadura kijaniata</i>]	45/54	ACB46466
A1	8883	Type I PKS	AmphC [<i>Streptomyces nodosus</i>]	36/40	ACB46488.1
A2	7529	Type I PKS	Polyketide synthase [<i>Streptomyces aizunensis</i>]	47/53	AAZ98191
I	403	Glycosyl transferase	ChlC7 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	43/51	AAZ77672
B3	331	dTDP-sugar 2,3-reductase	TylCII [<i>Streptomyces fradiae</i>]	62/69	AAD41821
B4	249	NDP-sugar 4-ketoreductase	UrdR [<i>Streptomyces fradiae</i>]	50/56	AAF72551
B5	516	dTDP-sugar 2,3-dehydratase	PyrC8 [<i>Streptomyces rugosporus</i>]	50/58	AFV71305
J	142	unknown	Putative ribosomal protein L15P [<i>Streptomyces sp. NRRL 11266</i>]	18/25	BAF73716
A3	3589	Type I PKS	ChlA3 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	34/38	AAZ77696.1
A4	3617	Type I PKS	KijS1 [<i>Actinoadura kijaniata</i>]	29/32	ACB46488
A5	1571	Type I PKS	ChlA6 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	53/59	AAZ77699
K	514	FAD-dependent oxidoreductase	KijA [<i>Actinoadura kijaniata</i>]	47/52	ACB46484
B6	378	Sugar O-methyltransferase	SpnI [<i>Saccharopolyspora spinosa</i>]	40/47	AAG23270
C5	343	3-Oxoacyl-ACP synthase III	RkD [<i>Streptomyces sp. 88-682</i>]	51/60	ACZ65477
C4	362	Dehydratase	ChlD4 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	52/59	AAZ77706
C3	276	Acyltransferase	ChlD3 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	59/64	AAZ77705
C2	75	Acyl carrier protein	ChlD2 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	48/59	AAZ77704
C1	630	FKbH-like protein	ChlD1 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	59/64	AAZ77703
L	458	Crotonyl-CoA reductase	Crotonyl-CoA reductase [<i>Streptomyces lasaliensis</i>]	75/80	CAQ64684

<i>R1</i>	256	SARP family regulator	Chf2 [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	60/69	AAZ77687
<i>M</i>	242	Type II thioesterase	ChkK [<i>Streptomyces antibioticus</i>]	52/57	AAZ77688
<i>N</i>	84	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Micromonospora sp. L5</i>]	43/55	WP_013477259
<i>R2</i>	896	Transcriptional regulator	LuxR family transcriptional regulator [<i>Salinispora tropica</i>]	38/46	WP_028568330
<i>O</i>	164	Hypothetical protein	YD repeat protein [<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029]	5/7	WP_018412297
<i>P</i>	589	Dehydrogenase	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase [<i>Frankia sp. Eu11c</i>]	55/61	WP_020866330
<i>Q</i>	86	Unknown	Hypothetical protein [<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877]	33/38	CAI78105
<i>B7</i>	355	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase	Glucose-1-phosphate thymidyltransferase [<i>Streptomyces peucetius</i> ATCC 27952]	82/88	ACR46363
<i>B8</i>	328	dTDP-sugar 4,6-dehydratase	TDP-D-glucose 4,6-dehydratase [<i>Streptomyces peucetius</i> ATCC 27952]	81/86	ACR46364
<i>R3</i>	161	Regulator	MarR-family regulatory protein [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	78/81	WP_007386486
+1	147	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Streptomyces hygrosopicus</i>]	63/68	WP_014670231
+2	123	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Streptomyces afghaniensis</i>]	80/85	WP_020273881
+3	115	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Chloroflexi bacterium oral taxon 439</i>]	7/10	WP_022848429

<i>E. coli</i> _FabD	63	92	201
AT_2_tautomycetin-M_ABI94379			
AT_1_oligomycin-M_BAC68125	RTGWAQ-GHSIGE-HAFH		
AT_3_versipelostatin-M	RTEWAQ-GHSIGE-HAFH		
AT_9_versipelostatin-M	HTRYTQ-GHSIGE-HAFH		
AT_10_versipelostatin-M	HTRYTQ-GHSIGE-HAFH		
AT_LM_versipelostatin-M	HTRYTQ-GHSIGE-HAFH		
AT_13_versipelostatin-M	QTLYTQ-GHSIGE-HAFH		
AT_2_avermectin-M_AB032367	DTRYTQ-GHSVGE-HAFH		
AT_1_pimaricin-M_CAB41041	QTRYAQ-GHSLGE-HAFH		
AT_2_chlorothricin-M_AAZ77693	QTAYTQ-GHSIGE-HAFH		
AT_2_lasalocid-M_BAG85026	DTLYTQ-GHSIGE-HAFH		
AT_4_niddamycin-MM_AAC46026	QTQYAQ-GHSIGE-HAFH		
AT_7_pimaricin-MM_CAC20921	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_2_oligomycin-MM_BAC68125	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_1_chlorothricin-MM_AAZ77693	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_11_concanamycin-MM_AAZ94390	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_1_tautomycetin-MM_ABI94379	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_5_niddamycin-EM_AAC46026	RVDVWQ-GHSQGE-TAGH		
AT_1_avermectin-MM_AB032367	RADVVQ-GHSQGE-YASH		
AT_1_erythromycin-MM_AAA26495	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_1_versipelostatin-MM	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_2_versipelostatin-MM	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_5_versipelostatin-MM	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_11_versipelostatin-MM	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_4_versipelostatin-MM	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_6_versipelostatin-MM	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_8_versipelostatin-MM	RVDVWQ-GHSQGE-YASH		
AT_7_versipelostatin-EM	RLDVWQ-GHSQGE-VPSH		
AT_12_versipelostatin-EM	RLDVWQ-GHSQGE-VPSH		
AT_1_lasalocid-EM_BAG85026	RIEILQ-GHSQGE-VASH		
AT_10_concanamycin-EM_AAZ94390	RIDVVQ-GHSQGE-VAGH		
AT_8_tautomycetin-EM_ABI94380	RVEVVQ-GASQGE-VATH		
AT_1_salinomycin-EM_CCD31890	RIEILQ-GHSQGE-VASH		

図 1-2 vst 生合成遺伝子クラスター内の I 型 PKS の各モジュールの AT ドメインと

既知の AT ドメインにおける、基質認識に関与するアミノ酸のアラインメント¹⁰⁸

化合物名の前の数字はモジュールの番号。化合物名の後ろの数字はアクセッションナンバーを示した。オレンジで示したドメインは malonyl-CoA、赤は methylmalonyl-CoA、青は ethylmalonyl-CoA を基質として認識する⁹⁸。

	1				50
KR1	GTVLITGGTG	TLGGVVARHL	VSEHGVRHLL	LTGRRGPEAP	GVPELRAELT
KR5	GTVLITGGTG	TLGTLARHL	VGEHGVRHLL	LASRRGPDAP	GAVELVAELT
KR2	GTVLITGGTG	TLGAAVACHL	VSEHGARHLL	LASRSGASAP	GALELEAELT
KR3	GTILITGGTG	TLATATARHL	VTQHGARHLL	LASRSGPNAP	GAHELQTELT
KR4	GTILITGGTG	TLATATARHL	VTHHGARHLL	LASRSGPNAP	GAHELQTELT
KR6	GTILITGGTG	TLATATARHL	VTHHGARHLL	LASRSGPNAP	GAHELQTELT
KR11	GTILITGGTG	TLATATARHL	VTQHGARHLL	LASRSGPNAP	GAHELQTELT
KR7	GTILITGGTG	TLGAAARHL	VHHGARHLL	LASRSGANAP	GALELEAELT
KR9	GTILITGGTG	TLGAAARHL	VSEHGARHLL	LASRSGPNAP	GALELEAELT
KR10	GTILITGGTG	TLATATARHL	VTHHGARHLL	LASRSGPNAP	GALELEAELT
KR8	GTILITGGTG	TLGAAARHL	VSEHGARHLL	LASRSGPNAP	GALELEAELT
KR12	GTILITGGTG	TLGAAARHL	VSEHGARHLL	LASRSGPNAP	GAHELEAELT
KR13	GTALVSGAAS	VLGGQVARWL	AGRGARRLLL	AVGAREAEAP	EVVKLSAELG
	51				100
KR1	EYGA EVTVA	CDTGDP EALA	ALLDAVPAEH	PLTAVVHAAG	VLDDAVTTSL
KR5	AHGAQVTLAS	CDTGDPDQLT	ALLAGVPAER	RLTAVVHTAG	ALDDAVIENL
KR2	AHGAHITLTA	CDTGDPDQLG	DLAAVPDDH	PLTAVIHTAG	VLDDAVLENL
KR3	AHGAHITLTT	CDTGNPDQLA	DLAAVPDDH	PLTAVIHTAG	TLHDATLHNL
KR4	AHGAHITLTT	CDTGNPDQLA	DLAAVPDDH	PLTAVIHTAG	TLHDATLHNL
KR6	AHGAHITLTT	CDTGNPDQLR	DLAAVPDDH	PLTAVIHTAG	TLHDATLDNL
KR11	AHGAHITLTT	CDTGNPDQLA	DLAAVPDDH	PLTAVIHTAG	TLHDATLHNL
KR7	AHGAHITLTT	CDTGNPTALQ	ELDAIPHDH	PLTAVIHTAG	TLHDATLDNL
KR9	AHGAHITLTT	CDTGNPTALQ	ELDAIPHDH	PLTAVIHTAG	TLHDATLHNL
KR10	AHGAHITLTT	CDTGNPTALQ	ELDAIPHDH	PLTAVIHTAG	TLHDAVLENL
KR8	AHGAHITLTT	CDTGNPDQLT	ALLNAIPDDH	PLTAVIHTAG	TLHDATLDNL
KR12	AHGAHITLTT	CDTGNPDQLR	DLAAVPDDH	PLTAVIHTAG	VLDDAVIENL
KR13	DLGA EVTVA	CDPADRAALA	GVLAGVPDGA	PLTAVVHVGA	AGEAGGVRAL
	101				150
KR1	TAQQLDTVLH	PKADA AWHLH	RLTRHQDLTA	FVLFSSVIGT	AGGAGQANVA
KR5	TAEQLETILR	SKAEAAWHLH	RLTKDLDLAA	FVLYSSLAGT	LGDAGAASVA
KR2	TPDHLAATLH	PKADA AWHLH	SLTKDLDLAA	FVLYSVAGT	LGSPGQAAVA
KR3	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTQNLDLAA	FVLYSSAAGT	LGNPGQAAVA
KR4	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTQNLDLAA	FVLYSSAAGT	LGNPGQAAVA
KR6	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTQHMLAA	FVLYSSAAGT	LGNPGQAAVA
KR11	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTQNLDLAA	FVLYSSAAGT	LGNPGQAAVA
KR7	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTKNLDLAA	FVLYSVAGT	LGSPGQAAVA
KR9	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTKNLDLAA	FVLYSSAAGT	LGNPGQAAVA
KR10	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTKNLDLAA	FVLYSSAAGT	LGNPGQAAVA
KR8	TPDHIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTQHMLAA	FVLYSSAAGT	LGSPGQAAVA
KR12	TPDRIDTVLH	PKADTAWHLH	HLTKNLDLAA	FVLYSVAGT	LGSPGQAAVA
KR13	..ERMDRALV	RDVA AVAHL	ELTGGADLRV	FTVFS SPSGL	...PGYGGGS
	151				180
KR1	AANVFLDALA	AHRHAQGLPA	TSVAWGLWAT		
KR5	AANSFLDALA	THRHADGLPA	MSLGWGFWDQ		
KR2	AANVFLDALA	THRHTHGLPA	TSLAWGLWEE		
KR3	TANVFLDALA	THRHTHGQPA	TSLAWGHWAQ		
KR4	TANVFLDALA	THRHTHGQPA	TSLAWGHWAQ		
KR6	AANVFLDALA	THRHTHGQPA	TSLAWGHWAE		
KR11	TANVFLDALA	THRHTHGLPA	TALAWDTSAE		
KR7	AANVFLDALA	THRHTHGLPA	TSLAWGYWAE		
KR9	TANVFLDALA	THRHTHGLPA	TSLAWGHWAE		
KR10	TANVFLDALA	THRHTHGQPA	TSLAWGLWEE		
KR8	AANVFLDALA	THRHTHGLPA	TSLAWGHWAE		
KR12	AANVFLDALA	THRHTHGLPA	TSLAWGLWEE		
KR13	VAEACVEALV	RGRRARGLPG	LSVLSGPLEE		

図 1-3 VstA1-VstA5 の各モジュールの KR ドメインのアラインメント¹⁰⁸

触媒残基を紫の網掛けで示した。黄色の網掛けで NADPH 結合モチーフを示した。アラインメントから、KR13 は NADPH 結合モチーフを持たず、さらに触媒活性に必要な K112、Y149、N153 も持たないことから、不活性であることが示唆され、このことは VST の構造とも合致した。KR13 以外の KR ドメインは水色で網掛けした LD(H)D 残基を持つことから D-configuration 特異的な立体で還元反応を触媒する (B1-type) ことが示唆され⁹⁹、ポリケタイド上のアシル中間体における 19 位と 9 位の水酸基の立体化学が R 体であることと一致した。VST の分子構造を考慮すると KR11 は活性型として作用していないことが示唆された。

```

DH_7      PTHHGQPTTHPLL TAAIHAADTHRTTLTGRINTTTHPYLTDHAVNGTPLLPGTAYLEMA 60
DH_12    PTHHGQPTTHPLL TAAIHAADTHRTTLTGRINTTTHPYLTDHAVNGTPLLPGTAYLDLA 60
DH_5      PTSLGLAATTHPFLGAIIDTAD-DRTLFTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 59
DH_11    PTSLGQRTTTHPLL GATIHTAD-DRTLTYTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 59
DH_8      PTALGQRTTTHPLL GATIETADDRVLFTRISLTAHAWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 60
DH_10    PTSLGQRTTTHPFLGAIIVETAGDRTLFTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 60
DH_2      PTSLGLAATTHPFLGAIIDTAD-DRTLFTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 59
DH_4      PTSLGQQSATHPLL GATIHTAD-DRTLFTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 59
DH_3      PTALGLAATTHPLL GATIHTAD-DRTLTYTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 59
DH_9      PTALGLAATTHPLL GATIHTAD-DRTLTYTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 59
DH_6      LAGLGLTATTHPFLGATIHTAD-DRTLTYTGRISLTTHPWLNDHAVAGTVILPGTAYLDLA 59
DH_1      VTSAGLDRSDHPMLGAASVAGDDGFVLTGRSLDTHPWIAHVVLDTVLLPGSAFAELA 60

DH_7      LHAADQVGLNHVEELVIEAPLTPENGVYDLQVTVGPADDGDRRPITVHSRPAITVSEGS 120
DH_12    LFAAAQVGLNHVEELALEAPLVLPERKDVDLQVTVGPDDGAGRRPLTIHSRPAAKPSAGG 120
DH_5      LHAATHGHTGIQELTLHQPLVLT-DTPVDLQVTVD----AQQQITIHSPAPTD--- 110
DH_11    LHTGQH----VQELTLHHPVLVT-DTPVDLQVTVD----AQQQITIHSPAPTD--- 104
DH_8      LHAADHTDHTGIQELTLHQPLVLT-DTPVDLQVTVD----AQQQITIHSPAPTD--- 111
DH_10    LHAADRMTGEVQELTIDSQLSLPEDGTVLQVTVDPAAADSGRQITIHSPAPSDP--- 117
DH_2      LHAATHGHTGIQELTLHQPLVLT-DTPVDLQVTVD----AQQQITIHSPAPTD--- 106
DH_4      LHAATHDHTGIQELTLHQPLVLT-DTPVDLQVTVD----SQQQITIHSPAPTD--- 110
DH_3      LHTATHDHTGIQELTLHQPLVLT-DTPVDLQVTVD----SQQQITIHSPAPTD--- 110
DH_9      LHTATHDHTGIQELTLHQPLVLT-DTPVDLQVTVD----SQQQITIHSPAPTD--- 110
DH_6      LHTGQH----VQELTLHHPVLVT-DTPVDLQVTVD----SQQQITIHSPAPTD--- 105
DH_1      LEAGAQAGCGRVEELVLEAPLALADDAHAVIQVTVGDPDEGHRPLAVHSRPAQN----- 114

DH_7      PDDAADLPWTRHATGTLTSTEE-----PPALDGDERSWPPADSSPLDLDFYERIAQH 173
DH_12    PDDASDIPWTRHATGTLTSTEE-----PPAE-GDEAWPPAGTAPIDLDFYERIAQH 172
DH_5      --DDADPAWTTTHATGQLTTETVS-----VAPDT-PTTWPPTNATPISLDGFYDHLA 160
DH_11    --DDADPTWTTTHATGQLTTDTP-----VPHET-ATTWPPPEATPIELDDHYDRFADI 154
DH_8      --DDADPAWTTTHATGQLTTTPPG-----TAPDT-PTTWPPTNATPISLDGFYDHTA 161
DH_10    --DEPG-TWTRHATGQLTTTPPG-----TAPDT-PTTWPPTNATPISLDGFYDHLADR 166
DH_2      ---DNDAAWTTTHATGQLTTDTVS-----TVPET-AAAWPPPGATPIALDGFYDHLADR 155
DH_4      --DDADPTWTTTHATGQLTTDTAS-----TVPET-AAAWPPPGATPISLDGFYDHLADR 160
DH_3      --DDADPTWTTTHATGQLTTDTAT-----DIPATDAAAWPPPLDAPISLDGFYDHLADR 161
DH_9      --DDADPTWTTTHATGQLTTDTAT-----DIPATDAAAWPPPLDAPISLDGFYDHLADR 161
DH_6      --DDADPTWTTTHATGQLTTDTVT-----DIPATDAAAWPPPDATPISLDGFYDHLADR 156
DH_1      --DSADRPWTRHATGTLSDGREGGGGGGNGAGVMESAWPPVGVAVPVDPSPGLYARLAEQ 172

DH_7      GYHYGPVFQGLTAAWQHEDSIYAEVTLPEGTD-----AGYGVHPALLDAA 219
DH_12    GYHYGPVFQGLTAAWNGDDHTCAEAALPEGTD-----AGYGIHPALLDAA 218
DH_5      GVDYGPVFQGLTAAWRDNELYAEVDLPEDTD-----TGYGIHPALLDAA 206
DH_11    GVDYGPVFQGLTAAWRHGNDLYAEVTLPEGTD-----TGYGIHPALLDAA 200
DH_8      GYHYGPAFQGLTAAWRHGNDLYAEVTLPEGTD-----TGYGIHPALLDAV 207
DH_10    GYHYGPAFQGLTAAWRHGNDLYAEVTLPEGTD-----TGHGIHPALLDAA 212
DH_2      GYHYGPAFQGLTAAWRHGDELHAEVTLPEGTD-----TGFVHPALLDAA 201
DH_4      GYHYGPAFQGLTAAWRHGNELHAEVTLPEGTD-----TGFVHPALLDAA 206
DH_3      GYHYGPAFQGLTAAWRHGNDLYSEVTLPEGTD-----TGFVHPALLDAA 207
DH_9      GYHYGPAFQGLTAAWRHGNDLYSEVTLPEGTD-----TGFVHPALLDAA 207
DH_6      GYHYGPAFQGLTAAWRHGNDLYAEVTLPEGTD-----TGYGIHPALLDAA 202
DH_1      GYVYGPVFQGLRAAWQLDGELEAEVDLPQDDAEPSVLAARSQDGRVAGAGFVHPALLDAT 232

DH_7      LHATTATVG-DDVYAGKVYLPFVMSGVTLHNTA-ASGTVRVHLTRPDDERISVRLRDESG 277
DH_12    LQGSLATLG-EDAMD-QVQLPFSWRGVTLHASG-P-AALRAHLTPGSDSIALRVLDGAG 274
DH_5      LQATTHPAFVGETGTATPVMPFVSWNGITLHTPT-TPTTLRAHLTPAGDTSFAIHLADSAD 265
DH_11    LQVSAHTSPTNEANT-TPVMPFVSWNGITLHTPT-TPTTLRAHLTPNTDSVAIALTSETG 258
DH_8      FHPLLT----TDDP-AIRLPFSWTGITLHTPT-TSTALRATITTTSDTTLTILHTDITG 261
DH_10    LHPLITNN--ADTDT-AIRLPFSWTGIALHATT-AATLRVRLTPTSDTTLAIHLDTSG 268
DH_2      LHPLLTNN--DTGT-EIRLPFSWTGITLHTTT-APTALRATITTTSDTTLTILHTDITG 256
DH_4      LHPLLTNT--DTGS-EIRLPFSWTGITLHTTTAASTLHVHLTPTSDTTLFAIALTSTG 263
DH_3      LHPLITNNNTADTDT-AIRLPFSWTGIALHATT-AATALRVHLTPTSDTTLAIHLDTSG 265
DH_9      LHPLITNNNTADTDT-AIRLPFSWTGIALHATT-AATALRVHLTPTSDTTLAIHLDTSG 265
DH_6      LHPLITNNNTNTDT-AIRLPFSWTGIALHATT-AATLRVHLTPTSDTTLAIHLDTSG 260
DH_1      LHALAVNGLLGEQG-EIRLPFSWTGVELHAAG--ATSVRVRITESGTDVAVTITDTAG 289

DH_7      EAVATVRAVAVRPIDPAKLAV 298
DH_12    QPVVTVDALTVRPLDTRRLAS 295
DH_5      ESILTIDALAVRPIDIDRFRA 286
DH_11    EPVATIQTLTVRPVDPQAQLTT 279
DH_8      EPVATIDALTVRPVDPQAQLAT 282
DH_10    QPIATIEALTVRPVDPQAQLTT 289
DH_2      EPVATIQGLTLRPIDAAQLAT 277
DH_4      EPVATIDALTVRPVDPQQLAA 284
DH_3      QPIATIEALTVRPVDPQAQLAT 286
DH_9      QPIATIEALTVRPVDPQAQLAT 286
DH_6      QPIATIEALTVRPVDPQQLAA 281
DH_1      VPVAVVESLTVRPSAQRLLGA 310

```

図 1-4 VstA1 から VstA4 の各モジュールの DH ドメインのアラインメント¹⁰⁸

触媒残基を紫の網掛けで示した。モジュール 5 と 10 では、VST の構造で対応する二重結合が存在しないため、機能していないことが予想された¹⁰⁸。

ER_4	TVDNLALVPHPTDITPLPPGHVRVAVHAAGINFRDLLVTLGMVDDPRPIGGEGAGTITA	60
ER_6	TVDNLALVPHPTDITPLPPGHVRVAVHAAGINFRDLLVTLGMVDDPRPIGGEGAGTITA	60
ER_3	TVDNLALVPHPADITPLPPGHVRVAVHAAGINFRDLLVTLGMVDDPRPIGGEGAGTITA	60
ER_4	APDVTDYQPGDRVMGLFPHTAPHITVHQHIIAPVPHLLTTAQAATTPVAFLTAYHALHH	120
ER_6	APDVTDYQPGDRVMGLFPHTAPHITVHQHIIAPVPHLLTTAQAATTPVAFLTAYHALHH	120
ER_3	APDVTDYQPGDRVMGLFPHTAPHITVHQHIIAPVPHLLTTAQAATTPVAFLTAYHALHH	120
ER_4	AHLQPGEKVLIHAGTGGVGMAAIQIARHLGADIYATAHPTKWPTLHHLGLDQHIIASSR	180
ER_6	AHLQPGEKVLIHAGTGGVGMAAIQIARHLGADIYATAHPTKWPTLHHLGLDQHIIASSR	180
ER_3	AHLQPGEKVLIHAGTGGVGMAAIQIARHLGADIYATAHPTKWPTLHHLGLDQHIIASSR	180
ER_4	LDFEHHFRITAPHGLDVIINSLAGEHTDASLRLLNPTTGRFIEMGKTDIREPAQLAAEH	240
ER_6	LDFEHHFRITAPHGLDVIINSLAGEHTDASLRLLNPTTGRFIEMGKTDIREPAQLAAEH	240
ER_3	LDFEHHFRITAPHGLDVIINSLAGEHTDASLRLLNPTTGRFIEMGKTDIREPAQLAAEH	240
ER_4	HLTYQAFDLITQTPPHIHHMLHHLTHLLTQHLLTLPVTTWDIRHTPHAFRHLSQARH	300
ER_6	HLTYQAFDLITQTPPHIHHMLHHLTHLLTQHLLTLPVTTWDIRHTPHAFRHLSQARH	300
ER_3	HLTYQAFDLITQTPPHIHHMLHHLTHLLTQHLLTLPVTTWDIRHTPHAFRHLSQARH	300
ER_4	GKLAL	306
ER_6	GKLAL	306
ER_3	GKLAL	306

図 1-5 VstA1 と VstA2 の ER ドメインのアミノ酸配列¹⁰⁸

触媒を担う Tyr 残基と Lys 残基を紫で示した。NADPH 結合モチーフを黄色の網掛けで示した。また、水色で示した位置の残基は、L-体を認識する ER である場合には Y 残基であることが結晶構造から明らかにされている⁹⁹。一方、VST の ER ドメインではすべて V 残基であったため、D-体選択的な還元反応を触媒することが予想された。6 位の立体はこれと一致した¹⁰⁸。

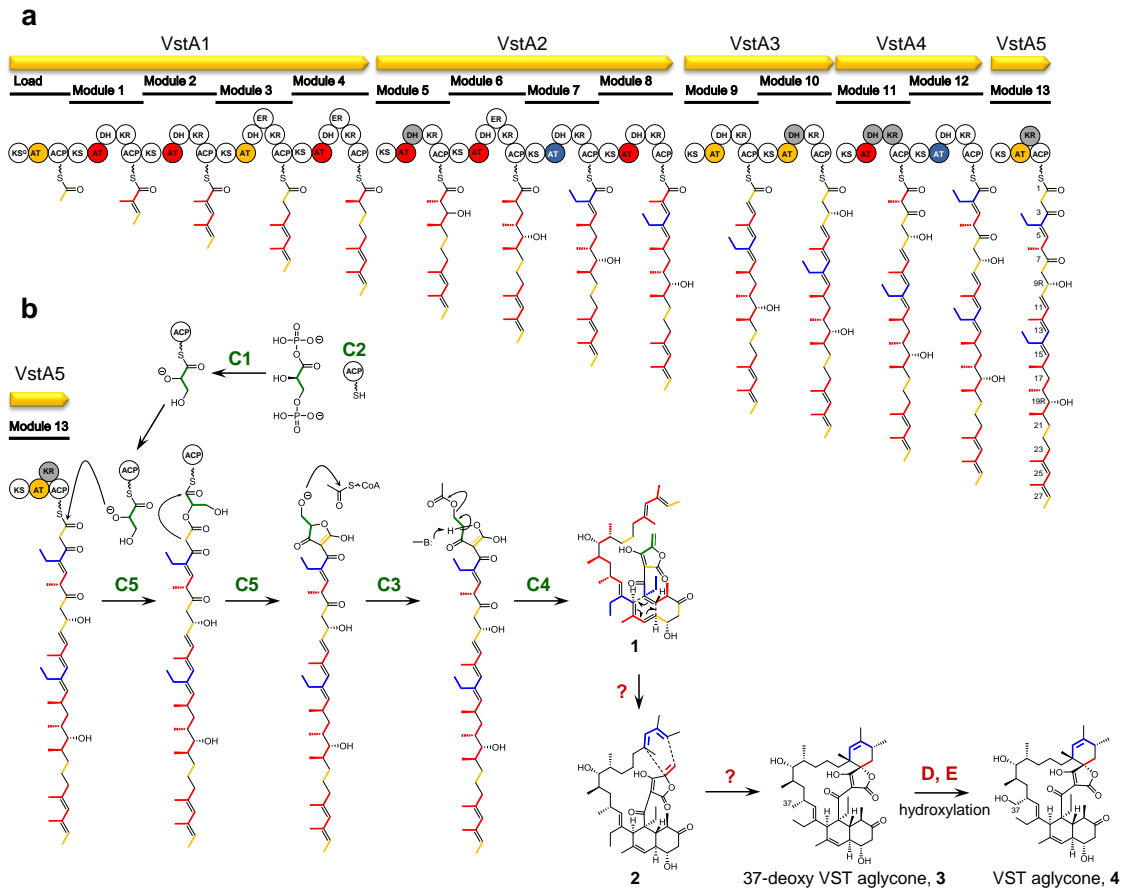


図 1-6 VST aglycone までの推定生合成経路

a. VstA1-A5 の生合成過程の予想されるアシル中間体の構造、各ドメインの配列情報と、VST の分子構造とを考慮し、VstA1-A5 の ACP と結合したアシル中間体の予想構造を図に示した。

b. VstA5 以降の生合成経路。テトロロン酸形成に関与する遺伝子群の作用によって PKS から切り出され **1** が形成する。次に、**1** の分子内 Diels-Alder 反応によって *trans*-decaline 構造を持った **2** が形成する。引き続いて 2 回目の分子内 Diels-Alder 反応が起こり、37-deoxy VST aglycone **3** が形成する。その後 37 位のメチル基が P450、ferredoxin それぞれと相同性を持つ VstD と VstE によって水酸化され、VST aglycone (**4**) が形成する¹⁰⁸。

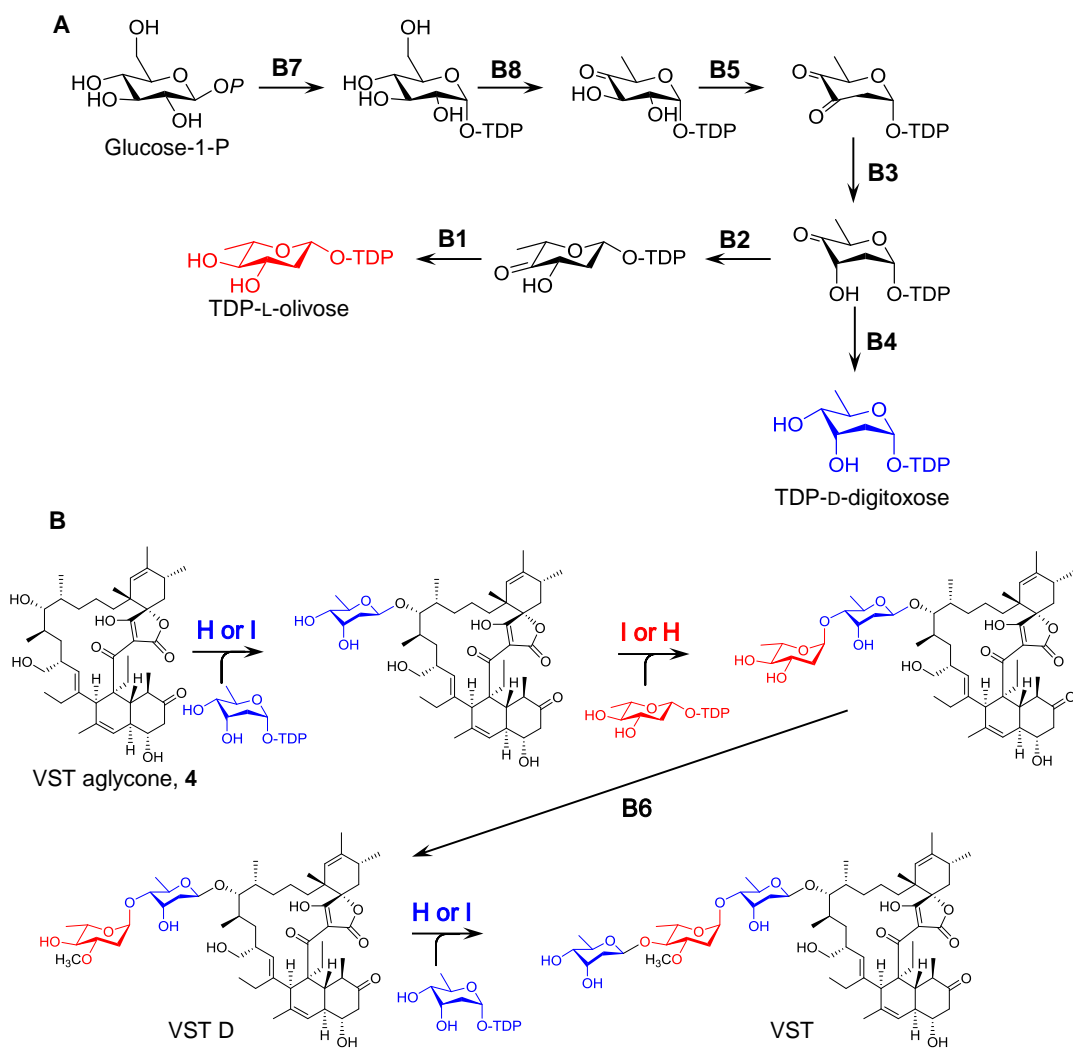


図 1-7 VST の糖鎖部位の推定生合成経路¹⁰⁸

a. デオキシ糖ヌクレオチドの生合成機構。糖ヌクレオチドの生合成経路は *oleandmycin* の推定生合成経路をもとに推定した¹⁰⁵⁻¹⁰⁷。b. VST aglycone 形成後の糖鎖形成反応の推定経路

第2節 Versipelostatin 生合成遺伝子クラスターの異種発現

第1項 BAC を用いた VST 生産菌の DNA ライブラリの作製と推定 VST 生合成遺伝子クラスターを含む BAC クローンの取得

実験方法

4083-SVS6 株の BAC ライブラリを作製した。BAC ライブラリ作製とスクリーニングの詳細は実験項に記した。384 穴プレートの各 well に 1 種の BAC クローンを持つ大腸菌グリセロールストックが含まれるプレートを得た。ヒットクローンとして表 1-3 に示したプライマー vst5F と vst5R、vst6F と vst6R を用いて PCR により増幅が見られるクローンを VST 生合成遺伝子クラスターが含まれたものとして取得した。

表 1-3 スクリーニング用プライマーと PCR 条件

vst5F: 5'-ACATGGTCGCGAGAATCGAA-3'

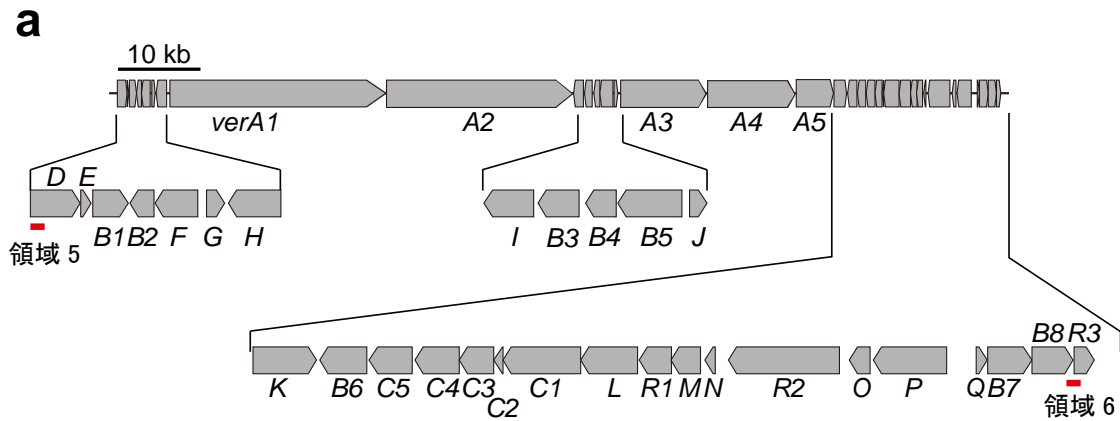
vst5R: 5'-ATCTTGGTACCGCACCCGAC-3'

vst6F: 5'-GGACAGCGTCGAGTACGTCA-3'

vst6R: 5'-CCAGTTCGCTCTTGAACGT-3'

結果

BAC ライブラリの作製により、コロニー数 1,300 の BAC ライブラリを 384 穴プレート 4 枚に得た。スクリーニング結果の詳細は実験項に記載した。1,300 コロニーから 6 クローンのヒットクローン (2D9、2K8、2N24、3B24、4L11、4P2) を取得した (図 1-8)。



b

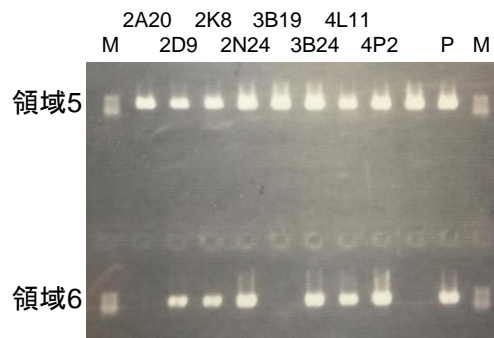


図 1-8 BAC ライブラリのスクリーニング結果

a. スクリーニングのための PCR で増幅させた領域 5 と 6、増幅させた配列箇所を赤で示した。**b.** スクリーニングの結果。M は ϕ X174 マーカー、P はポジティブコントロールを示した。領域 5 と 6 の双方で増えたクローンとして 2D9、2K8、2N24、3B24、4L11、4P2 が同定できた。

第2項 VST 生合成遺伝子クラスターを含む BAC クローンの導入による VST の異種生産

方法

取得した BAC のうち、2N24 を pKU503DverP10N24 と命名し直した。pKU503DverP10N24 をプロトプラスト/PEG法を用いて *S. albus* J1074 へ導入し、*S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 を取得した。取得した *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 と対照として *S. albus* J1074::pKU503D、および VST 生産菌である 4083-SVS6 株についても PC-1 液体培地にて 4 日間 30°C で前培養し、培養液を 500 ml 容バツフル付三角フラスコに分注した 100 ml K 培地 + neo へ、2 ml 植菌し、27°C、180 rpm にて 4 日間培養し、等量のアセトンにて抽出した後、アセトンを減圧下で留去し、残った水層を酢酸エチル抽出した後、酢酸エチルを留去した残渣をサンプルとし、MeOH に溶解し LC/UV/MS を用いて表 1-4 の条件で分析し、異種発現による VST の生産を調べた。VST の検量線を作製し、各生産株の VST 生産量について定量した。

表 1-4 LC/UV/MS 分析条件

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	A, 10% Acetonitrile (+ 10 mM ammonium formate (pH 3.0)) B, 90% acetonitrile (+ 10 mM ammonium formate (pH 3.0)) 0-100% B over 6 min 100% B for 2 min
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40°C
Detector	Photo Diode Array (SPD-M20A, Shimadzu Kyoto, Japan)
ESI-MS(-)	Triple TOF™ 5600 (AB Sciex, Tokyo, Japan)

結果

LC/UV/MS での解析結果から *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株の培養抽出物で溶出時間 5.2 分に m/z 1097.6437 [M-H]⁻ (calcd. mass for C₆₁H₉₃O₁₇⁻: 1097.6418) のシグナルが検出され、これは VST の分子式 C₆₁H₉₄O₁₇ と一致しており、かつ 4083-SVS6 株で検出される VST のシグナルとも一致したことから、この形質転換株が VST を生産することが確認できた。対照である *S. albus* J1074::pKU503D ではこのシグナルは見られなかった。生産量は *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株では培養液 1 l 当たり 21 mg、4083-SVS6 株では 1.5 mg と算出された (図 1-9)。

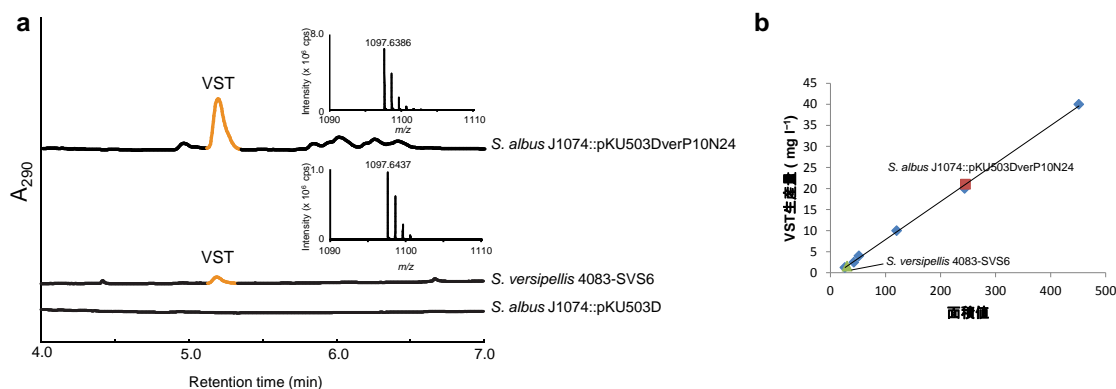


図 1-9 *S. albus* J1074 株を宿主とした VST 生合成遺伝子クラスターの異種発現

a. 290 nm における UV クロマトグラムと、HR-ESIMS (-) の測定結果を各クロマトグラムの上に示した。b. 290 nm でのピーク面積を用いた VST の検量線。

考察

本章では、まず 4083-SVS6 株のドラフトゲノムシーケンスを解析し、VST の生合成遺伝子クラスターを見出した。その配列情報から、PKS の各ドメインについて既知の知見をもとに解析した。またデオキシ糖の生合成経路についても推定した。これらを元に、VST の推定生合成経路について予想した。次に 4083-SVS6 株について BAC を用いた DNA ライブラリを作製し、VST 生合成遺伝子クラスターを含むクローンを 6 つ取得した。さらに結果から、108 kb にわたる VST の生合成遺伝子クラスターの全長を取得し、*S. albus* J1074 株を宿主とした異種発現に成功した。

これまでに、100 kb 近い生合成遺伝子クラスターの異種発現の報告例として、tautomycin (80 kb)¹⁰⁹、salinomycin (106 kb)¹¹⁰。モジュラー型 NRPS によって生合成される daptomycin 類縁体 (128 kb)¹¹¹ (()内は生合成遺伝子クラスターのサイズ) が報告されている。

VST 生産量については 4083-SVS6 株と比較して *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株では向上が見られた。4083-SVS6 株の VST 生産量については、VST 類縁体の単離の報告では 11 あたり 6.8 mg の生産量⁴⁷が報告されている。培養条件によっては 4083-SVS6 株の VST 生産量が向上する可能性もある⁴⁷。本実験で行った条件では *S. albus* J1074 株で 4083-SVS6 株と比較して約 14 倍の生産性の向上が見られた。この結果は、生合成遺伝子クラスターを異種放線菌に導入することで本来の株よりも生産量が向上する可能性を示した。プロモーター改変等を行うことで更なる生産性の向上等も期待できると考えられる。異種発現での生産量の増加に成功したことで生合成経路の解析には十分な VST、および遺伝子破壊株での生産量が異種発現株によって取得できると考え、生合成遺伝子の解析を行うこととした。

第2章 Versipelostatin 生合成における糖鎖構造を形成する糖転移酵素遺伝子 *vstH*、*vstI* の機能解析

第2章 Versipelostatin 生合成における糖鎖構造を形成する糖転移酵素遺伝子 *vstH*、*vstI* の機能解析

序論で述べたように VST は側鎖に D-digitoxose、L-oleandrose、D-digitoxose の3糖が連なった構造を持つ。第1章で得られた VST 生合成遺伝子クラスター内には相同性検索から2つの糖転移酵素をコードする遺伝子 *vstH* と *vstI* のみが見出された。また、L-oleandrosyl 基は L-olivoyl 基の転移反応の後、VstB6 による水酸基へのメチル化反応によって形成すると考えられる^{102, 107, 112}。このことから *vstH* と *vstI* のそれぞれが D-digitoxose と、L-olivose のそれぞれの糖転移反応を触媒すること、また D-digitoxose を転移する酵素が2回の糖転移反応を担うことで、3糖構造が形成すると推定した。一般に二次代謝生合成に関与する糖転移酵素は基質となるアグリコンの類似度によって相同性を示す。つまり、例えば、マクロライドに糖を転移する糖転移酵素同士、ポリエンに糖を転移する糖転移酵素同士、グリコペプチドに糖を転移する糖転移酵素同士で相同性を示す¹¹³。そのため、相同性検索を行っても転移するデオキシ糖基質について予想することはできなかった。異種発現株を用いてこれら遺伝子の機能解析により、VST 側鎖糖構造の生合成について明らかにできると考え、遺伝子破壊実験によりそれぞれの機能を解析した。

第1節 *vstI* 遺伝子破壊株の解析

方法

第1章で取得した *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株を親株に用いて遺伝子破壊を行った。遺伝子破壊は二回交差法を用いて in-frame で欠失させた。二回交差法の概略を図2-1に示した。*vstI* の上流 2kb を増幅させるプライマー、*vstI*-up-F と *vstI*-up-R、および下流 2kb を増幅させるプライマー、*vstI*-down-F と *vstI*-down-R (表2-1) を用いて PCR により DNA 断片を増幅し、pT7Blue T-vector へクローニングし配列を確認した後、*Hind*III および *Xba*I によって消化し、pUC118apr¹¹⁴ の *Hind*III サイトへクローニングし、遺伝子破壊用プラスミド pUC118aprΔ*vstI* を得た (図2-2)。得られたプラスミドを *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株へ形質転換し、apr 耐性株を選抜することで、1回交差変異株を取得した。得られた1回交差変異株を R2YE 培地にて 30°C で2日間培養した後、プロトプラスト化し、適宜希釈した後 R2YE 寒天培地で培養することでシングルコロニーを取得した。シングルコロニーを TSB 寒天培地と 25 μl ml⁻¹ apr を含む TSB 寒天培地へと植え継ぎ、apr 感受性となった株を *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24Δ*vstI* として選抜した。以下 Δ*vstI* 株と表記する。選抜した株について表2-1に示した配列確認用プライマー *vstI*-F と *vstI*-R を用いてコロニーPCRを行うことで遺伝子破壊を確認した (図2-2)。

取得した形質転換体は 30°C で2日間、PC-1 培地で培養した後培養液を 500 ml 容バツフ

ル付三角フラスコに分注した 100 ml K 培地 + neo へ、2 ml 植菌し、27°C、180 rpm にて 4 日間培養し、等量のアセトンにて抽出した後、アセトンを減圧下で留去し、残った水層を酢酸エチル抽出した後、酢酸エチルを留去した残渣を MeOH に溶解しサンプルとし、LC および LC/MS にて表 2-2 の条件で分析した。培養と分析は *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株、次節で述べる $\Delta vstH$ 株、第 3 節で述べる $\Delta vstI$ 株と $\Delta vstH$ 株の共培養についてすべて同時に行いサンプル間で比較できるようにした。

結果

LC/MS による培養抽出物の解析の結果、 $\Delta vstI$ 株では VST の生産が失われることが明らかとなった (図 2-3)。 m/z 695.4503 ($[M+H]^+$, calcd. mass for $C_{42}H_{63}O_8^+$: 695.4517) から、分子式 $C_{42}H_{62}O_8$ の化合物が蓄積することが示された。この分子組成は VST aglycone (4) に相当したため、VST aglycone を VST より加水分解にて調製した。方法は実験項に記載した。これを標品として LC/MS にて解析し、同一の溶出時間にピークが検出できたため、 $\Delta vstI$ 株では VST aglycone (4) が蓄積することが示された (図 2-3)。

この結果から、VstI は 2 種類あるデオキシ糖のうち D-digitoxose を転移する反応に関与し、VST aglycone (4) と TDP-D-digitoxose を基質にし、D-digitoxose を転移する反応を触媒することが示唆された (図 2-3)。

表 2-1 *vstI* 遺伝子破壊用プライマー

vstI-up-F:	5'- <u>AAGCTT</u> GGAACGCGAGTACGTCGACG-3' (<i>Hind</i> III)
vstI-up-R:	5'- <u>TCTAGAC</u> GGCGGACAGGGGTCGACGG-3' (<i>Xba</i> I)
vstI-down-F:	5'- <u>TCTAGAG</u> ACCGCGCCCGGCGGATCTG-3' (<i>Xba</i> I)
vstI-down-R:	5'- <u>AAGCTT</u> TTCGAAGCCGAACCTCACCGCC-3' (<i>Hind</i> III)
vstI-F:	5'-CCATGGCCGCGTACTGTTTCATGCC
vstI-R:	5'-GGATCCTCAGATGAGTTTCTCGAGTAC

下線で制限酵素サイトを示した。

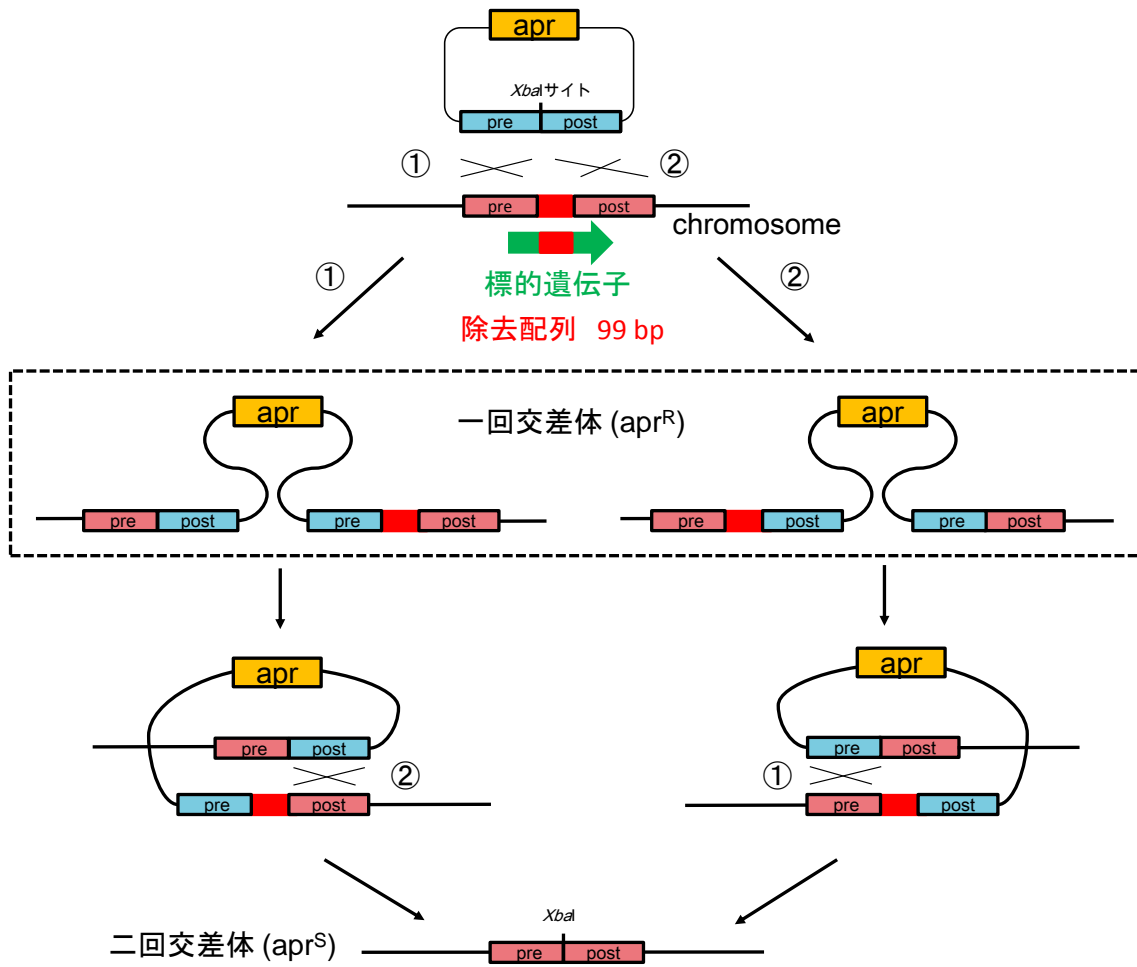


図 2-1 二回交差法による遺伝子破壊の概略

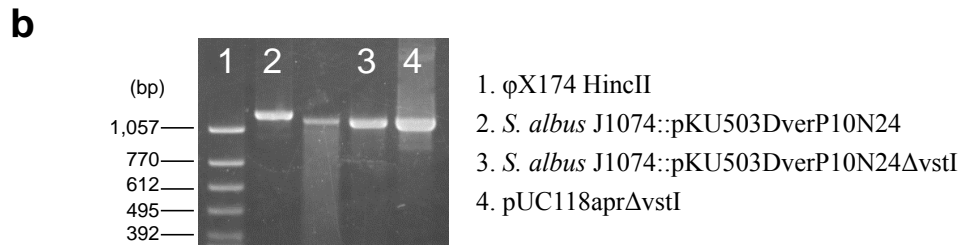
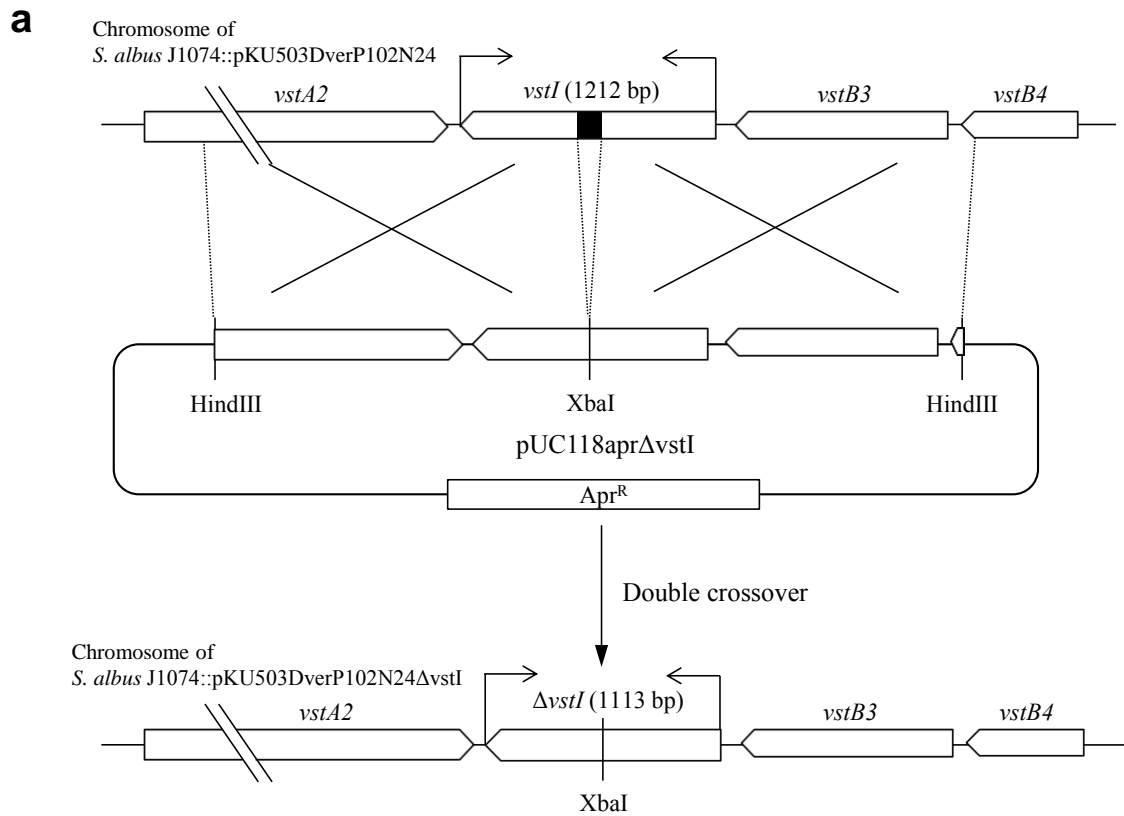


図 2-2 二回交差法による *vstI* 遺伝子破壊株の作製

a. pUC118aprΔ*vstI* と遺伝子破壊後の配列。 **b.** PCR による遺伝子破壊の確認。

表 2-2 LC 分析条件

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	A, water (+ 0.1% formic acid); B, methanol (+ 0.1% formic acid) 2-98% B over 6 min 98% B for 2 min
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40 °C
Detector	Photo Diode Array (X-LC™ 3110MD, JASCO, Tokyo, Japan)
ESI-MS(+)	Triple TOF™ 5600 (AB Sciex, Tokyo, Japan)

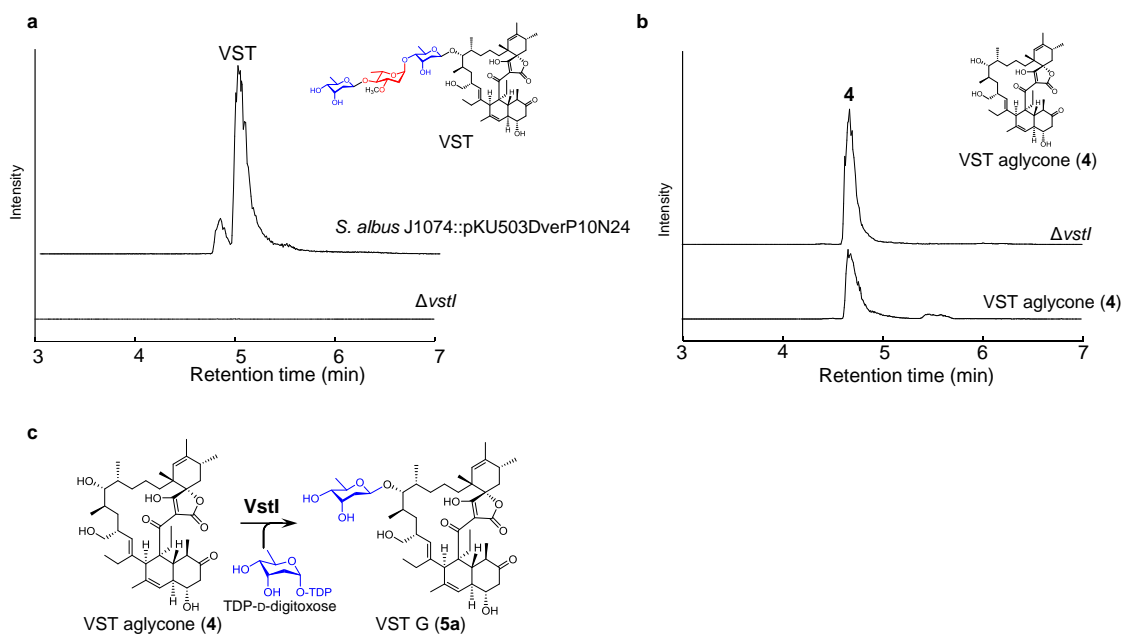


図 2-3 $\Delta vstI$ 株の LC/MS による分析結果

a. m/z 1116.6 におけるクロマトグラム。**b.** m/z 695.5 におけるクロマトグラム。**c.** 結果から推定された VstI の機能。

第2節 *vstH* 遺伝子破壊株の解析

vstI の遺伝子破壊と同様にして行った。*vstH* の上流 2kb を増幅させるプライマー、*vstH*-up-F と *vstH*-up-R、および下流 2kb を増幅させるプライマー、*vstH*-down-F と *vstH*-down-R (表 2-3)を用いて PCR により DNA 断片を増幅し、pT7Blue T-vector ヘクローニングし配列を確認した後、*Hind*III および *Xba*I によって消化し、pUC118apr の *Hind*III サイトヘクローニングし、遺伝子破壊用プラスミド pUC118apr Δ *vstH* を得た (図 2-4)。得られたプラスミドを *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株へ形質転換し、apr 耐性株を選抜することで、1 回交差変異株を取得した。得られた 1 回交差変異株を R2YE 培地にて 30°C で 2 日間培養した後、プロトプラスト化し、適宜希釈した後 R2YE 寒天培地で培養することでシングルコロニーを取得した。シングルコロニーを TSB 寒天培地と 25 μ l ml⁻¹ apr を含む TSB 寒天培地へと植え継ぎ、apr 感受性となった株を *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 Δ *vstH* として選抜した。以下 Δ *vstH* 株と表記する。選抜した株について表 2-3 に示した配列確認用プライマー *vstH*-F と *vstH*-R を用いてコロニー PCR を行うことで遺伝子破壊を確認した (図 2-4)。

取得した形質転換体は Δ *vstI* 株と同様に 30°C で 2 日間、PC-1 培地で培養した後培養液を 500 ml 容バツフル付三角フラスコに分注した 100 ml K 培地 +neo へ、2 ml 植菌し、27°C、180 rpm にて 4 日間培養した。抽出は Δ *vstI* 株と同じ方法で行い、表 2-2 の条件で LC/MS にて分析した。

結果

Δ *vstH* 株の培養抽出物でも VST の生産は失われた (図 2-5)。 Δ *vstH* 株の培養抽出物では m/z 842.5392 [M+NH₄]⁺ (calcd. mass for C₄₈H₇₆NO₁₁⁺: 842.5413)、および m/z 826.5446 [M+NH₄]⁺ (calcd. for C₄₈H₇₆NO₁₀⁺: 826.5464) の 2 つのシグナルが観測されたことから、分子式 C₄₈H₇₂O₁₁ と C₄₈H₇₂O₁₀ の 2 つの未知化合物の蓄積が見出された (図 2-5)。培養液 3.7 L からこれらの未知化合物を単離精製し、¹H-NMR、¹³C-NMR、HSQC、DQF-COSY、HMBC により構造決定を行った。精製は実験項に記載した。その結果、1 つは VST aglycone の 19 位の OH 基に D-digitoxose が付加した新規 VST 類縁体 VST G (**5a**)、もう一つは VST G (**5a**) の 37 位の OH 基が H へと置き換わった新規 VST 類縁体 VST H (**5b**) であることが示された (表 2-4、表 2-5、図 2-6、図 2-7)。スピロテロン酸部位、*trans*-decalin 構造、および digitoxose の立体化学については、VST の対応する化学シフトと VST G、VST H の化学シフトが一致していたため、化合物の立体化学は VST と同一とした。この結果から、VstI が 1 つ目の糖である D-digitoxose の転移反応を触媒することが示され、また VstH が L-olivose の転移反応を触媒することが示唆された。VST aglycone は、37-deoxy-VST-aglycone (**3**) が P450 である VstD に水酸化されて VST aglycone へ変換される。VST H は水酸化される前の 37-deoxy-VST-aglycone

(3) が VstI に基質として受け入れられることで形成するシャント化合物と考えた (図 2-5)。

表 2-3 *vstH* 遺伝子破壊用プライマー

vstH-up-F:	5'- <u>AAGCTT</u> CTCGATCGGGTCGCCGACCC-3' (<i>Hind</i> III)
vstH-up-R:	5'- <u>TCTAGAC</u> CAGATAGCGCACCCGGGATCC-3' (<i>Xba</i> I)
vstH-down-F:	5'- <u>TCTAGAC</u> CCCTACAACGGCACCCGGGGT-3' (<i>Xba</i> I)
vstH-down-R:	5'- <u>AAGCTT</u> AGGGGCAGTTCGGCGGTGAC-3' (<i>Hind</i> III)
vstH-F:	5'-GAATTCCGAGTTCTGTTCGTGGC
vstH-R:	5'-CTCGAGTCAGACCGACCGCAGGAGTG

下線で制限酵素サイトを示した。

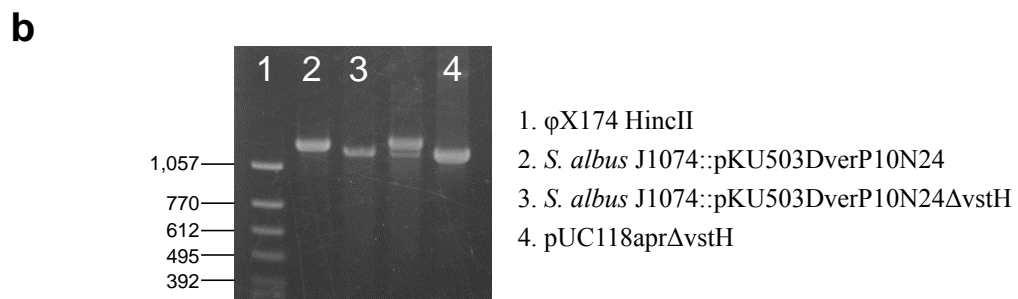
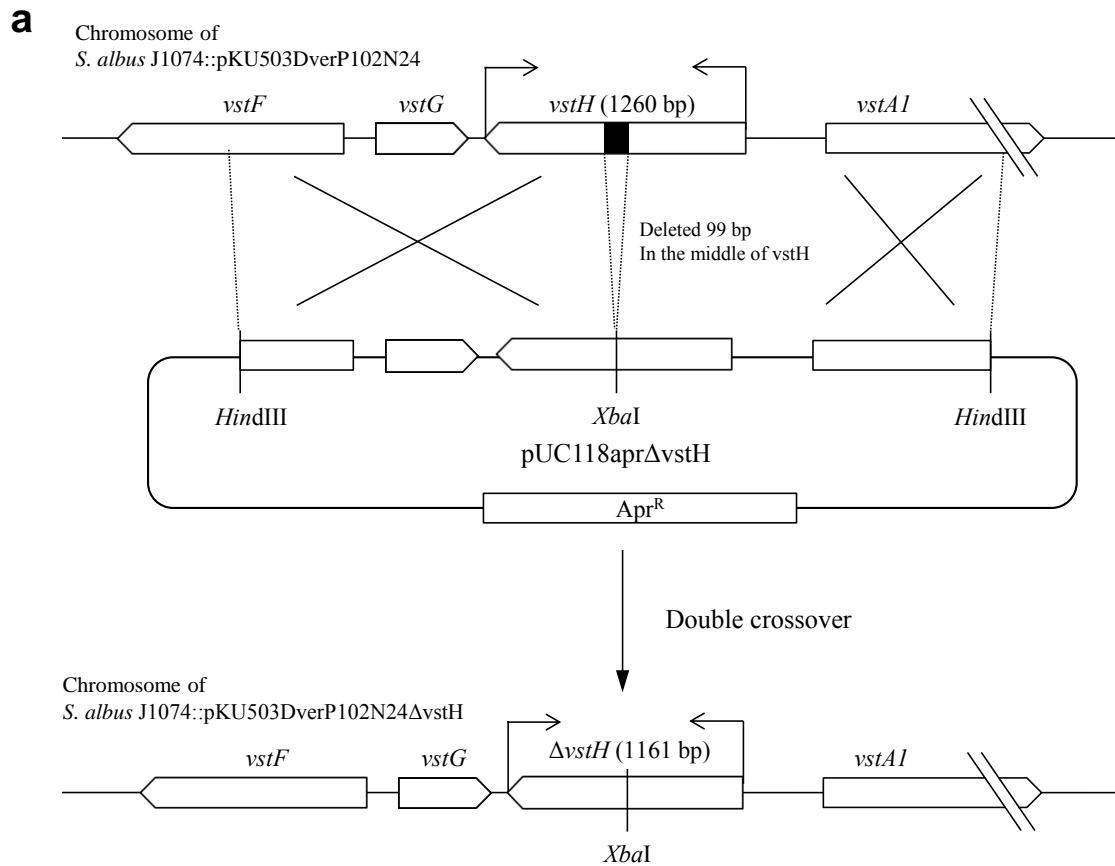


図 2-4 二回交差法による *vstH* 遺伝子破壊株の作製

a. pUC118aprΔ*vstH* と遺伝子破壊後の配列。 b. PCR による遺伝子破壊の確認。

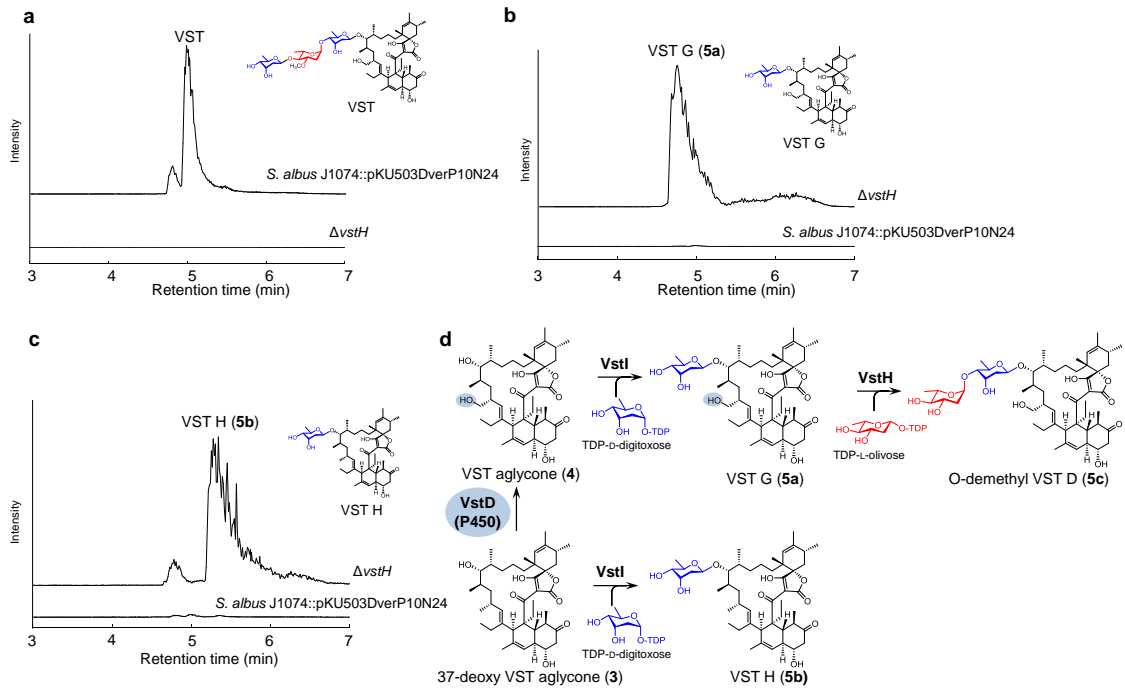


図 2-5 $\Delta vstH$ 株の LC/MS による分析結果

a. m/z 1116.6 におけるクロマトグラム。b. m/z 842.5 におけるクロマトグラム。c. 826.5 におけるクロマトグラム。d. VST G と VST H の推定生合成機構と、結果から推定される VstH の機能。

表 2-4 VST G (5a)の NMR スペクトルの解析結果

対応する VST の δ_C 、 δ_H ケミカルシフト値をカラム右に示した。⁴³

no.	VST G		VST	
	δ_C	δ_H (H, mult, J (Hz))	δ_C	δ_H (H, mult, J (Hz))
1	166.7		166.4	
2	103.4		103.2	
3	205.3		205.1	
4	58.4		58.6	
5	39.5	2.43 (m)	39.3	2.42 (m)
6	50.2	2.48 (m)	49.8	2.46 (m)
7	210.1		210.0	
8	50.0	2.43 (m) / 3.02 (dd, 5.4, 14.4)	50.1	2.41 (dd, 7, 14) / 2.98 (dd, 7, 14)
9	71.5	3.83 (dd, 8.4, 15.0)	71.3	3.78 (m)
10	47.3	2.31 (m)	47.2	2.29 (m)
11	120.9	5.85 (s)	120.8	5.84 (br s)
12	134.4		134.2	
13	60.2	3.10 (brs)	60.0	3.07 (s)
14	139.4		139.3	
15	136.1	5.13 (d, 10.8)	135.9	5.11 (d, 11)
16	38.0	2.30 (m)	37.9	2.28 (m)
17	32.3	0.62 (t, 11.4) / 1.61 (m)	32.2	0.59 (t, 11) / 1.59 (m)
18	35.5	1.97 (m)	35.4	1.94 (m)
19	91.2	3.23 (m)	91.1	3.21 (m)
20	29.3	1.62 (m)	29.2	1.61 (m)
21	32.4	1.12 (m) / 1.53 (m)	32.2	1.11 (m) / 1.49 (m)
22	20.1	1.35 (m) / 1.60 (m)	20.0	1.33 (m) / 1.58 (m)
23	34.7	1.29 (m) / 1.55 (m)	34.6	1.26 (m) / 1.53 (m)
24	41.6		41.4	
25	126.8	5.29 (s)	126.6	5.26 (br, s)
26	135.5		135.3	
27	31.3	2.38 (m)	31.1	2.37 (m)
28	37.0	1.77 (dd, 6.6, 14.4) / 2.25 (dd, 7.2, 14.4)	36.9	1.75 (dd, 7, 14) / 2.21 (dd, 7, 14)
29	87.5		87.3	
30	201.9		201.8	
31	23.6	2.13 (m) / 2.52 (m)	23.4	2.12 (q, 8) / 2.52 (q, 8)
32	12.5	0.93 (m)	12.4	0.91
33	16.4	0.93 (m)	16.3	0.92
34	23.0	1.65 (s)	22.8	1.63 (s)
35	22.0	1.90 (m) / 1.94 (m)	21.8	1.88 (q, 7) / 1.92 (q, 7)
36	14.7	0.90 (m)	14.6	0.88
37	64.8	3.43 (dd, 1.8, 10.8) / 3.56 (dd, 5.4, 10.8)	64.7	3.41 (dd, 4, 10) / 3.51 (dd, 4, 10)
38	17.2	0.93	17.1	0.91
39	22.4	0.9	22.3	0.88
40	21.0	1.02 (s)	20.8	1.01 (s)
41	21.5	1.68 (s)	21.4	1.67 (s)
42	19.5	1.05	19.4	1.03 (d, 7)
1'	100.5	4.80 (d, 9.0)	100.3	4.77 (d, 10)
2'	38.0	1.66 (m) / 2.12 (m)	37.3	1.65 (m) / 2.11 (dd, 3, 10)
3'	68.3	4.08 (brs)	67.6	4.03 (d, 3)
4'	72.9	3.28 (d, 7.2)	80.5	3.21 (dd, 10, 3)
5'	69.5	3.71 (dd, 6.0, 8.4)	68.1	3.76 (dq, 10, 6.5)
6'	18.0	1.24 (d, 6.0)	17.7	1.17 (d, 6.5)
1''			99.3	4.92 (d, 2)
2''			34.7	1.53 (m) / 2.19 (dd, 4, 12)
3''			78.1	3.46 (dd, 10, 12)
4''			81.1	3.27 (t, 10)
5''			68.1	3.62 (dq, 6.5, 10)
6''			18.0	1.24 (d, 6.5)
1'''			98.4	5.02 (d, 10)
2'''			38.1	1.61 (m) / 2.11 (dd, 3, 10)
3'''			68.2	4.04 (d, 3)
4'''			73.0	3.22 (dd, 3, 10)
5'''			69.2	3.64 (dq, 6.5, 10)
6'''			18.0	1.22 (d, 6.5)
OCH ₃			57.3	3.36 (s)

¹H NMR (600 MHz), ¹³C NMR (150 MHz), chloroform-*d*.

表 2-5 VST H (5b) の NMR スペクトルの解析結果

対応する VST の δ_C 、 δ_H ケミカルシフト値をカラム右に示した⁴³。

no.	VST H		VST	
	δ_C	δ_H (mult, J (Hz))	δ_C	δ_H (H, mult, J (Hz))
1	167.0		166.4	
2	103.7		103.2	
3	206.0		205.1	
4	58.9		58.6	
5	39.4	2.31 (m)	39.3	2.42 (m)
6	49.8	2.45 (m)	49.8	2.46 (m)
7	211.1		210.0	
8	49.5	2.35 (m) / 3.07 (dd, 6.0, 15.6)	50.1	2.41 (dd, 7, 14) / 2.98 (dd, 7, 14)
9	71.0	3.88 (m)	71.3	3.78 (m)
10	47.0	2.19 (m)	47.2	2.29 (m)
11	120.3	5.83 (s)	120.8	5.84 (br s)
12	135.2		134.2	
13	58.8	3.35 (s)	60.0	3.07 (s)
14	136.3		139.3	
15	141.4	4.98 (d, 9.6)	135.9	5.11 (d, 11)
16	29.8	2.26 (m)	37.9	2.28 (m)
17	36.9	0.71 (m) / 1.01 (m)	32.2	0.59 (t, 11) / 1.59 (m)
18	34.0	1.65 (m)	35.4	1.94 (m)
19	90.8	3.19 (dd, 7.2, 1.2)	91.1	3.21 (m)
20	30.7	1.63 (m)	29.2	1.61 (m)
21	28.6	1.21 (m) / 1.41 (m)	32.2	1.11 (m) / 1.49 (m)
22	18.6	1.42 (m) / 1.49 (m)	20.0	1.33 (m) / 1.58 (m)
23	32.4	1.35 (m) / 1.39 (m)	34.6	1.26 (m) / 1.53 (m)
24	41.1		41.4	
25	126.2	5.37 (s)	126.6	5.26 (br, s)
26	135.6		135.3	
27	31.9	2.38 (m)	31.1	2.37 (m)
28	37.6	1.60 (m) / 2.45 (m)	36.9	1.75 (dd, 7, 14) / 2.21 (dd, 7, 14)
29	87.4		87.3	
30	200.7		201.8	
31	23.9	2.58 (m) / 1.98 (m)	23.4	2.12 (q, 8) / 2.52 (q, 8)
32	12.2	0.88 (m)	12.4	0.91
33	17.8	1.04 (d, 6.6)	16.3	0.92
34	22.8	1.65 (s)	22.8	1.63 (s)
35	21.5	1.87 (m) / 1.98 (m)	21.8	1.88 (q, 7) / 1.92 (q, 7)
36	14.7	0.9	14.6	0.88
37	18.5	0.80 (d, 6.6)	64.7	3.41 (dd, 4, 10) / 3.51 (dd, 4, 10)
38	16.4	0.99 (d, 6.6)	17.1	0.91
39	18.9	0.92	22.3	0.88
40	21.5	1.07 (s)	20.8	1.01 (s)
41	21.7	1.71 (s)	21.4	1.67 (s)
42	19.9	1.07 (d, 6.0)	19.4	1.03 (d, 7)
1'	99.5	4.79 (d, 9.6)	100.3	4.77 (d, 10)
2'	38.1	1.67 (m) / 2.13 (m)	37.3	1.65 (m) / 2.11 (dd, 3, 10)
3'	68.6	4.09 (brs)	67.6	4.03 (d, 3)
4'	73.2	3.29 (m)	80.5	3.21 (dd, 3, 10)
5'	69.2	3.66 (m)	68.1	3.76 (dq, 6.5, 10)
6'	18.2	1.25 (d, 6.0)	17.7	1.17 (d, 6.5)
1''			99.3	4.92 (d, 2)
2''			34.7	1.53 (m) / 2.19 (dd, 4, 12)
3''			78.1	3.46 (dd, 10, 12)
4''			81.1	3.27 (t, 10)
5''			68.1	3.62 (dq, 6.5, 10)
6''			18.0	1.24 (d, 6.5)
1'''			98.4	5.02 (d, 10)
2'''			38.1	1.61 (m) / 2.11 (dd, 3, 10)
3'''			68.2	4.04 (d, 3)
4'''			73.0	3.22 (dd, 3, 10)
5'''			69.2	3.64 (dq, 6.5, 10)
6'''			18.0	1.22 (d, 6.5)
OCH ₃			57.3	3.36 (s)

¹H NMR (600 MHz), ¹³C NMR (150 MHz), chloroform-*d*.

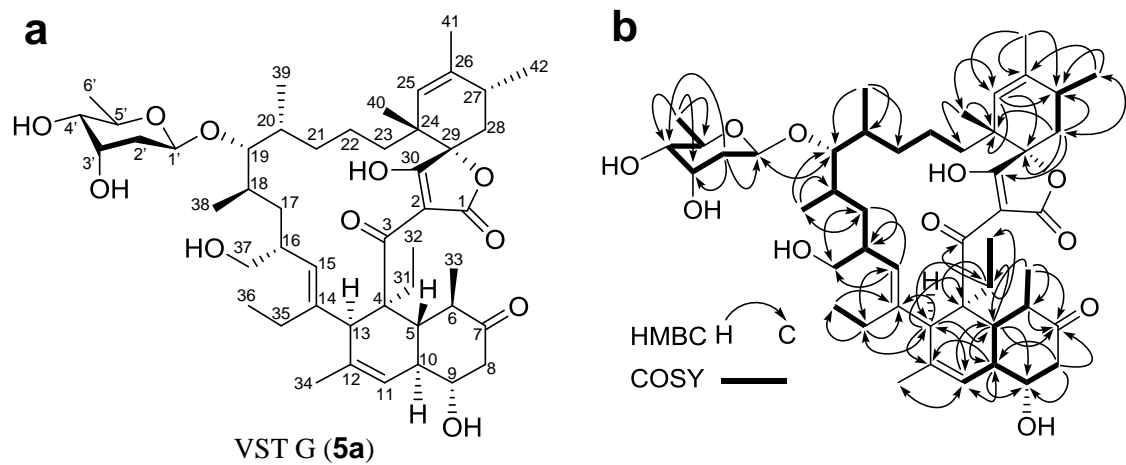


図 2-6 a.VST G (5a) の構造、b.HMBC、DQF-COSY、の相関



図 2-7 a. VST H (5b) の構造と b. HMBC、DQF-COSY の相関

第3節 $\Delta vstH$ 株と $\Delta vstI$ 株の共培養による VST 生産の相補

方法

取得した $\Delta vstH$ 、 $\Delta vstI$ 各遺伝子破壊株について、共培養することにより、VST の生産が相補されるかについて検討した。VST、および類縁体は脂溶性が高いため、細胞膜を透過し、各遺伝子破壊株間を行き来することで、糖転移反応が触媒されることが考えられた。また、各生合成中間体について、それらの蓄積を確認した。取得した形質転換体は 30°C で 2 日間、PC-1 培地で培養した $\Delta vstH$ 、 $\Delta vstI$ 各遺伝子破壊株の培養液を 500 ml 容バツフル付三角フラスコに分注した 100 ml K 培地へ、1 ml ずつ植菌し、27°C、180 rpm にて 4 日間培養した。抽出操作は各遺伝子破壊株と同様の方法で行った。分析は $\Delta vstH$ 株のサンプルと一緒に表 2-6 の条件で検出した。

結果

$\Delta vstH$ と $\Delta vstI$ 共培養によって VST の生産が回復した (図 2-8)。さらに、生合成中間体と考えられる VST G (**5a**)、VST H (**5b**)、*O*-demethyl VST D (**5c**)、VST D について、共培養と親株とで各化合物に対応するマスキロマトグラムを比較した。VST G と VST H については $\Delta vstH$ 株の結果も示した (図 2-8)。その結果、生合成中間体と考えられる $\Delta vstH$ 株にて蓄積した VST G (**5a**) は共培養では蓄積しなかった。一方、共培養サンプルにおいて、シャント化合物と考えられる VST H (**5b**) は $\Delta vstH$ 株のサンプルと同様に蓄積しており、下流の生合成経路へ代謝されていないことが確認できた (図 2-8)。さらに、親株と共培養とを比較した場合、生合成中間体と考えられる *O*-demethyl VST D (**5c**) と VST D は、共培養でのみ蓄積していた (図 2-8)。

これらの結果から、VST の側鎖糖構造は VST G (**5a**)、*O*-demethyl VST D (**5c**)、VST D を經由して代謝されると考えられた。共培養でのみ反応中間体の蓄積が見られたことは、VstI が繰り返しはたらくために、共培養では物質の細胞間移動が必要なため、生合成の効率が落ちていると解釈した。糖転移酵素遺伝子ホモログが *vstH* と *vstI* の 2 つのみしか存在しないことから、VstH は L-olivose の糖転移反応を触媒することが示唆された。以上から、VST の側鎖糖生合成経路は VST アグリコンに対して VstI が作用し、VST G が形成した後、VstH は L-olivose を転移し、*O*-demethyl VST D (**5c**) が形成すること、さらに L-olivosyl 基へメチル基転移酵素である VstB6 によるメチル基転移の後、再度 VstI による D-digitoxose の転移反応が起こり VST が形成すると考えた。

表 2-6 LC 分析条件

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	A, water (+ 0.1% formic acid); B, methanol (+ 0.1% formic acid) 2-98% B over 6 min 98% B for 2 min
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40°C
Detector	Photo Diode Array (X-LC™ 3110MD, JASCO, Tokyo, Japan)
ESI-MS(-)	Triple TOF™ 5600 (AB Sciex, Tokyo, Japan)

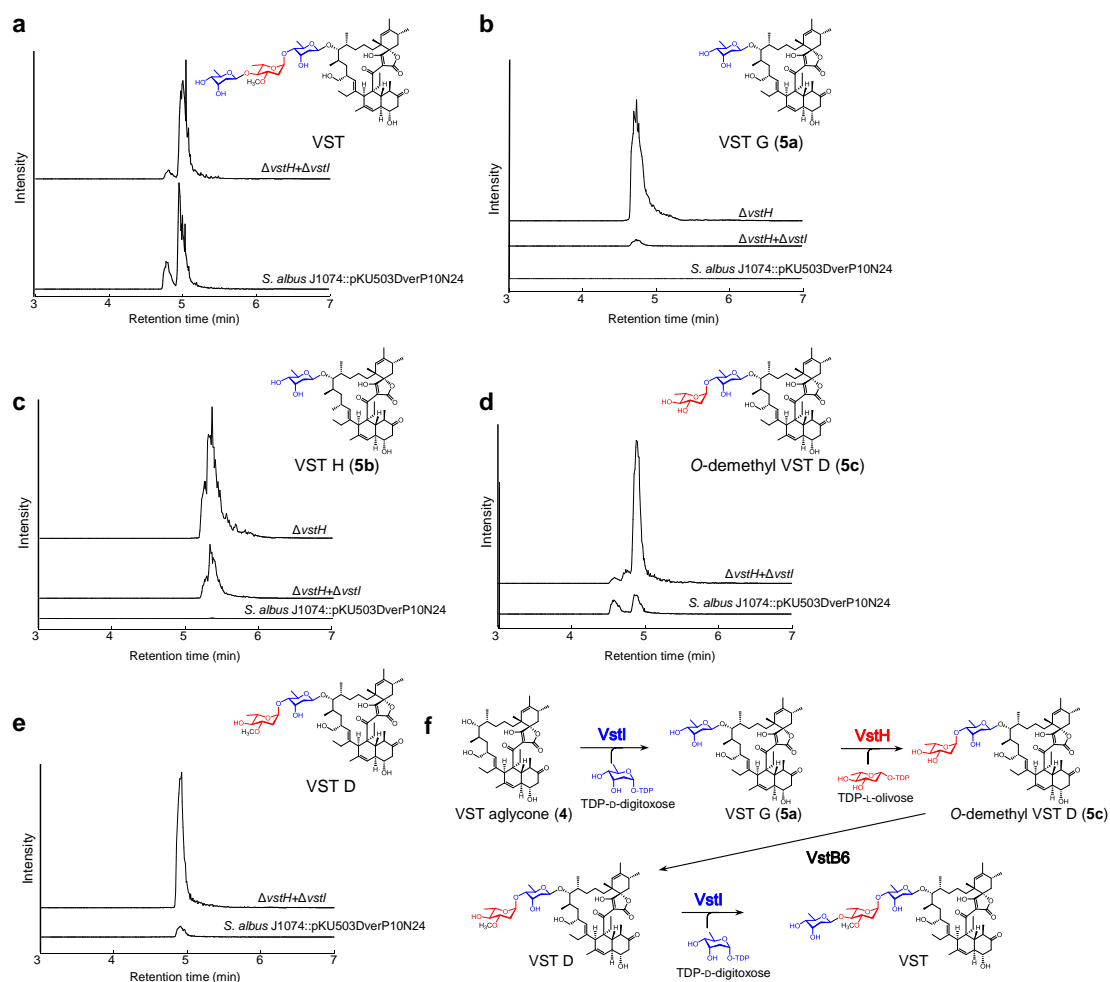


図 2-8 共培養と、異種発現株、 $\Delta vstH$ 株における各生合成中間体の比較定量

a. m/z 1097.6 におけるクロマトグラム。共培養では VST の生産が回復した。**b.** 823.5 におけるクロマトグラム、 $\Delta vstH$ 株にて蓄積した VST G (5a) は共培養では蓄積しなかった。**c.** 807.5 におけるクロマトグラム。VST H (5b) は $\Delta vstH$ 株においても共培養でも蓄積が見られた。**d.** 953.6 におけるクロマトグラム。共培養株では代謝中間体と考えられる O-demethyl VST D (5c) の蓄積が見られた。**e.** 967.6 におけるクロマトグラム。代謝中間体の VST D の蓄積が見られた。**f.** VST aglycone から VST への推定生合成経路。

考察

本章では、異種発現株を親株とした遺伝子破壊実験と、蓄積化合物の構造決定により、2つの糖転移酵素が触媒する反応について知見を得ることに成功した。解析の結果、 $\Delta vstI$ 株では VST aglycone (**4**) が蓄積し、 $\Delta vstH$ 株では VST G (**5a**) および VST H (**5b**) が蓄積することが示された。これらの実験結果から、VstI は VST aglycone (**4**) へ 1 つ目の糖である D-digitoxose を転移し、VST G (**5a**) を形成する酵素であることが *in vivo* で示された。さらに VstH は 2 つ目の糖である L-olivose を転移する酵素であることが強く示唆された。さらに、 $\Delta vstI$ 株と $\Delta vstH$ 株の共培養を行った結果、VST の生産が回復した。糖転移酵素の候補遺伝子は 2 つのみであることから、D-digitoxose と L-olivose のデオキシ糖に、各糖転移酵素が対応していることが示唆された。VstI は D-digitoxose の転移反応を触媒し、VstH は L-olivose の転移反応を触媒すると推定できた。

生合成過程で糖転移酵素が 2 回繰り返して働く例として、スピロテロン酸化合物の lobophorin 生合成における LobG1、LobG2、LobG3 の機能解析が報告されている⁶⁶。Lobophorin の生合成では、最終産物である lobophorin はその構造に 4 つの糖 (2 つの L-digitoxose、1 つの 4'-O-methyl-L-digitoxose、1 つの D-kijanose) を持ち、LobG1 による D-kijanose のアグリコンへの糖転移反応による D 糖が付加した後、LobG3 による 2 回の L-digitoxose の転移反応が起こり A 糖、B 糖として付加し、最後に LobG2 による L-digitoxose 転移反応が起こって C 糖として付加した後、LobS によるメチル基転移反応の後、LobP1 によって水酸化されることで lobophorin A が生合成されることが糖転移酵素の遺伝子破壊実験⁶⁶と、メチル基転移酵素の組換え酵素を用いた活性試験によって示されている。¹¹⁵ このほかにも二次代謝産物の生合成経路において、糖転移酵素が繰り返し働く例としては、avermectin 生合成における AveBI¹¹⁶ や landomycin 生合成の LanGT1、LanGT4 の例がある。¹¹⁷

今回行った遺伝子破壊実験により、VST の側鎖糖構造の形成について生合成機構が示唆された。今後は、 $\Delta vstI$ 株への VST G の添加実験と、 $\Delta vstH$ 株への VST D の添加実験を行うことで、今回提唱した生合成機構が確かめられると考えられる。

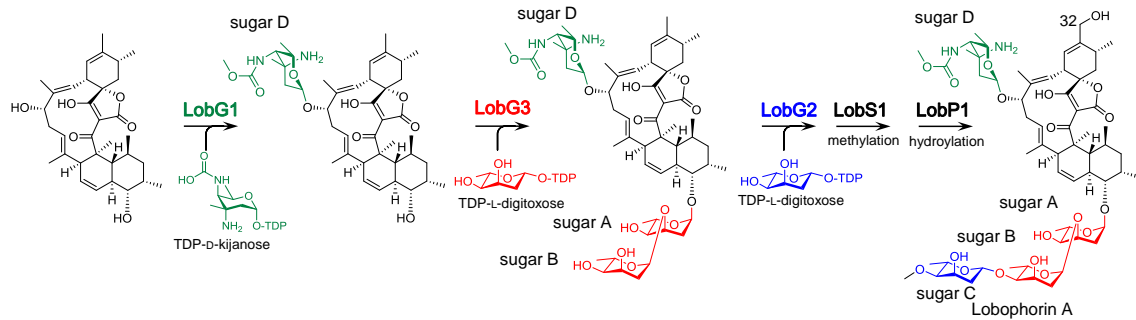


図 2-9 Lobophorin A の糖鎖構造の生合成機構

Lobophorin の側鎖糖構造はまず D 糖である D-kijanose が LobG1 によってまず D 糖として転移される。次に LobG3 が繰り返し L-digitoxose を転移させることで A 糖と B 糖が転移される。次に LobG2 によって L-digitoxose が転移された後、LobS1 によってメチル化され、C 糖が 4'-O-methyl-L-digitoxose へと変換される。最後にアグリコンの 32 位が水酸化されて lobophorin A が形成する。

第 3 章 スピロテロン酸化合物の大環状化反応を担う [4+2] 環化
付加反応に必須な遺伝子 *vstJ* の発見と機能解析

第 3 章 スピロテトロン酸化合物の大環状化反応を担う [4+2] 環化付加反応に必須な遺伝子 *vstJ* の発見と機能解析

序論で述べたように VST およびスピロテトロン酸化合物の生合成においては、共役ジエンと末端オレフィンを持つ鎖状の鍵中間体が形成した後、分子内 [4+2] 環化付加反応によってスピロテトロン酸構造が構築されると同時に C-C 結合のみから成る大環状構造が形成されることが提唱されている⁵⁷。しかしながら、これまでに多くのスピロテトロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターが取得されたにも関わらず、[4+2] 環化付加反応を担う酵素は発見されておらず、その存在は証明されていない。そこで本章ではスピロテトロン酸骨格を形成する、分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素について研究を行った。

第 1 節 スピロテトロン酸化合物生合成遺伝子クラスターの比較による候補遺伝子の探索

方法

これまでに、既知のスピロテトロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターとして chlorothricin⁶², kijanimicin⁶³, tetrocarcin A⁶¹, abyssomicin⁶⁴, quartromicin⁶⁵, lobophorin⁶⁶ が報告されていた。これらスピロテトロン酸化合物の生合成遺伝子クラスター内に、相同性を持つ [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素遺伝子が保存されていると予想した。第 1 章のアノテーションから、*vst* 生合成遺伝子クラスター内の遺伝子のうち、生合成経路における機能が推定できないものは *vstG*、*vstJ*、*vstN*、*vstO*、*vstQ*、*vstK* の 6 つに絞られた。各遺伝子について既知のスピロテトロン酸化合物生合成遺伝子クラスターの比較から、すべてに共通して存在する相同性を持った機能未知遺伝子を探索した。

結果

その結果、*vst* 生合成遺伝子クラスター内の、142 アミノ酸から成るタンパク質 VstJ のホモログが chlorothricin, tetrocarcin A, lobophorinA の生合成遺伝子クラスターでそれぞれ、*chlL*、*tcaU4*、*lobU2* の遺伝子産物として保存されていることを見出した。VstJ は機能が同定されたタンパク質とは相同性を示さなかったが、これらホモログ間で 30% 程度の弱い相同性を示した (図 3-1、図 3-2)。一方、kijanimicin、abyssomicin の生合成遺伝子クラスター内には VstJ と相同性を持つ遺伝子は見いだされなかった。しかし、*vstJ* 配列を基に kijanimicin、abyssomicin の生合成遺伝子クラスター (それぞれ accession number: EU301739 と accession number: JF752342) 内を tblastn にて相同性検索を行った。その結果、これまで見落とされていた VstJ ホモログをコードする遺伝子をそれぞれに見出し、*kijcyc*、*abycyc* と命名した (図 3-3)。さらに興味深いことに分子内に 4 つのスピロテトロン酸構造を持つ quartromicin の生

合成遺伝子クラスターでは、VstJ と相同性を持つ配列が 2 回繰り返して直列に繋がった 1 つの遺伝子、*qmnH* が見出された (図 3-1、図 3-2)。一方、スピロテトロン酸構造を持たないテトロン酸化合物 *tetronomycin* の生合成遺伝子クラスター内にも VstJ ホモログが見出された (図 3-2)。

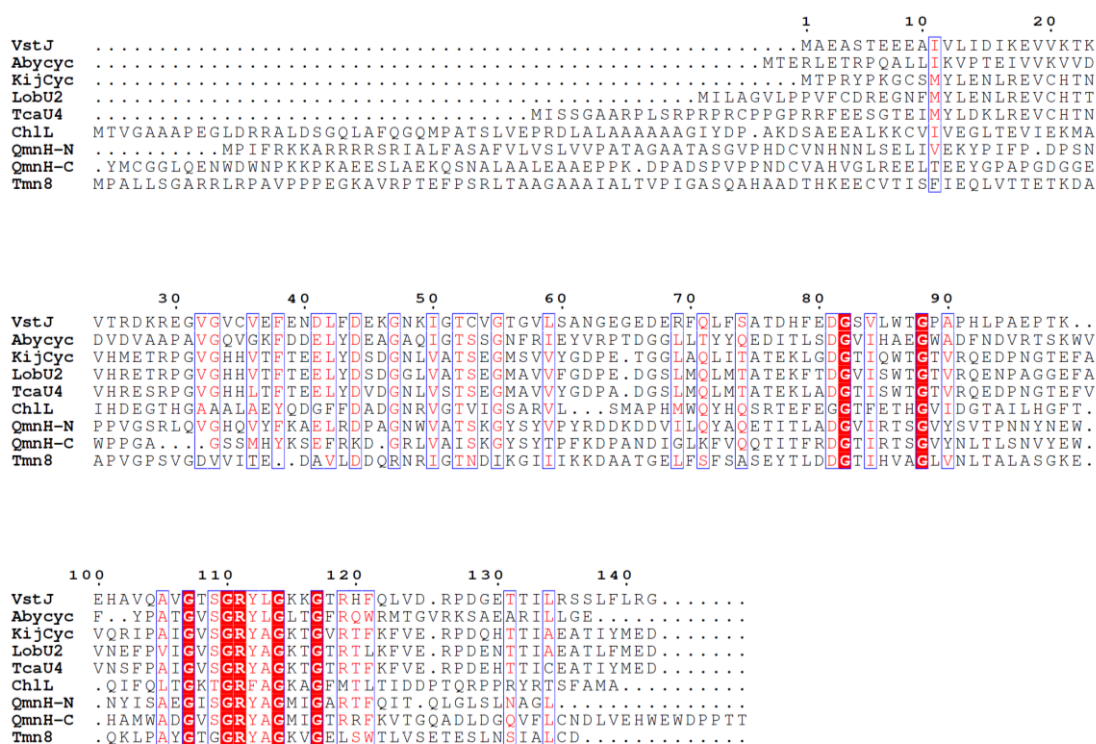


図 3-1 スピロテトロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターに見出した VstJ ホモログのアラインメント

QmnH は全長 376 アミノ酸残基を持ち、VstJ と相同性を示す配列が 2 回直列に繋がった配列を持つ。QmnH の N 末端側を 1-173 aa を QmnH-N、174-376 aa を QmnH-C としてアラインメントを作製した。VstJ における 109 番目の Ser 残基から S(T)GRY(F)L(A)G という配列がすべての VstJ ホモログで高度に保存されていることが見出された。

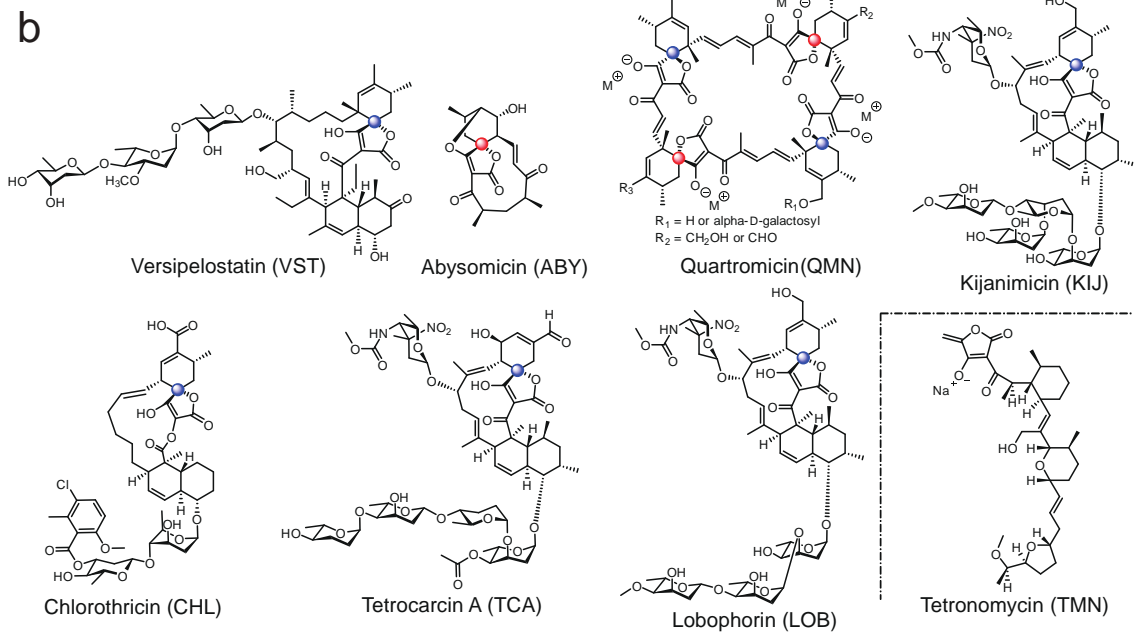
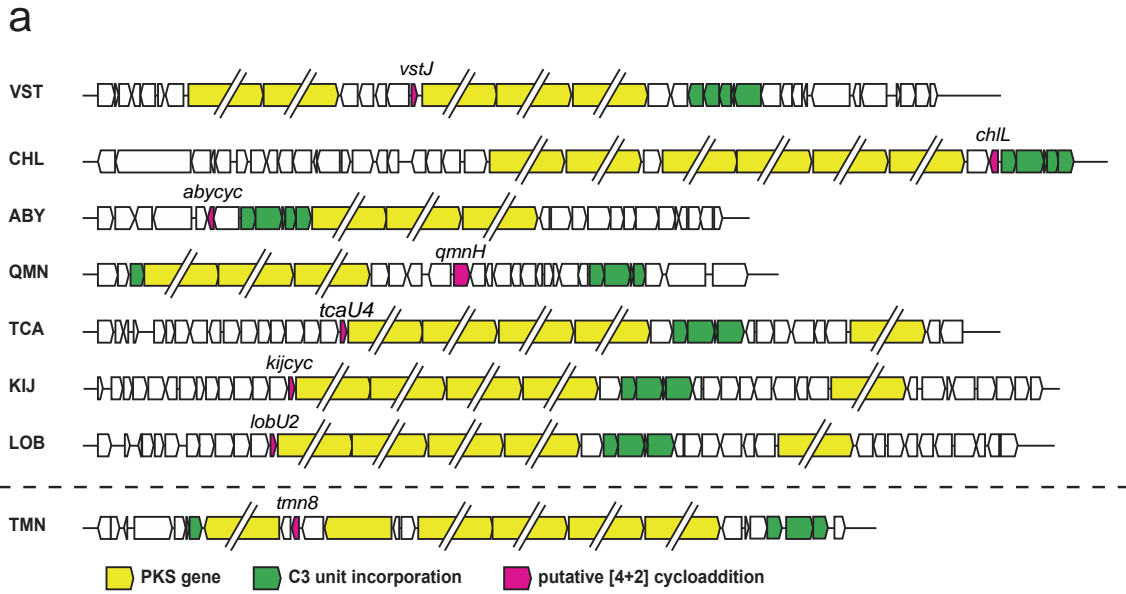


図 3-2 スピロテトロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターの比較と化合物の構造¹⁰⁸

a. 比較に用いたスピロテトロン酸化合物と tetronomycin の生合成遺伝子クラスター。**b.** 生合成遺伝子クラスターが取得されているスピロテトロン酸化合物と tetronomycin の構造¹⁰⁸。スピロテトロン酸部の立体について、*R*-体と *S*-体をそれぞれ赤と青の丸で示した。

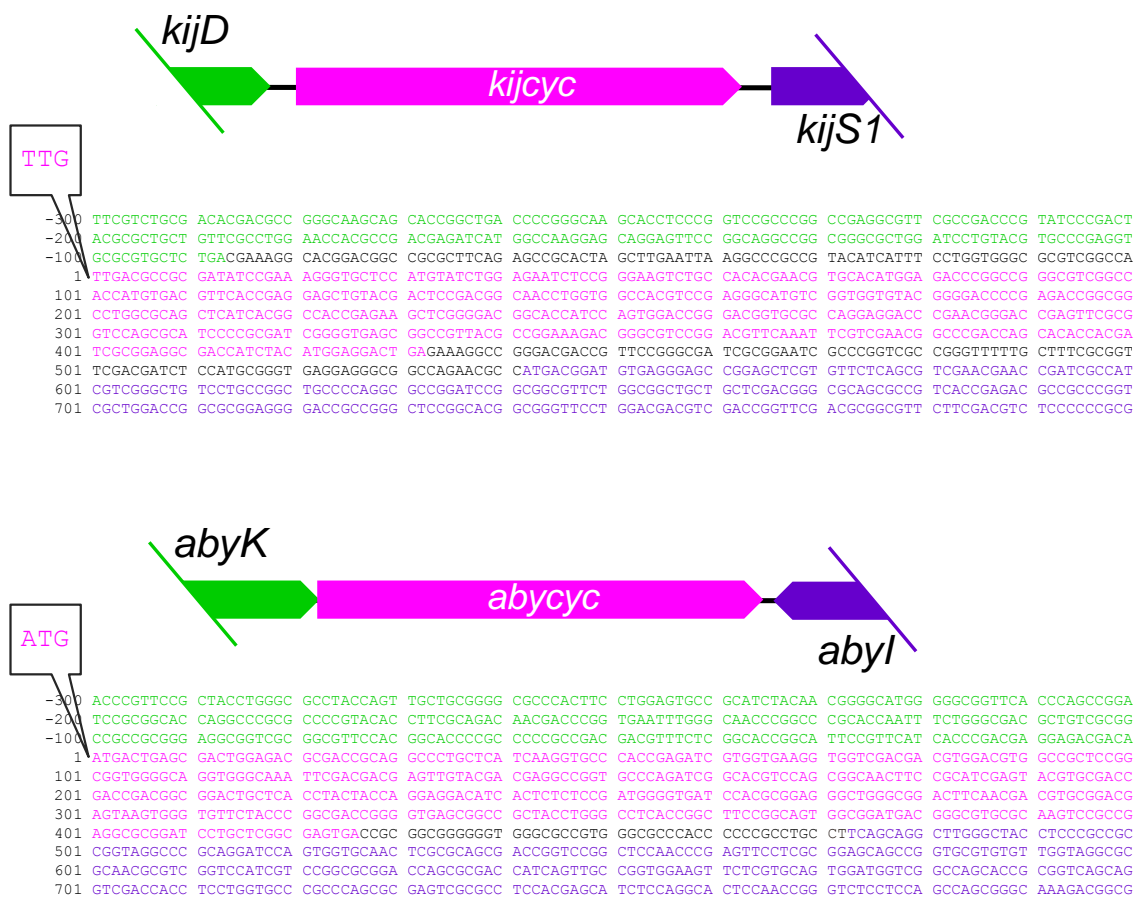


図 3-3 kijanimicin と abyssomicin 生合成遺伝子クラスター内の

VstJ ホモログのアノテーション

それぞれの開始コドンを吹き出しで示した。¹⁰⁸

第2節 遺伝子破壊による機能未知遺伝子 *vstJ* の機能解析

方法

本節では *vstJ* の機能を明らかにするため、第1章で取得した異種発現株 *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株を親株に本遺伝子を破壊し、本遺伝子の VST 生合成への関与の有無を調べることにした。遺伝子破壊は第2章と同様の二回交差法を用いた。二回交差法の概略については図3-4に示した。*vstJ* の上流2kbを増幅させるプライマー、*vstJ-del-pre_F* と *vstJ-del-pre_R*、および下流2kbを増幅させるプライマー、*vstJ-del-post_F* と *vstJ-del-post_R* (表3-1) を用いてPCRによりDNA断片を増幅し、pT7Blue T-vector へクローニングし配列を確認した後、*HindIII* および *XbaI* によって消化し、pUC118apr の *HindIII* サイトへクローニングし、遺伝子破壊用プラスミド pUC118aprΔ*vstJ* を得た (図3-4)。

得られたプラスミド pUC118aprΔ*vstJ* を *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24 株へ形質転換し、apr 耐性株を選抜することで、1回交差変異株を取得した。得られた1回交差変異株を R2YE 培地にて 30°C で2日間培養した後、プロトプラスト化し、適宜希釈した後 R2YE 寒天培地で培養することでシングルコロニーを取得した。シングルコロニーを TSB 寒天培地と 25 μl ml⁻¹ apr を含む TSB 寒天培地へと植え継ぎ、apr 感受性となった株を *S. albus* J1074::pKU503DverP10N24Δ*vstJ* として選抜した。Δ*vstJ* 株と表記する。選抜した株についてゲノムを調製し、次節に示した *vstJ* 遺伝子のクローニング用のプライマー (表3-4) によるPCRにより、二回交差による、標的配列の欠落を確認した (図3-4)。

S. albus J1074::pKU503DverP10N24 株、および Δ*vstJ* 株を PC-1 液体培地にて4日間30°C で前培養し、培養液を 100 ml K 培地 + neo へ 2 ml 植菌し、27°C、180 rpm にて4日間培養し、等量のアセトンにて抽出した後、アセトンを減圧下で留去し、残った水層を酢酸エチル抽出した後、酢酸エチルを留去した残渣をサンプルとし、MeOH に溶解し LC にて分析した。

結果

vstJ 遺伝子の破壊によって、VST の生産は失われた。このことから、*vstJ* が VST の生合成に必須であることが示された。さらに Δ*vstJ* 株では溶出時間 5.8 分に未知化合物のシグナルを見出した (図3-5)。LC の溶出溶媒にギ酸アンモニウムを加えない場合には、本ピークは検出されなかった。Δ*vstJ* 株を大量培養し、蓄積した未知化合物を単離した。詳細は実験項に記載した。単離した化合物の HR-ESIMS (-) 解析の結果、*m/z* 677.4410 [M-H]⁻ (calcd. mass for C₄₂H₆₁O₇⁻: 677.4423) のシグナルが得られ、未知化合物の分子式が C₄₂H₆₂O₇ であることが判明した。さらに NMR による解析から構造決定した (図3-5)。構造解析の際には、類似構造を有する agglomerin と NMR の化学シフト値を比較した (表3-4)。¹¹⁸ その結果、蓄

積した未知化合物は、テトロン酸と末端オレフィンおよび共役ジエンを持つ **2** であることが判明した。このことからスピロテトロン酸生成における、[4+2] 環化付加反応の基質と考えられる前駆体の単離に成功した。さらに、この結果から、*vstJ* 遺伝子産物がスピロテトロン酸形成の鍵反応となる [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素であることが強く示唆された。

表 3-1 *vstJ* 遺伝子破壊用プライマー

vstJ-del-pre_F: 5'-GGGAAAGCTTCCTCTTCGCGTCTGAACGCG-3' (*Hind*III)

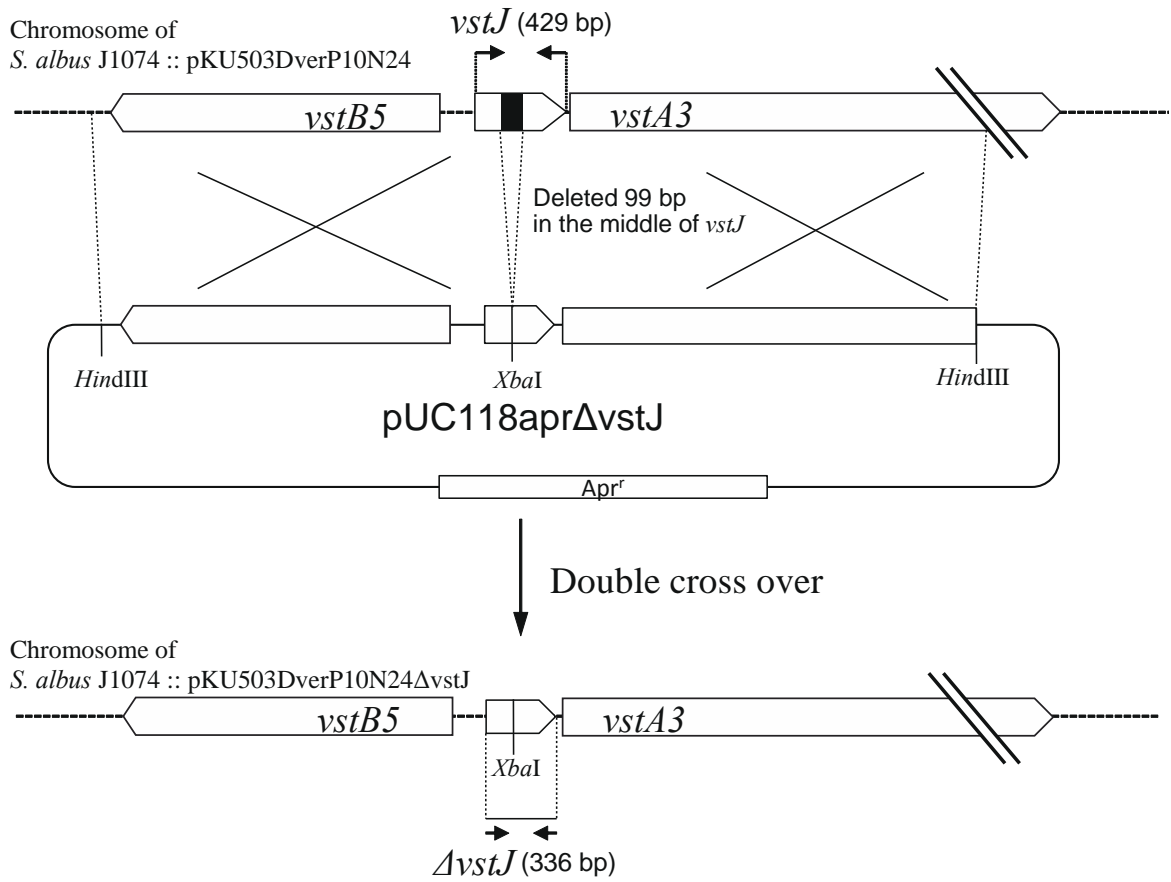
vstJ-del-pre_R: 5'-GGGTCTAGACCGACGCCTTCTCGCTTGTC-3' (*Xba*I)

vstJ-del-post_F: 5'-GGGTCTAGAAAGACGAAAGGTTCCAGCTCT-3' (*Xba*I)

vstJ-del-post_R: 5'-GGGAAAGCTTGACGGGCCAGGCCACGACCG-3' (*Hind*III)

下線で制限酵素サイトを示した。

a



b

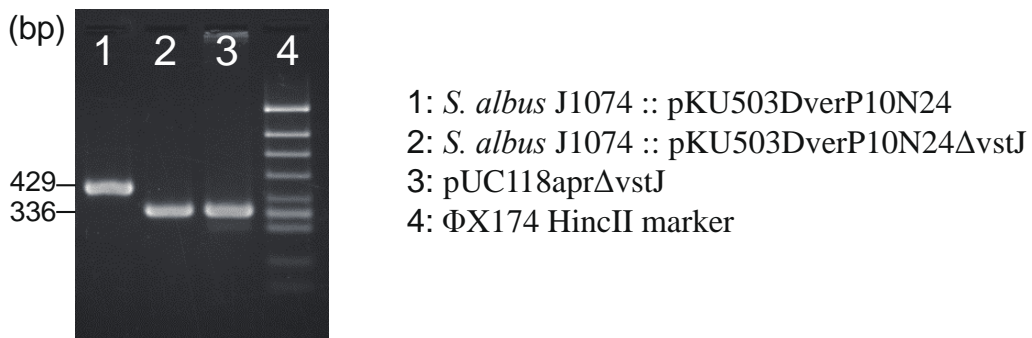


図 3-4 二回交差法による *vstJ* 遺伝子破壊株の作製¹⁰⁸

a. pUC118aprΔ*vstJ* と遺伝子破壊後の配列。 b. PCR による遺伝子破壊の確認。

表 3-2 LC 分析条件

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	A, 10% Acetonitrile (+ 10 mM ammonium formate (pH 3.0)) B, 90% acetonitrile (+ 10 mM ammonium formate (pH 3.0)) 0-100% B over 6 min 100% B for 2 min
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40°C
Detector	Photo Diode Array (SPD-M20A, Shimadzu Kyoto, Japan)
ESI-MS(-)	Triple TOF™ 5600 (AB Sciex, Tokyo, Japan)

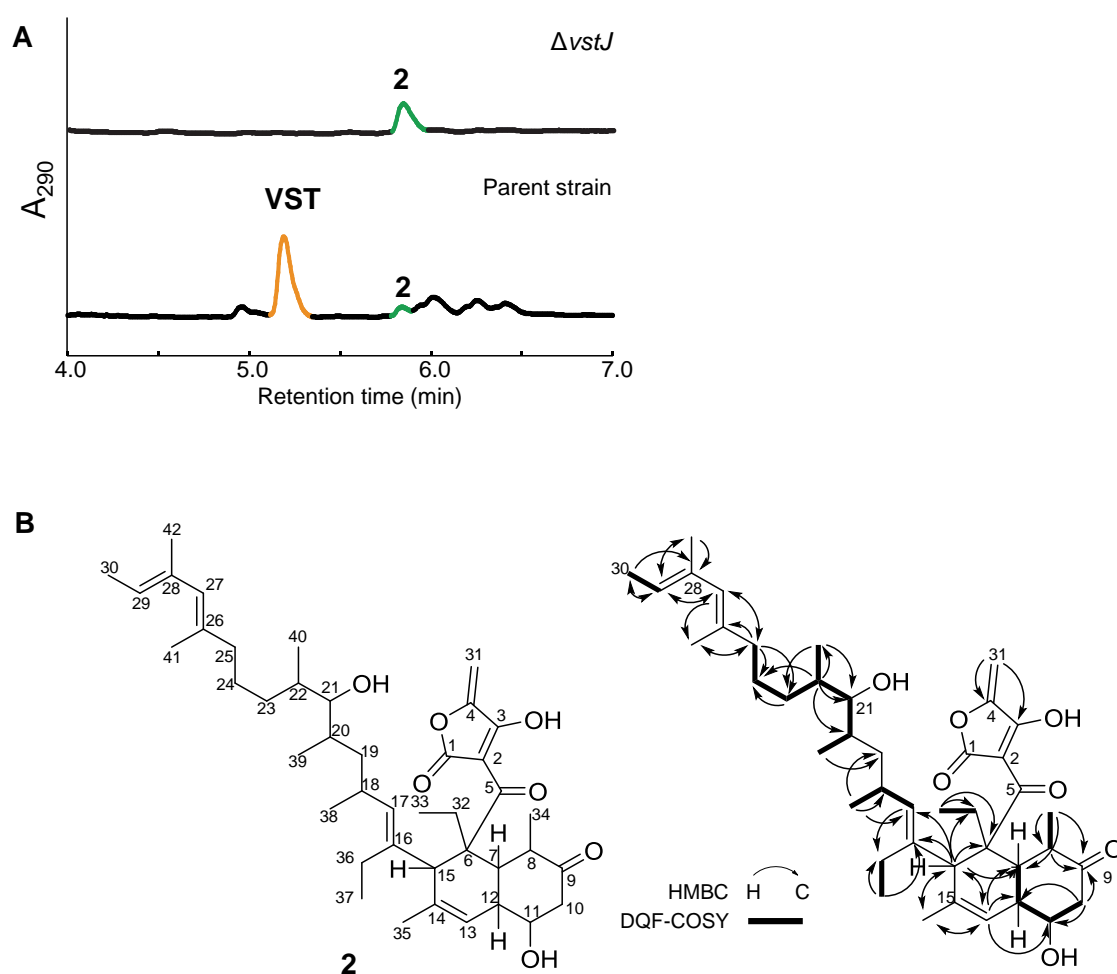


図 3-5 *vstJ* 遺伝子破壊株の解析結果

A. *vstJ* 遺伝子破壊株と親株の培養抽出物の LC 分析における 290 nm のクロマトグラム。B. NMR によって決定された蓄積化合物の構造 (左) と HMBC、DQF-COSY の解析結果 (右)。

表 3-3. 化合物 2 の NMR スペクトル

no.	δ_C	δ_H (H, mult, J(Hz))	no.	δ_C	δ_H (H, mult, J(Hz))
1	170.8		22	36.2	1.35 (1H, m)
2	98.1		23	32.6	0.95 (1H, m) / 1.54 (1H, m)
3	177.1		24	25.4	1.20 (1H, m) / 1.42 (1H, m)
4	155.3		25	41.2	1.92
5	198.7		26	135.4	
6	58.5		27	129.0	5.55 (1H, s)
7	39.2	2.13 (1H, br)	28	133.7	
8	48.8	2.10 (1H, m)	29	123.1	5.22 (1H, q, 6.6)
9	214.5		30	14.0	1.59 (3H, d, 7.2)
10	49.2	2.91 (1H, t, 8-8.5) / 2.04 (1H, t, 8-8.5)	31	84.9	4.63 (1H, s) / 4.33 (1H, s)
11	69.3	3.62 (1H, dd, 8.4, 8.4)	32	24.5	1.55 (m) / 2.48 *
12	46.3	1.74 (1H, br)	33	12.4	0.69
13	121.6	5.71 (1H, s)	34	20.5	1.02 (3H, d, 5.4)
14	163.5		35	23.2	1.50 (3H, s)
15	51.6	3.66 (1H, brs)	36	24.9	1.89 (m) / 1.56 (m)
16	139.6		37	14.7	0.80
17	135.1	4.80 (1H, d, 8.4)	38	22.6	0.81
18	29.5	2.33 (1H, m)	39	14.2	0.66
19	42.7	0.89 (1H, m) / 1.28 (1H, m)	40	16.5	0.67
20	32.7	1.42 (1H, m)	41	18.1	1.66 (3H, s)
21	75.7	2.91 (1H, d)	42	17.2	1.62 (3H, s)

^1H NMR (600 MHz), ^{13}C NMR (150 MHz), dimethyl sulfoxide- d_6 .

*で示したピークは溶媒と重なっていたため HSQC から判読した。

表 3-4. agglomerin の NMR スペクトル¹¹⁸

agglomerin A		
no.	δ_C	δ_H (mult, <i>J</i> (Hz))
1	170.6	
2	95.0	
3	180.3	
4	154.0	
5	194.6	
6	86.2	4.58 (s) / 4.81 (s)
1'	39.5	2.65
2'	24.5	1.47
3'	28.9	ca. 1.24
4'	29.0	ca. 1.24
5'	29.0	ca. 1.24
6'	28.7	ca. 1.24
7'	31.3	ca. 1.24
8'	22.1	ca. 1.24
9'	13.9	0.86

dimethyl sulfoxide-*d*₆.

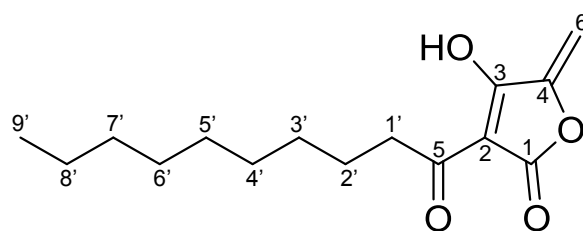


図 3-6 agglomerin A の構造

第3節 VstJ 組換え酵素の調製

方法

表 3-5 のようにプライマーを設計し、SVS6-4083 株のゲノムを鋳型とした PCR により目的遺伝子を増幅した。増幅した遺伝子を pT7blue-Tvector へと TA クローニングし、塩基配列を確認した。その後、*NcoI* および *BamHI* を用いてタンパク質発現用ベクター pHis8¹¹⁹ へとクローニングし pHis8-vstJ を構築した。構築したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) へと導入し、N 末端にヒスチジンタグが付加した組換えタンパク質を発現した。Ni²⁺-アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

表 3-5 遺伝子増幅用プライマー (pHis8 用)

pHis8-vstJFw	5'-GGGCCATGGCGCGGAAGCGAGCACCGAAG-3' (<i>NcoI</i> site)
pHis8-vstJrv	5'-GGGGGATCC TCAGCCGCGGAGGAAGAGGG-3' (<i>BamHI</i> site)

結果

目的タンパク質を可溶性タンパク質として調製できた。精製の結果を図 3-7 に示した

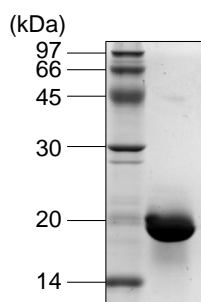


図 3-7 精製タンパク質の SDS-PAGE による解析結果

第4節 組換え VstJ の活性検出と反応産物の構造決定

方法

前節で精製した組換え VstJ および第2節で精製した **2** を用い、表 3-6 の条件にて VstJ の触媒活性を調べた。反応系各 500 μl について、30°C にて反応させ、反応時間 1 分、2 分、3 分、5 分、60 分の各点で反応サンプル 50 μl を 50 μl MeOH と混合し反応停止した。遠心により夾雑物を除いた上清をサンプルとして、表 3-2 の条件で分析した。

表 3-6 VstJ 反応溶液

50 mM	Tris-HCl pH8.0
500 μM	2
1.0 mg ml ⁻¹	VstJ

結果

酵素添加した場合にのみ溶出時間 5.6 分に新たな未知化合物 **3** が検出された。**3** は VST と同じ 268 nm に極大吸収を示したことから VST と同じ発色団を持つことが示唆された。HR-ESIMS (-) に供した結果、 m/z 677.4420 [M-H]⁻ (calcd. mass for C₄₂H₆₁O₇⁻: 677.4423) のシグナルが得られ、未知化合物 **3** の分子式は C₄₂H₆₂O₇ であることが判明した。構造決定のため、大スケールにて反応を行い、酢酸エチル抽出した後、PEGASIL ODS 20×250 mm を用いて 90%MeOH + 0.1% formate にて精製し、NMR 測定により反応産物の構造を決定した。その結果、**3** は化合物 **2** の共役ジエンおよびテトロン酸部の環外二重結合との間の *exo* 選択的な分子内 [4+2] 環化付加反応によって生成した 37-deoxy VST aglycone であることが判明した。VST H の NMR スペクトルとの化学シフト値を比較し、良好な一致を確認したため、37-deoxy VST aglycone と VST H のスピロテトロン酸部の立体化学が同一であると考えた (表 3-7)。さらに **3** が VST と同一の立体化学を持つことから、基質である **2** のスピロテトロン酸部位以外の decalin 構造および鎖状構造の立体化学についても、VST と同様と考えた (図 3-8)。

以上から VstJ が化合物 **2** の立体選択的な分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒することが示された。酵素を加えない条件では 37-deoxy VST aglycone (**3**) の生成が見られなかった (図 3-8)。また 70°C で 1 晩インキュベートしても環化付加活性は見られなかった。vstJ 遺伝子破壊株の培養抽出物から 37-deoxy VST aglycone (**3**) が検出されなかったことも考慮すると、VstJ は既知の [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素とは異なり、[4+2] 環化付加反応に必須であることが強く示唆された。

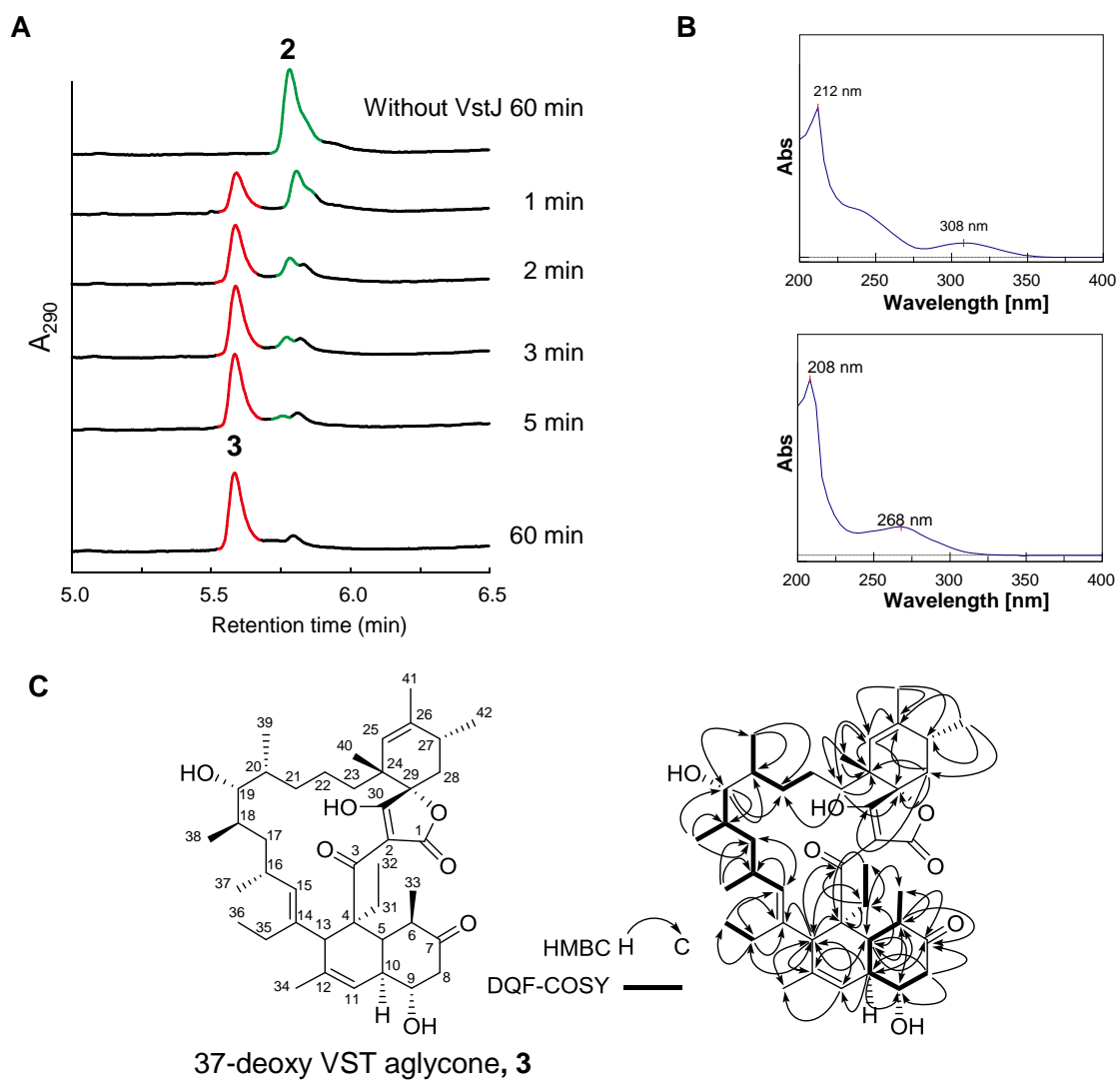


図 3-8 VstJ 反応の分析結果

A. 各反応時間におけるサンプルの 290 nm におけるクロマトグラム。**B.** 上 : VstJ の基質 **2** の UV-VIS スペクトラム。下 : VstJ の生成物 **3** の UV-VIS スペクトラム。**C.** NMR によって決定された VstJ 反応産物の構造と HMBC、DQF-COSY の解析結果。

表 3-7 化合物 3 の NMR スペクトル (カラム左) と VST H の NMR スペクトル (カラム右)

no.	37-deosy VST aglycone		VST H	
	δ_C	δ_H (H, mult, <i>J</i> (Hz))	δ_C	δ_H (H, mult, <i>J</i> (Hz))
1	167.1		167.0	
2	103.8		103.7	
3	206.3		206.0	
4	59.2		58.9	
5	39.5	2.28 (m)	39.4	2.31 (m)
6	49.7	2.42 (m)	49.8	2.45 (m)
7	211.6		211.1	
8	49.4	2.36 (m) / 3.07 (dd, 7.2, 16.2)	49.5	2.35 (m) / 3.07 (dd, 6.0, 15.6)
9	70.6	3.88 (dd, 9.0, 16.8)	71.0	3.88 (m)
10	47.0	2.19 (t, 12.0)	47.0	2.19 (m)
11	120.6	5.83 (s)	120.3	5.83 (s)
12	135.0		135.2	
13	58.3	3.43 (s)	58.8	3.35 (s)
14	136.7		136.3	
15	141.2	4.97 (d, 9.6)	141.4	4.98 (d, 9.6)
16	29.2	2.32 (m)	29.8	2.26 (m)
17	35.8	0.77 (dd, 4.2, 12.6) / 0.93 (m)	36.9	0.71 (m) / 1.01 (m)
18	34.7	1.47 (m)	34.0	1.65 (m)
19	81.9	3.11 (dd, 1.2, 8.4)	90.8	3.19 (dd, 1.2, 7.2)
20	30.4	1.63 (m)	30.7	1.63 (m)
21	26.3	1.23 (m) / 1.28 (m)	28.6	1.21 (m) / 1.41 (m)
22	18.3	1.48 (m) / 1.51 (m)	18.6	1.42 (m) / 1.49 (m)
23	31.7	1.38 (m) / 1.42 (m)	32.4	1.35 (m) / 1.39 (m)
24	41.0		41.1	
25	126.1	5.38 (s)	126.2	5.37 (s)
26	135.7		135.6	
27	32.0	2.40 (m)	31.9	2.38 (m)
28	37.7	1.61 (dd, 3.6, 14.4) / 2.50 (dd, 8.4,	37.6	1.60 (m) / 2.45 (m)
29	87.4		87.4	
30	200.3		200.7	
31	24.0	1.92 (m) / 2.58 (m)	23.9	1.98 (m) / 2.58 (m)
32	12.2	0.89 (t, 7.8)	12.2	0.88 (m)
33	18.3	1.06 (d, 2.4)	17.8	1.04 (d, 6.6)
34	22.9	1.64 (s)	22.8	1.65 (s)
35	21.4	1.85 (m) / 1.89 (m)	21.5	1.87 (m) / 1.98 (m)
36	14.7	0.91 (t, 7.8)	14.7	0.9
37	18.2	0.79 (d, 6.6)	18.5	0.80 (d, 6.6)
38	16.5	0.97 (d, 6.6)	16.4	0.99 (d, 6.6)
39	16.9	0.93 (d, 6.6)	18.9	0.92
40	21.6	1.08 (s)	21.5	1.07 (s)
41	21.7	1.70 (s)	21.7	1.71 (s)
42	19.9	1.07 (d, 3.6)	19.9	1.07 (d, 6.0)
1'			99.5	4.79 (d, 9.6)
2'			38.1	1.67 (m) / 2.13 (m)
3'			68.6	4.09 (brs)
4'			73.2	3.29 (m)
5'			69.2	3.66 (m)
6'			18.2	1.25 (d, 6.0)

^1H NMR (600 MHz), ^{13}C NMR (150 MHz), chloroform-*d*.

第 5 節 VstJ による反応の至適 pH と金属依存性の検討

方法

VstJ の至適 pH を探索した。表 3-8 に示した組成の反応溶液とし、buffer として HEPES-NaOH pH6.7, HEPES-NaOH pH7.0, HEPES-NaOH pH7.5, Tris-HCl pH7.5, Tris-HCl pH8.0, Tris-HCl pH8.5, Tris-HCl pH9.0 を用いた。30°C にて 30 min 反応した後、等量の MeOH を添加し反応を停止し、表 3-10 の分析条件にて分析した。290 nm のクロマトグラムチャートから、生成物のピーク面積を相対比較することで相対活性を調べた。求ジエン体となる二重結合はテロン酸部のカルボニル基と共役するため、 α , β -不飽和カルボニル構造を取っている。 α , β -不飽和カルボニル構造が基質となる Diels-Alder 反応では、 AlCl_3 などの Lewis 酸触媒により反応が加速されるため⁸³、表 3-9 で示した VstJ の反応系に EDTA の有無による **3** の生成量を比較することで、VstJ による反応の金属依存性についても検討した。

表 3-8 VstJ 反応の至適 pH 検討の反応条件

50 mM	buffer
0.5 mM	2
1.0 mg ml ⁻¹	VstJ

表 3-9 EDTA 添加の条件

50 mM	Tris-HCl pH8.0
60 μM	2
10 mM	EDTA
0.01 mg ml ⁻¹ (0.58 μM)	VstJ

表 3-10 LC 分析条件

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	A, 10% Acetonitrile (+ 10 mM ammonium formate (pH 3.0)) B, 90% acetonitrile (+ 10 mM ammonium formate (pH 3.0)) 0-100% B over 6 min 100% B for 2 min
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40°C
Detector	Photo Diode Array (JASCO X-LC 3110MD, JASCO, Tokyo, Japan)

結果

各 pH での反応産物の定量の結果、Tris-HCl pH8.0 を用いた条件で最も高い活性を示した (図 3-9)。また、EDTA を加えた条件でも反応の進行に変化はなかったため、VstJ による [4+2] 環化付加反応は金属に依存しないものと結論した (図 3-9)。

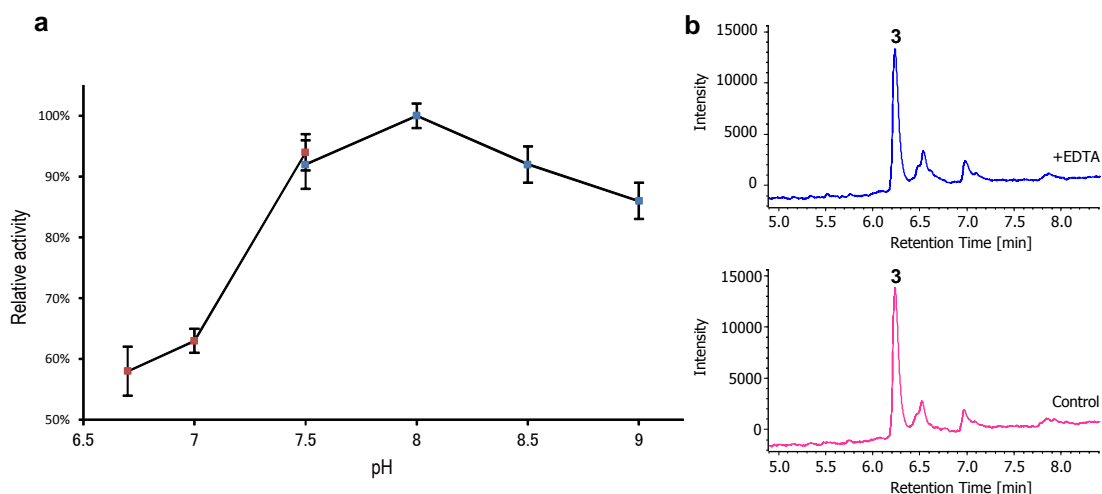


図 3-9 VstJ による反応の至適 pH と金属依存性の検討

a. pH 依存性の検討結果。赤は HEPES を用いた場合、青は Tris を用いた場合を表した。各点は 3 連の結果の平均値を示し、エラーバーは標準誤差を示した。**b.** EDTA 添加 (上) と非添加 (下) の場合の **3** の生産量の比較。290 nm のクロマトグラムを示した。**3** の生産量はそれぞれの条件で差は見られなかった。

第 6 節 VstJ の酵素動力学解析

方法

前節までの結果から VstJ による [4+2] 環化付加反応においては、他の既知の [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素で見られる非酵素的な環化付加反応は全く起こらないことが示された。VstJ による反応が酵素依存的な反応であることを定量的に確かめるため、VstJ の酵素動力学解析を行うこととした。VstJ による [4+2] 環化付加反応を 308 nm の吸光度変化をモニターすることで定量し、酵素動力学のパラメータを算出した。検量線から基質のモル吸光係数は $4700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ とした。反応系は表 3-11 に示し、基質濃度 5、15、30、40、60 μM における生成物量から反応初速度を求めた。動力学的解析には SigmaPlot[®] 12.3 の Enzyme kinetics module を用い、一基質反応の Michaelis-Menten のモデルにフィットさせて解析した。

表 3-11 VstJ 反応溶液 (800 μl)

50 mM	Tris-HCl pH8.0
5, 15, 30, 40, 60 μM	2
0.01 mg ml^{-1}	VstJ

結果

基質濃度の上昇に伴って反応初速度の増加が観察された。初速度は Michaelis-Menten の式に従った(図 3-10)。 K_m は $39 \pm 5 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} は $4.4 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ と算出された。分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素として同定されている SpnF (K_m : $120 \pm 46 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} : $14 \pm 1.6 \text{ min}^{-1}$) と同等の k_{cat}/K_m を持つことが示された⁸²。以上から、VstJ による [4+2] 環化付加反応が完全に酵素依存的な反応であることが示された。

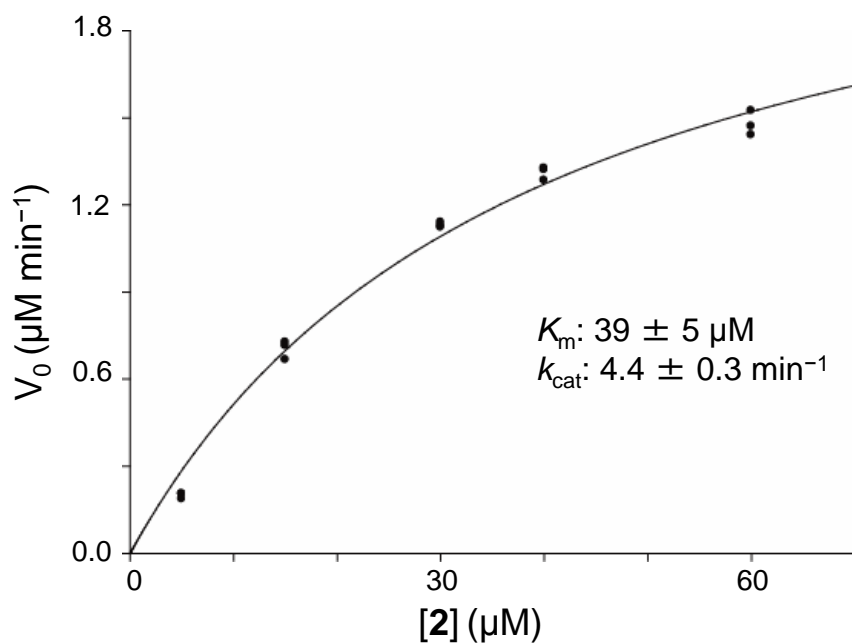


図 3-10 VstJ 反応の酵素動力学解析のための Michaelis プロット

第7節 NOESY 測定と分子動力学シミュレーションによる VstJ 基質のジエン部位の配座および分子全体の柔軟性についての考察

方法

前節までの結果から、VstJ は共役二重結合と 16 結合も離れた二重結合との間の [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素であることを明らかにした。前節で述べたように 70°C で 1 晩保温しても化合物 **2** の非酵素的な環化反応が全く観察されなかった。さらに DMSO 中で一晩静置しても **3** の生成や、分子間 [4+2] 環化付加反応による二量体形成は全く検出されなかった。そのため基質である **2** の反応性は低いことが示唆された。立体配座の観点からは **2** が [4+2] 環化付加反応を起こして **3** へと変換されるためには、①共役ジエンの立体配座が *s-trans* から *s-cis* へと変換すること、②反応溶液中で共役二重結合と 16 結合離れた環外二重結合とが接近すること——の 2 つが起こる必要がある (図 3-11)。一般に *s-cis* 体は *s-trans* 体と比較して不安定であり、存在しないと考えられる。そこで共役ジエンの立体配座について、DMSO 中で **2** の NOESY 測定を行うことで解析した。そこで共同研究者の産業技術総合研究所の広川貴次博士と共に、水溶液中の **2** の振る舞いについて分子動力学シミュレーションを行い、[4+2] 環化付加反応によって結合が形成される 31 位と 29 位の 2 つの炭素原子間の距離が水溶液中での **2** の配座変化によってどのように変わるかについて調べた。

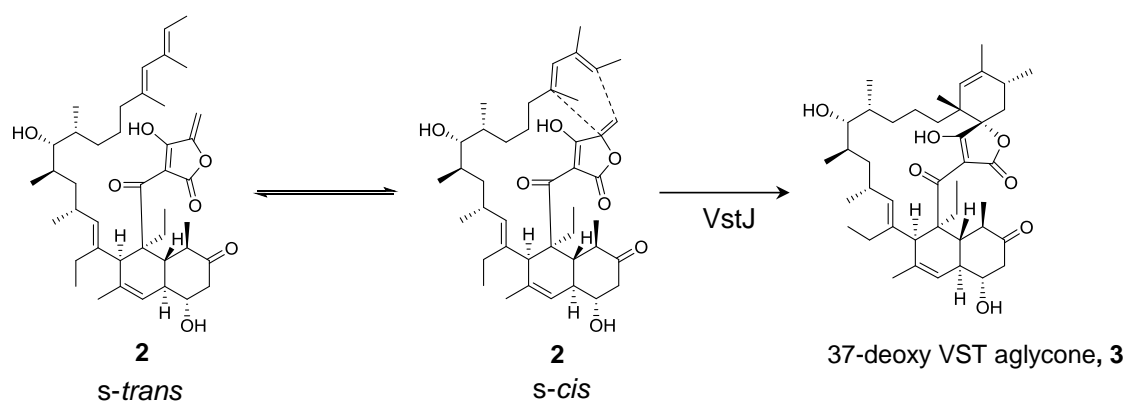


図 3-11 **2** の *s-trans* と *s-cis* の 2 つの立体配座と VstJ による反応

2 の共役ジエンには *s-trans* と *s-cis* の 2 つの配座があり、そのうち *s-cis* のみで [4+2] 環化付加反応が起こる。

結果

NOESY 測定の結果、*s-cis* 体と *s-trans* 体の立体配座それぞれに特異的な相関ピークがともに検出された。このことから反応溶液中においても **2** は *s-trans* と *s-cis* の平衡状態にあるこ

とが示唆された。また、*trans-decalin* 部位の立体については VstJ と同一の立体化学と矛盾しない、NOE 相関が確認された (図 3-12)。

分子動力学シミュレーションの結果は図 3-12 に示した。SpnF の基質を元にした計算モデルでは、酵素がない溶液中での自発的な [4+2] 環化付加反応に伴う結合の形成は、炭素間の距離が 6Å 未満となる場合に初めて起こる¹²⁰。2 の分子動力学シミュレーションの結果、共役ジエン上の 29 位の炭素と 31 位の炭素の距離が、6Å 未満となる頻度は 0.8% と非常に少ないことが示された (図 3-13)。

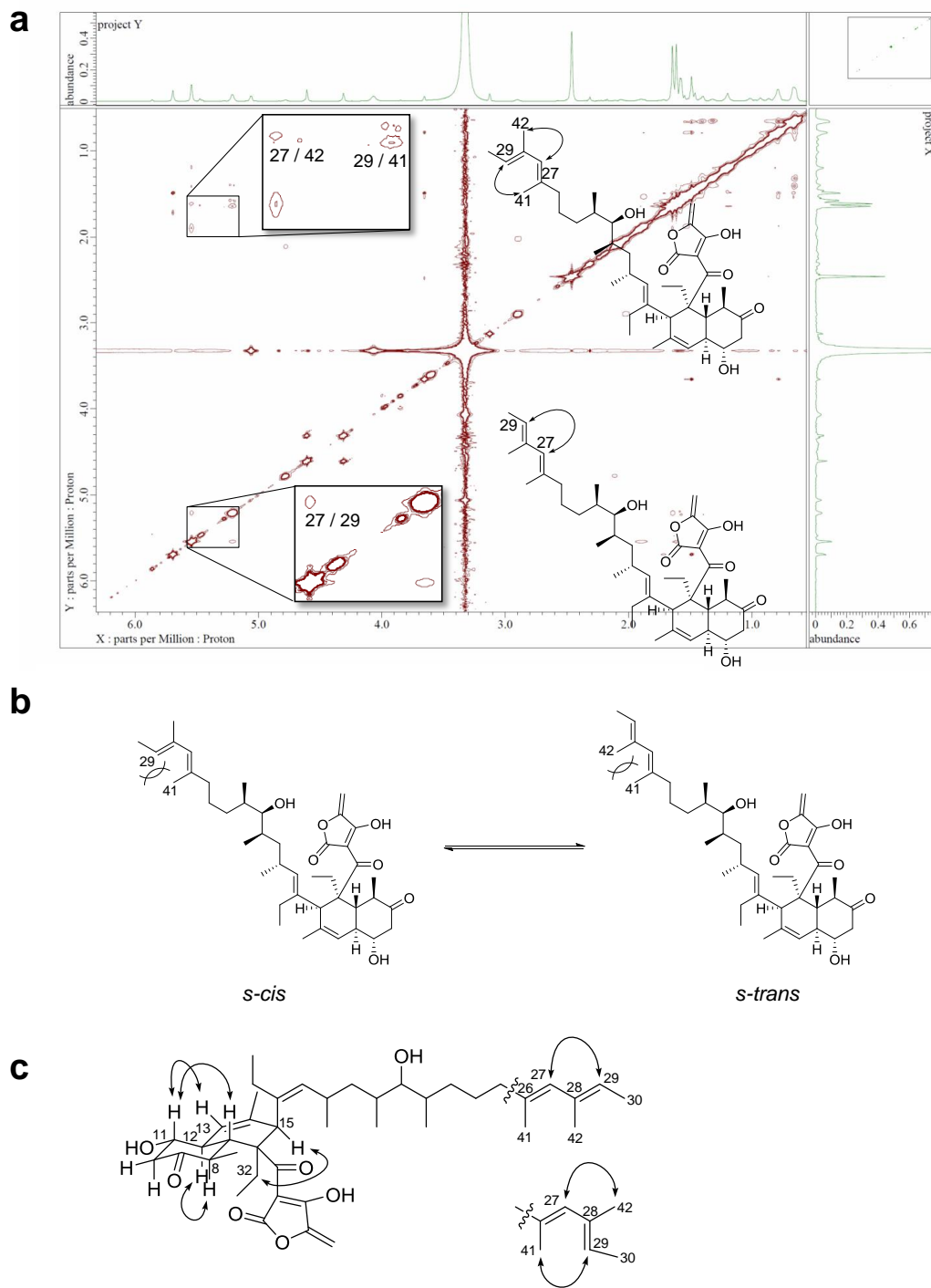


図 3-12 NOE 相関のデータ

a. *s-cis* 体に特異的な相関ピーク ((27/42)と(29/41))と *s-trans* 体に特異的な相関ピーク(27/29)がともに検出された。**b.** 42 位に Me 基があるためどちらの配座でも立体反発に差が無いため、*s-cis* 体と *s-trans* 体とが平衡状態にあると考えられた。**c. 2** の NOE 相関。

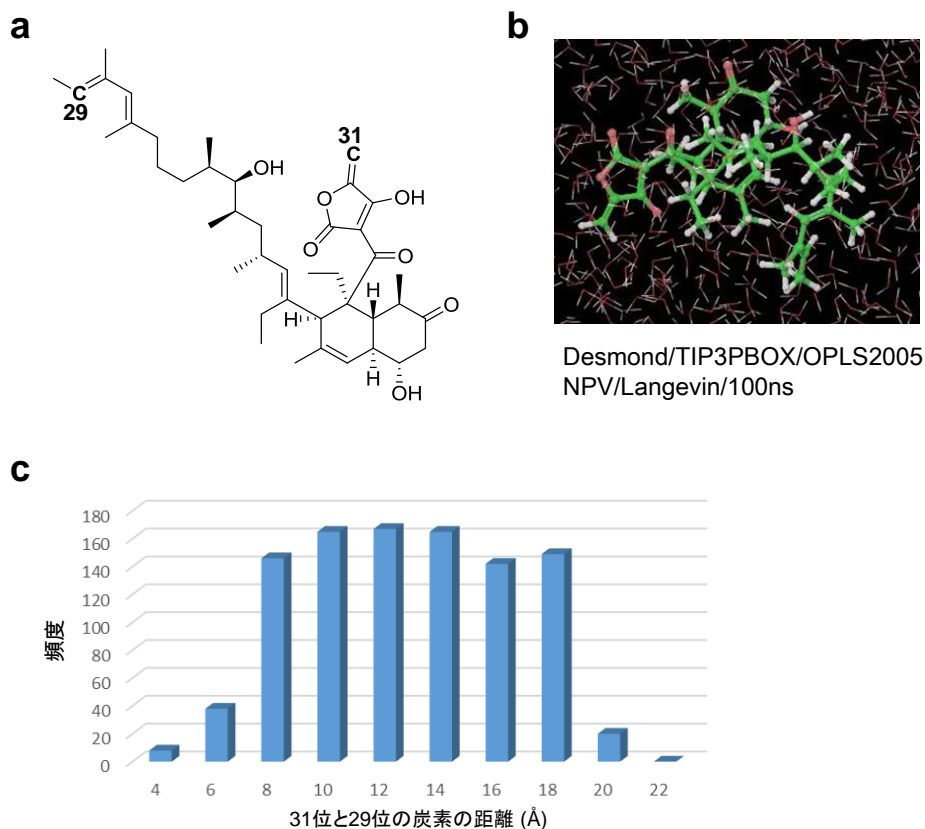


図 3-13 分子動力学シミュレーションの結果

a. 化合物 **2** の構造と 31 位の炭素と 29 位の炭素の位置を **C** で示した。**b.** 分子動力学シミュレーションの様子。条件を図の下に示した。**c.** 分子動力学シミュレーションの結果、31 位炭素と 29 位炭素の距離のヒストグラム。N=1000 の場合の頻度を示した。例として横軸の「4」は 31 位炭素と 29 位炭素の距離が 4 Å 以上 6 Å 未満にある配座の頻度を示す。6 Å 未満になる割合は 0.8%であった。

考察

本章第 1 節から第 7 節ではスピロテロン酸化合物の *vstJ* の機能解析と、基質である **2** の柔軟性への考察を行った。まず、第 1 節で *in silico* でのスピロテロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターの比較により、[4+2] 環化付加反応を触媒する酵素遺伝子の候補を探索した。塩基配列の詳細な解析から abyssomicin 生合成遺伝子クラスター内の *abycyc*、kijanamicin 生合成遺伝子クラスター内の *kijcyc* を見出したことで、既知のスピロテロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターすべてで *vstJ* 遺伝子が保存されていることを見出した (図 3-2、図 3-3)。

一方、スピロテロン酸化合物ではない、直鎖状のテロン酸化合物 tetronomycin の生合成遺伝子クラスター内にも *vstJ* ホモログは見いだされた。tetronomycin は、鎖状の化合物には分子内 [4+2] 環化付加反応を起こす共役ジエンが存在しないため *tmn8* による環化付加反応は進行しないことが考えられる。このことは tetronomycin とスピロテロン酸化合物の生合成遺伝子クラスターとの間に進化的な関連があることを示唆すると考えた。また、kijanamicin、lobophorin、tetrocarcin A の生合成遺伝子クラスターは PKS やテロン酸形成のための遺伝子を始め、生合成遺伝子クラスター内の遺伝子の配置が似通っていた。(図 3-2)

VstJ およびそのホモログのアミノ酸配列は機能が既知のタンパク質とは有意な相同性を示さず、配列情報からその機能推定はできなかった。また、VstJ ホモログ間においても高々 30% 前後の相同性を示すのみであった。しかし、VstJ における 109 番目の Ser 残基から S(T)GRY(F)L(A)G という配列がすべての VstJ ホモログで高度に保存されていることを見出された。そこでこの配列が基質であるテロン酸構造を認識すると推測した (図 3-1)。第 9 節ではこの配列について 1 アミノ酸変異体を作製し、比活性について調べた。

興味深いことに、分子内にスピロテロン酸構造を 4 つ持つ quartromicin 生合成遺伝子クラスター内の遺伝子 *qmnH* には *vstJ* と相同性を示す配列が 2 回繰り返して存在することが示された (図 3-1)。quartromicin の生合成においては分子内 [4+2] 環化付加反応が 4 回行われ、S 体と R 体のスピロ炭素をそれぞれ 2 つ持つ Quartromicin が形成される。QmnH の N 末端側と C 末端側にある VstJ と相同性を示す配列のそれぞれが、4 回の分子内 [4+2] 環化付加反応のうち 2 回ずつを触媒していることが考えられた (図 3-1)。

第 2 節で $\Delta vstJ$ 株から、鎖状の共役ジエンと末端オレフィンを持つ **2** を単離できたことから、VstJ が分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素であることが示唆された。**2** の共役ジエンは 42 位のメチル基の存在のために電子密度が豊富であり、一方、末端オレフィンを持つテロン酸構造は Michael acceptor であるため、電子不足である。そのため正常電子要請型 Diels-Alder 反応を経て **3** が生成すると考えられる (図 3-14)。反応機構として VstJ とテロン酸構造中のカルボニルとの水素結合で LUMO を下げる寄与と、VstJ の活性中心で基質 **2** を [4+2] 環化付加反応へと導かれるように折りたたむ寄与とが考えられるが、両方の寄与の実際については、反応遷移状態についての知見と VstJ の立体構造の解明を待たなければならない。

第4節で VstJ の組換え酵素を用いて **2** を基質とした *in vitro* 試験と生成物 **3** の構造決定を行ったことで、VstJ が **2** を基質に立体選択的な [4+2] 環化付加反応を触媒することが示された。第5節の結果により VstJ は金属非依存的な酵素であることが示された。Diels-Alder 反応は AlCl₃ など、ルイス酸となる金属によって反応が加速することが知られている。EDTA を加えた反応系で VstJ の活性低下は見られなかったため、金属を利用して反応を触媒している可能性は否定された。VstJ のアミノ酸残基の側鎖が水素結合によってテトロン酸と共役している3つのカルボニル基のうちのいずれか、もしくは複数と相互作用し、末端オレフィンの LUMO のエネルギー準位を低下させ、反応をアシストしている可能性が考えられる。

さらに第6節の酵素動力学試験から、**2** の環化付加反応の進行には VstJ が必須であり、酵素非依存的な環化付加反応は検出されないことが示された。VstJ の酵素動力学パラメータは k_{cat} が $4.4 \pm 0.3 \text{ min}^{-1}$ 、 K_m が $39 \pm 5 \text{ }\mu\text{M}$ であった⁸²。序論で述べたように既知の [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素の多くは他の反応を触媒し、引き続いて [4+2] 環化付加反応を触媒するものが多い。[4+2] 環化付加反応の触媒能のみを持つ酵素は SpnF が知られるのみであった⁸²。今回 VstJ の機能を同定したことで、単独で [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素の2例目として報告することができた¹⁰⁸。

VstJ ホモログはすべてのスピロテトロン酸化合物のクラスターに分布していることから他のスピロテトロン酸化合物の生合成においても同様の機構で形成すると考えられる (図3-2)。VstJ の報告に次いで、スピロテトラム酸化合物である pyrroindomycin の生合成における VstJ ホモログ PyrI4 について、機能解析が行われた¹²¹。PyrI4 でも VstJ と同様の [4+2] 環化付加反応を触媒することが示された¹²¹。この結果から、VstJ による [4+2] 環化付加反応が、スピロテトロン酸化合物および類縁化合物であるスピロテトラム酸化合物の生合成においても共通した機構であることが示された。また、PyrI4 の k_{cat} は $342.6 \pm 3.3 \text{ min}^{-1}$ 、 K_m は $224.0 \pm 3.5 \text{ }\mu\text{M}$ であった。VstJ のほうが K_m は 5.7 倍小さいが、 k_{cat} は VstJ のほうが 70 倍も悪いため、 k_{cat}/K_m は PyrI4 のほうが VstJ よりも 10 倍程度良いことが示された。VstJ は生成物として 17 員環を与えるのに対し、pyrI4 は生成物として 11 員環を与える。環サイズの差が反応の k_{cat} に影響していると考察した。

trans-decalin 環を持つスピロテトロン酸化合物においては、スピロ炭素の立体はすべて *S*-体であることが知られている。序論で述べた分子内 Diels-Alder 反応を利用した chlorothricolide の合成研究では *S*-体と *R*-体とは混合物として得られることが示されている⁶⁹。このことから、生合成においては酵素が [4+2] 環化付加反応の立体選択性を制御していると推定できる。

一方、*trans*-decalin 環を持たない abyssomicin の立体は *R*-体であること、分子内にスピロテトロン酸構造を4つ持つ quartromicin では2つが *R*-体、残る2つは *S*-体という非常に対称性の高い構造を持つことが知られている。一方で abyssomicin の合成研究では *R*-体選択的に生成物が得られていた。abyssomicin や quartromicin といった *trans*-decalin 環を持たない基質

を用いる場合の立体選択性は生合成過程で VstJ ホモログが制御している可能性の他に、基質に依存している可能性も考えられる。

第7節での NOESY 測定から、**2** の共役ジエンは *s-trans* と *s-cis* との平衡状態にあることが示された。さらに分子動力学シミュレーションの結果から **2** が非常にフレキシブルな分子であり、溶液中での自発的な **2** の共役ジエンと末端オレフィンとの接近は困難であることが示唆された (図 3-14)。末端オレフィンから共役ジエンまでは 16 結合離れており、VstJ がどのようにフレキシブルな **2** の立体配座をコントロールしているのか、スピロテトラム酸部位の *R*-体と *S*-体の立体化学はどのように制御されているのか、末端オレフィンの活性化に関与するアミノ酸残基はあるのか、もしあるならどのアミノ酸残基が機能しているのかについて知見を得られることを期待し、次節で VstJ、および VstJ ホモログである Abycyc の結晶構造解析に取り組んだ。

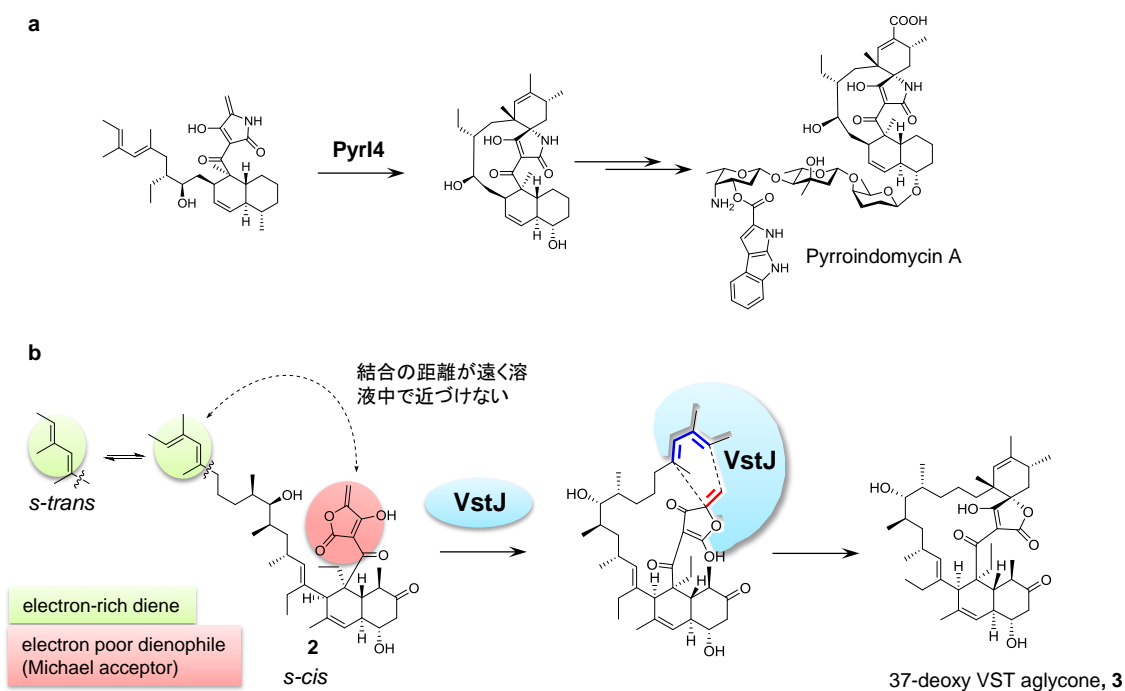


図 3-14 第1節から第7節までで明らかにされた VstJ の機能

a. スピロテトラム酸化合物である pyrroindomycin 生合成における PyrI4 の機能。VstJ と同様の *trans*-decalin 環を持つ、鎖状の基質に対して末端オレフィンと共役ジエン同士の間の [4+2] 環化付加反応を触媒することでスピロテトラム酸構造を形成する。**b.** VstJ による **2** の [4+2] 環化付加反応の予想触媒機構。電子豊富な共役ジエンと電子不足な求ジエン体との間の [4+2] 環化付加反応なので正常電子要請型 Diels-Alder 反応と考えられる。VstJ はフレキシブルな **2** を制御し、共役ジエンと末端オレフィンとを近づける機能を持つことが考えられる。

第 8 節 VstJ および abyssomicin 生合成遺伝子クラスター中の VstJ ホモログ酵素 Abycyc の結晶構造解析とホモロジーモデリングによる VstJ の基質認識機構の推定

前節までに VstJ が新奇な [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素であることを明らかにした。これまでに、[4+2] 環化付加反応を触媒する天然の酵素で結晶構造が明らかにされた例は、MPS⁷⁸ と SpnF¹²² のみしか知られておらず、それらの反応機構の詳細は明らかとなっていない。

既知の[4+2]環化付加反応を触媒する酵素のうち、鎖状のポリケタイドの分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する例として、LovB⁷⁵ および SPS⁷³ が知られている。どちらも *trans*-decalin 環の生合成に関与し、共役ジエンから 5 結合離れた求ジエン体との [4+2] 環化付加反応を触媒する。一方 VstJ の基質は長い鎖状炭素鎖の末端の共役ジエンとオレフィンとの間で [4+2] 環化付加反応を触媒する。反応が起こるオレフィンから共役ジエンまでは 16 結合も離れており、前節での分子動力学シミュレーションの結果、基質となる **2** は非常にフレキシブルなことが強く示唆された。VstJ と相同性を持つ酵素による他のスピロテロン酸の生合成においても、同様に末端オレフィンを持つフレキシブルな鎖状分子の両端の [4+2] 環化付加反応によってスピロテロン酸構造が形成すると考えられる。VstJ の立体構造の情報を得ることで、VstJ およびそのホモログがこのフレキシブルな基質の立体配座をどのように制御し、環化に導いているのかについて知見が得られることを期待した。そこで VstJ の結晶構造解析に取り組んだ。さらに当研究室が保有する放線菌 *Verrucosipora gifhornensis* YM28-088 のドラフトゲノムシーケンス内に abyssomicin 生合成クラスターが見いだされ、*vstJ* ホモログである Abycyc 遺伝子が保存されていたため、これについても結晶化スクリーニングを試みた。

第 1 項 組換え VstJ を用いたタンパク質結晶化条件のスクリーニング

方法

第 3 節と同様の条件で精製した N 末端に His タグを付加した VstJ についてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、組換えタンパク質を調製した。ゲル濾過クロマトグラフィーにて VstJ の溶液中での分子量を見積もり、会合状態について調べた (図 3-15)。ゲル濾過クロマトグラフィーの条件は実験項に記載した。

結晶化条件のスクリーニングは、20°C でのハンギングドロップ-蒸気拡散法により行った。結晶化条件には、Crystal ScreenTM I、Crystal ScreenTM II、PEG/ION screenTM I、(以上すべて Hampton Research)、および WizardTM I、WizardTM II、WizardTM III (以上すべて Emerald Biosystems) を用いた。タンパク質は 10 mg ml⁻¹ の VstJ、および終濃度 0.5 mM の **2** および

3 を添加し試料とした。

結果

ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出体積による分子量測定の結果、VstJ は 42 kDa と見積もられた。VstJ 単量体の理論分子量が 17 kDa であることから、VstJ は溶液中で 3 量体を形成すると判断した。C 末端に His タグを付加したタンパク質、および N 末端の His タグを thrombin 処理により除いたサンプル等についてもスクリーニング条件等の検討を行ったが、これまでに、VstJ について良好な結晶は得られていない。

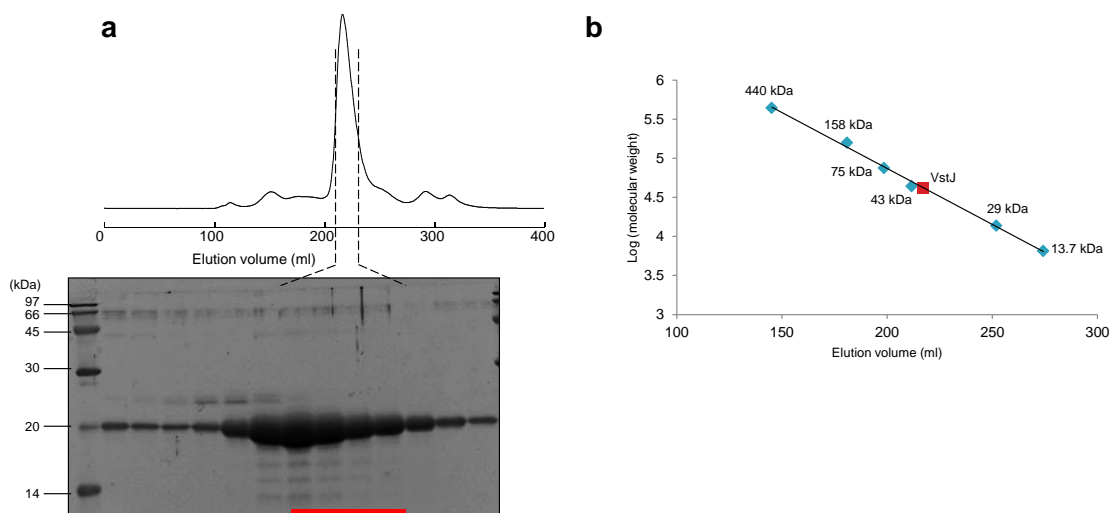


図 3-15 VstJ の結晶化のためのサンプル調製

a. ゲル濾過クロマトグラフィー後の画分の SDS-PAGE。赤線を引いた画分を濃縮し、結晶化に用いた。b. ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定の結果。

第2項 組換え Abycyc を用いたタンパク質結晶化条件のスクリーニング

方法

当研究室が保有する *Verrucospora giffhornensis* YM28-088 のゲノムから *abycyc* 遺伝子を見出した。見出された遺伝子はデータベース上に登録されている *Verrucospora maris* AB-18-032 株の *abycyc* 遺伝子 (accession number: JF752342) と同一のアミノ酸配列であった。表 3-12 に示したプライマーを用いて増幅した遺伝子を pT7blue-Tvector へと TA クローニングし、塩基配列を確認した。その後、*NcoI* および *HindIII* を用いて pHIS8 へとクローニングし pHIS8-vstJ を構築した。構築したプラスミドを大腸菌 BL21(DE3) へと導入し、VstJ と同様に Ni²⁺-アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを行うことで精製した (図 3-16)。精製の詳細は実験項に記した。精製した Abycyc と **2** を反応させたが、反応は進行しなかった。

結晶化条件のスクリーニングは、VstJ と同様に 20°C でのハンギングドロップ蒸気拡散法により行った。結晶化条件には、Crystal ScreenTM I、Crystal ScreenTM II、PEG/ION screenTM I、(以上すべて Hampton Research)、および WizardTM I、WizardTM II、WizardTM III、OzmaTM PEG 10K 48-Salt crystallization screen (以上すべて Emerald Biosystems) を用いた。試料として 10 mg ml⁻¹ の Abycyc を用いた。また結晶が得られた条件については、タンパク質濃度、pH、および沈殿剤濃度の最適化を行った。

表 3-12 遺伝子増幅用プライマー (pHIS8 用)

pHis8-AbycycFw	5'-GGG <u>CCATGG</u> CACTGAGCGACTGGAGACGCG-3'	(<i>NcoI</i>)
pHis8-AbycycRv	5'-GGG <u>AAGCTT</u> TCACTCGCCGAGCAGGATCC-3'	(<i>HindIII</i>)

結果

ゲル濾過クロマトグラフィーの溶出体積による分子量測定の結果、Abycyc は 43 kDa に相当する溶出体積で溶出した (図 3-16)。Abycyc も VstJ と同様の 3 量体を形成すると判断した。OzmaTM PEG 10K No. 4 (0.2 M Ammonium formate、10% PEG 10,000) の条件で 10 mg ml⁻¹ の Abycyc を添加した試料溶液のドロップから結晶が得られたため、その条件の最適化を行った。最終的に 10 mg ml⁻¹ の Abycyc 溶液をタンパク質試料に用いて 0.1 M MES-NaOH pH6.0、8% PEG10,000、0.2 M Ammonium formate の条件で良好な結晶を得ることができた (図 3-16)。

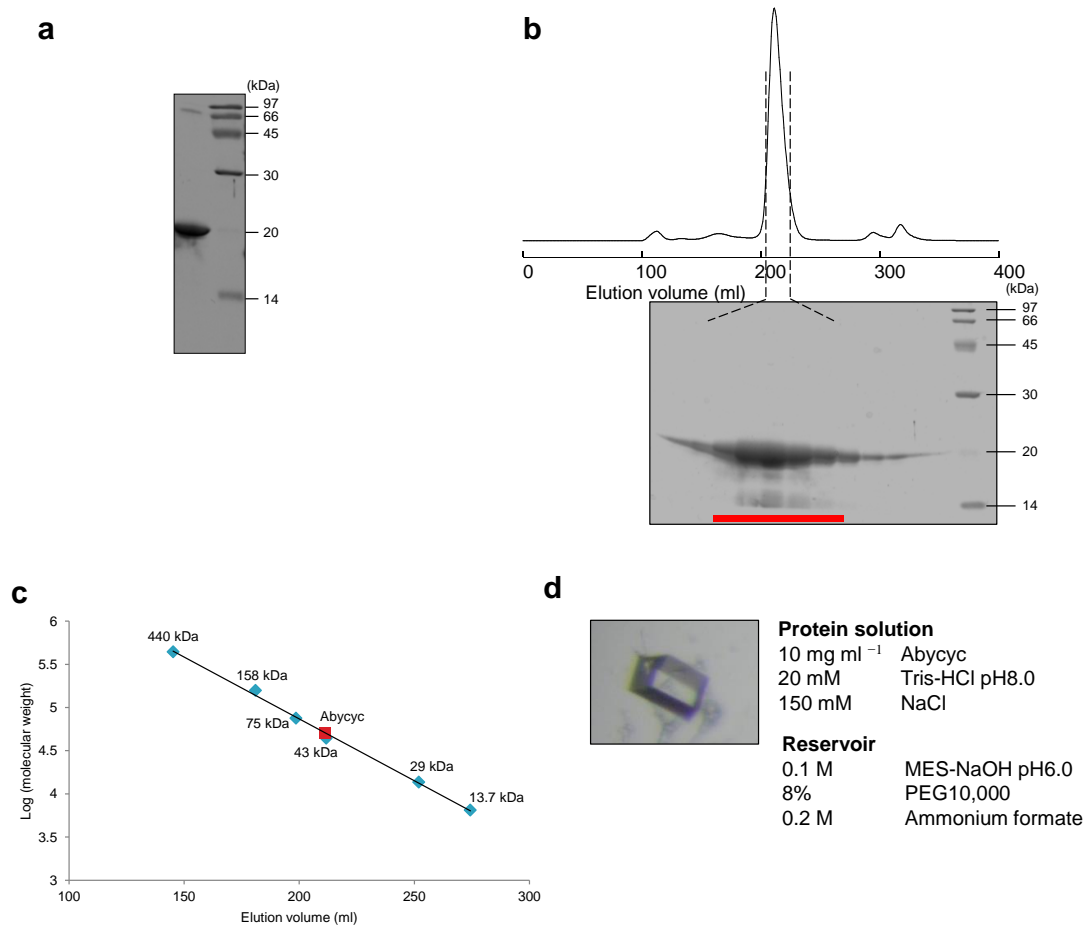


図 3-16 Abycyc の結晶化

a. Ni²⁺アフィニティーカラムによる精製画分の SDS-PAGE。 **b.** ゲル濾過クロマトグラフィ後の画分の SDS-PAGE、赤線を引いた画分を濃縮し、結晶化に用いた。 **c.** ゲル濾過クロマトグラフィによる分子量測定の結果。 **d.** Abycyc の結晶。

第3項 Se-Met タンパク質の調製、結晶化

方法

Se-Met 置換体タンパク質は、大腸菌のメチオニン要求株である B834(DE3) に pHis8-abycyc を導入することで異種発現した。タンパク質は Ni²⁺-アフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて精製した (図 3-17)。精製の詳細は実験項に記した。精製したタンパク質試料を用いて Native タンパク質で結晶が得られた OZMA 10K No. 39 (0.2 M Sodium formate、10% PEG 10,000) の条件を元に結晶化条件の最適化を行った。

結果

10 mg ml⁻¹ の Abycyc 溶液をタンパク質試料に用いて 0.1 M MES-NaOH pH6.3、4% PEG10,000、0.2 M sodium formate の条件で良好な結晶を得ることができた。

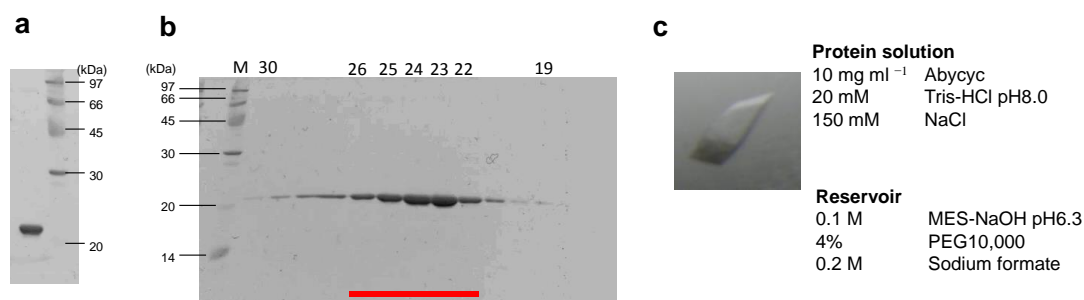


図 3-17 Abycyc の Se-Met 置換体の結晶化

a. Ni²⁺アフィニティークラムによる精製画分の SDS-PAGE。 **b.**ゲル濾過クロマトグラフィー後の画分の SDS-PAGE。赤線を引いた画分を濃縮し、結晶化に用いた。 **c.** Se-Met 置換体 Abycyc の結晶。

第4項 X線回折データ収集

方法

Abycyc の Native タンパク質の結晶は佐用郡佐用町の SPring-8 のビームライン BL26B2、Abycyc の Se-Met 置換体タンパク質の結晶の回折データはつくば市の高エネルギー加速研究機構 (KEK) の Photon Factory のビームライン NW12 でそれぞれ収集した。結晶をドロップから取り出し、直にクライオストリームが吹き付けているゴニオメーターにマウントした。Native 結晶のデータ測定における X 線の波長は 1.0 \AA にて行った。Se-Met 置換体結晶については Se の XAFS 測定を行い、プログラム CHOOCH を用いて Peak 波長を 0.97910 \AA と決定した。Index、integrate、scaling のデータ処理はプログラム HKL2000 を用いて行い、結晶の空間群、および格子定数を決定した¹²³。

結果

Native では 2.35 \AA 、Se-Met 置換体では 3.2 \AA の分解能の回折データを取得した。Se-Met 置換体の取得した回折データについて、単波長異常分散 (SAD) 法による構造決定を PHENIX¹²⁴ の HySS¹²⁵ を用いて試みたが、構造決定には至らなかった。

第5項 *in silico* 解析による VstJ の予想構造とドッキングシミュレーション

方法

前項までに VstJ および Abycyc の組換えタンパク質を用いて結晶構造解析を行ったが VstJ および Abycyc の構造については情報を得られなかった。

VstJ のアミノ酸配列を元にタンパク質の立体構造を構造予測サーバ Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>) を用いて予測したところ、*Physcomitrella patens* (ヒメツリガネゴケ) 由来の allene oxide cyclase (*PpAOC*) (PDBID: 4H69) が VstJ と構造的に類似するリモートホモログであることが示唆された (confidence: 96.3%)。PpAOC はジャスモン酸合成において、ジャスモン酸前駆体の (9Z)-(13S)-12,13-Epoxyoctadeca-9,11,15-trienoate (12,13-EOT) を基質とし、環化反応を触媒することで (15Z)-12-oxophyto-10,15-dienoate (OPDA) を生成する反応を触媒する¹²⁶ (図 3-19)。PpAOC は 8 枚の β シートから成る β バレル構造を取り、3 量体で機能することが結晶構造から示されている¹²⁷。

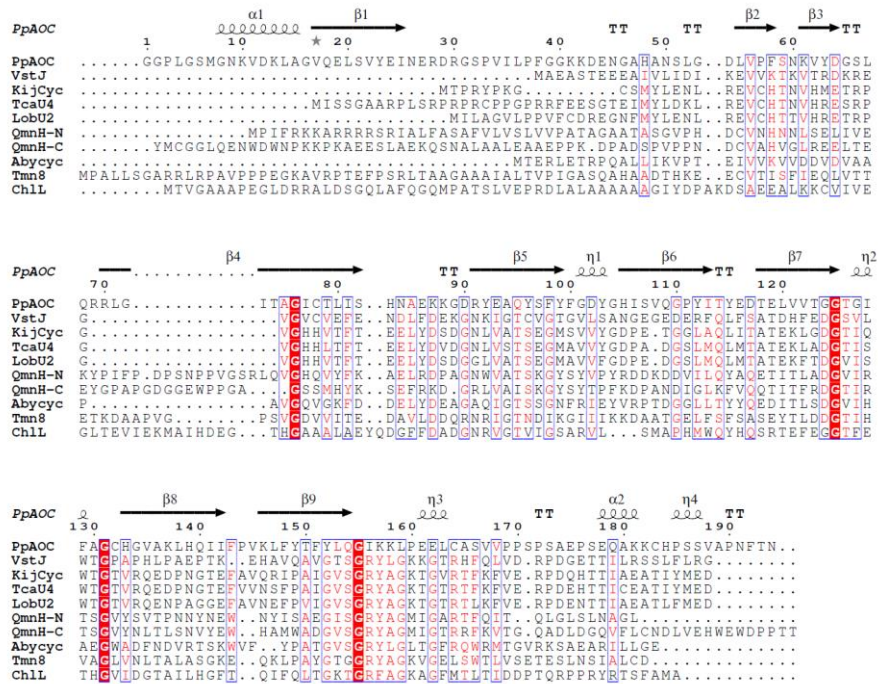
そこで共同研究者である産業技術総合研究所の広川貴次博士と共に、VstJ のモデル構造について構築した。阻害剤である vernolic acid がリガンドとして結合している PpAOC (PDB ID: 4H69) を鋳型として VstJ の立体構造モデリングを行った。モデリングによって取得できたアポ体の VstJ の立体構造に対して、37-deoxy VST aglycone (**3**) の最安定配座を用いてドッキングシミュレーションを行った。

結果

溶媒のない条件における VstJ の立体構造モデルが得られた。構造の妥当性の検証のため、100 ナノ秒の MD シミュレーションを得られた VstJ に対して行い、VstJ の構造が保たれることを確認した。もし構造が適当でない場合には MD シミュレーションにより、バレル構造の崩壊が観察されるが、そのような知見は得られなかった。このことから得られた構造は妥当なものと判断した。得られた VstJ の構造は PpAOC の構造と類似した 8 枚の逆並行型 β シートから成る β バレル構造だった。

次に 37-deoxy VST aglycone (**3**) とアポ体の VstJ とのドッキングシミュレーションを行った。その結果、37-deoxy VST aglycone (**3**) は VstJ のバレル内部のポケットへと結合することが示唆された。結合の際には、反応によって形成されるスピロテロン酸部位が活性中心と考えられる β バレルの奥に収納されるような向きで結合することが示唆された。バレル内部には Leu や Val、Phe などの疎水的なアミノ酸が位置し、これらが **3** の周囲を取り囲むように存在することで、疎水的な相互作用によって **3** が認識されることが示唆された。バレル底部にはテンプレートに用いた PpAOC の構造と同様に、Glu8 残基が活性中心ポケットの唯一の親水性アミノ酸として位置していた (図 3-20)。

a



b

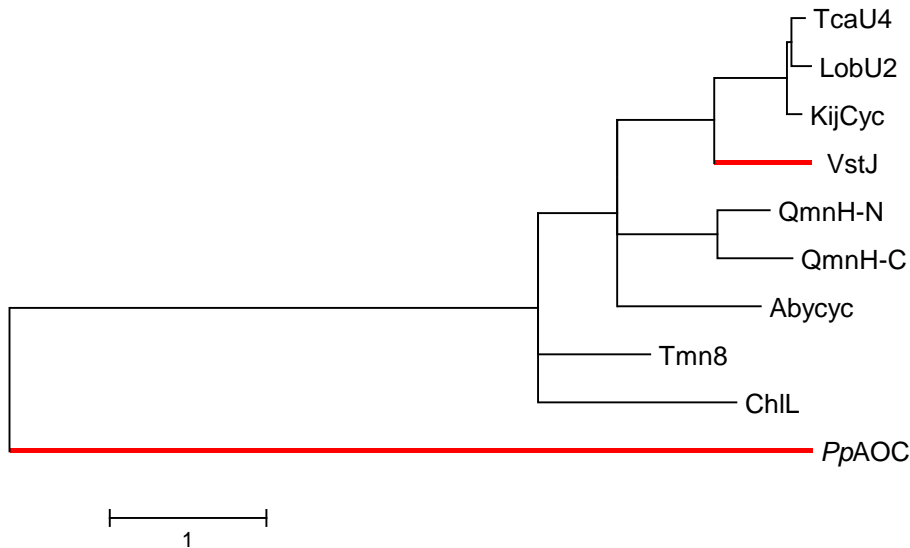


図 3-18 PpAOC と VstJ とのマルチプルアラインメントと系統樹

a. VstJ ホモログと PpAOC とのアラインメント。PpAOC の構造 (PDBID: 4h69) の二次構造をアラインメントの上に示した。**b.** VstJ と PpAOC の分子進化系統樹。作製には ClustalW (ver2.1) を用いた。Protein weight matrix は BLOSUM を用いた。VstJ ホモログと PpAOC とが別の clade に分岐し、進化的な関連が弱いことが示唆された。

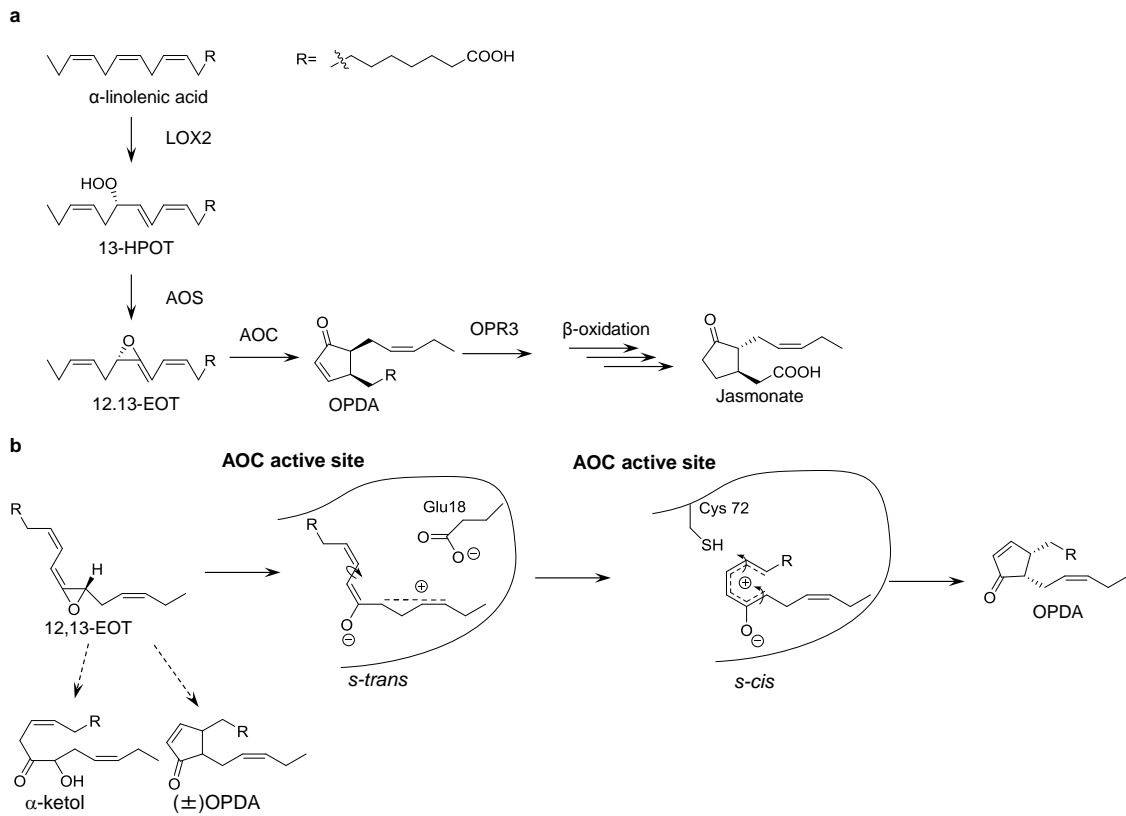


図 3-19 AOC の機能と反応機構

a. ジャスモン酸の生合成経路。 **b.** *Pp*AOC による 12, 13-EOT から OPDA への変換反応の触媒機構。

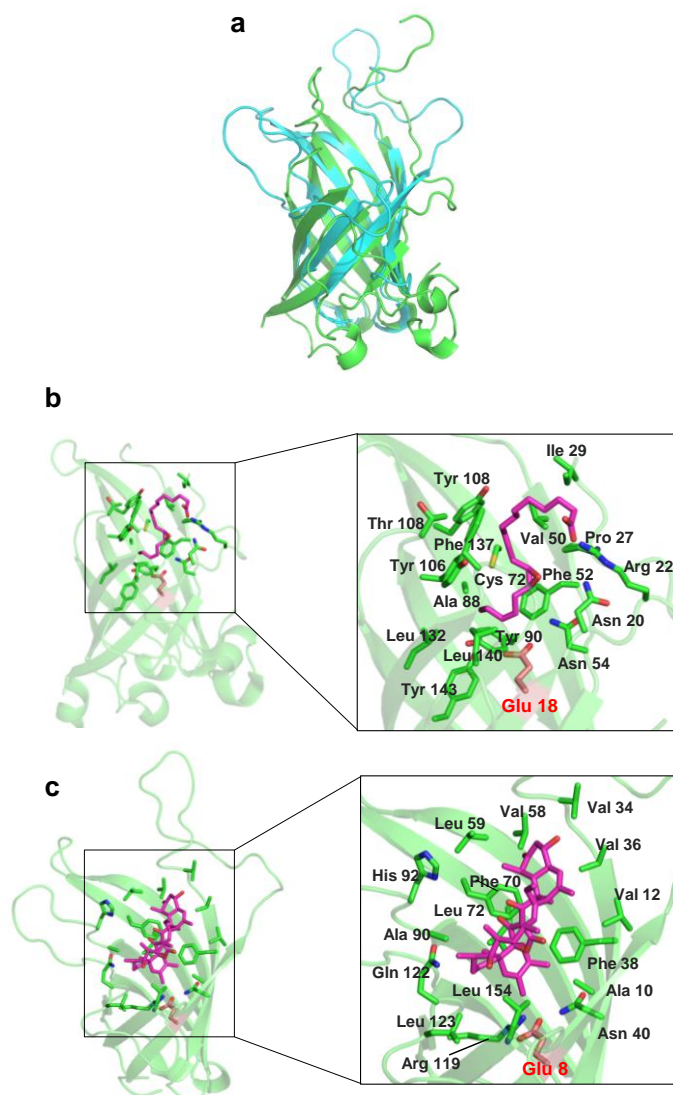


図 3-20 ホモロジーモデリングに得られた VstJ のモデル構造

a. テンプレートに用いた *PpAOC* の構造と、モデリングによって得られた VstJ のアポ構造とを重ね合わせて示した。VstJ をシアンで示し、*PpAOC* をグリーンで示した。b. *PpAOC* と生合成中間体を模倣した阻害剤である vernolic acid の共結晶。vernolic acid を紫の stick 表示で示し、リガンドの認識に関与する残基を stick 表示で示した。疎水性の残基がバレル内部に多数存在し、疎水的な相互作用で認識されていることが示された。バレルの底には、ピンクで示した触媒機構に関与する Glu18 が唯一の親水性残基として存在している。c. VstJ の apo 構造に対する 37-deoxy VST aglycone (**3**) の再安定配座のドッキングシミュレーションの結果。テンプレートに用いた *PpAOC* のリガンドとの共結晶と同様に **3** を紫色の stick 表示で示し、リガンドの認識に関与しそうな残基について緑の stick 表示で示した。*PpAOC* と同様に、疎水性の残基が **3** を取り囲むように位置し、バレル内部の活性中心の底には、ピンクで示した Glu8 残基が位置した。

第9節 ミュータント VstJ の活性測定による活性残基の探索

前節での VstJ の立体構造モデリングの結果、および PpAOC の触媒機構からの類推により、スピロテトロン酸部位が活性中心の底の Glu8 が酵素活性に関与することが示唆された。また VstJ ホモログとのアラインメントを取った結果、保存されているアミノ酸残基が見出された。特に VstJ における 109 番目の Ser 残基から S(T)GRY(F)L(A)G という配列がすべての VstJ ホモログで高度に保存されていることを見出した (図 3-1)。中でも R111 残基はすべてのホモログで保存されていたため、基質である **2** の末端オレフィンと共役しているカルボニル基と相互作用することで求ジエン体の LUMO のエネルギー準位を低下させ、分子内 [4+2] 環化付加反応を進行させる役割を持つことを予想した。

そこで、保存されているアミノ酸残基に対して、それぞれの Ala 置換体を作製し、比活性を調べることで VstJ 反応に重要な残基を探索することとした。Glu8 については、隣り合ったアミノ酸残基 Glu7 および Glu9 についても変異体を作成し、Ala 置換体のほかに Gln 置換体も作製した。

方法

置換したアミノ酸は図 3-21 のアラインメントに▼または▽で示した。アミノ酸置換体のプラスミドは pHIS8-vstJ をテンプレートに用いて、表 3-13 に示したプライマーを用いて、QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用いて作製した。作製したプラスミドを BL21(DE3) へ形質転換し、本章第 3 節と同じ方法で精製した。精製したタンパク質を用いて表 3-14 に示した反応液組成で 30°C、30 分反応を行った後、酢酸エチルにて反応産物を抽出した後減圧下で酢酸エチルを留去し、残渣を MeOH に溶かし、表 3-10 に示した条件で LC にて分析した。抽出や分析における実験誤差を補正するため、内部標準として Naringenin を用いた。各精製酵素の 290 nm のクロマトグラムにおける **3** の面積値を相対的に比較することで、野生型酵素と比較した相対活性を示した。

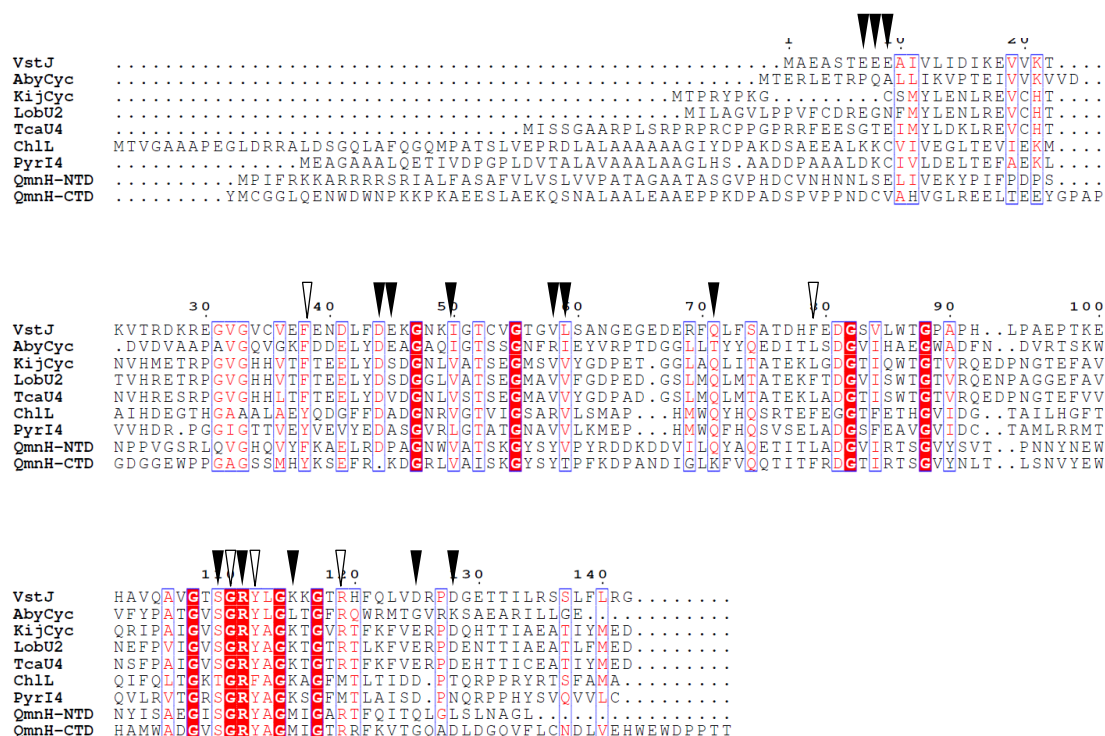


図 3-21 VstJ ホモログのアラインメントと、VstJ において変異体を作成したアミノ酸残基黒および白の三角で変異体を作成したアミノ酸残基を示した。黒の三角で示したアミノ酸残基の置換体は可溶性タンパク質として得られた。白の三角でアミノ酸残基を Ala 置換した場合には、VstJ が不溶化し可溶性タンパク質として得られなかった。

表 3-13 pHis8-vstJ の SDM 用プライマー

pHis8-VstJ-E7Q-F:	5'-GAGGCATCGACCcagGAGGAAGCCATTG-3'
pHis8-VstJ-E7Q-R:	5'-CAATGGCTTCCTCctgGGTCGATGCCTC-3'
pHis8-VstJ-E8Q-F:	5'-GCATCGACCGAAcagGAAGCCATTGTC-3'
pHis8-VstJ-E8Q-R:	5'-GACAATGGCTTCctgTTCGGTCGATGC-3'
pHis8-VstJ-E9Q-F:	5'-CGACCGAAGAGcagGCCATTGTCCTC-3'
pHis8-VstJ-E9Q-R:	5'-GAGGACAATGGCctgCTCTTCGGTCG-3'
pHis8-VstJ-E7A-F:	5'-GAGGCATCGACCgcgGAGGAAGCCATTG-3'
pHis8-VstJ-E7A-R:	5'-CAATGGCTTCCTCcgCGTCGATGCCTC-3'
pHis8-VstJ-E8A-F:	5'-GCATCGACCGAAgCGAAGCCATTGTC-3'
pHis8-VstJ-E8A-R:	5'-GACAATGGCTTCcgTTCGGTCGATGC-3'
pHis8-VstJ-E9A-F:	5'-CGACCGAAGAGgCGGCCATTGTCCTC-3'
pHis8-VstJ-E9A-R:	5'-GAGGACAATGGCcgCTCTTCGGTCG-3'
pHis8-VstJ-F38A-F:	5'-GTGTGCGTCGAGgCGGAGAACGACCTC-3'

pHIS8-VstJ-F38A-R: 5'-GAGGTCGTTCTCcgCCTCGACGCACAC-3'
 pHIS8-VstJ-D44A-F: 5'-GAACGACCTTTCgCGAGAAGGGCAAC-3'
 pHIS8-VstJ-D44A-R: 5'-GTTGCCCTTCTCgCGAAGAGGTCGTTC-3'
 pHIS8-VstJ-E45A-F: 5'-GACCTCTTCGACgCGAAGGGCAACAAG-3'
 pHIS8-VstJ-E45A-R: 5'-CTTGTTGCCCTTcCGTTCGAAGAGGTC-3'
 pHIS8-VstJ-I50A_F: 5'-GAAGGGCAACAAGgCGGGAACGTGCGTC-3'
 pHIS8-VstJ-I50A-R: 5'-GACGCACGTTCCcCGCTTGTTGCCCTTC-3'
 pHIS8-VstJ-V58A-F: 5'-GTCGGGACAGGCgCGCTGTCCGCCAAC-3'
 pHIS8-VstJ-V58A-R: 5'-GTTGGCGGACAGcCGCCTGTCCCGAC-3'
 pHIS8-VstJ-L59A-F: 5'-GGGACAGGCGTCgCGTCCGCCAACGGC-3'
 pHIS8-VstJ-L59A-R: 5'-GCCGTTGGCGGAcCGGACGCCTGTCCC-3'
 pHIS8-VstJ-Q71A-F: 5'-GACGAAAGGTTcCGCTCTTCAGCGCC-3'
 pHIS8-VstJ-Q71A-R: 5'-GGCGCTGAAGAGcCGGAACCTTTCGTC-3'
 pHIS8-VstJ-F79A-F: 5'-GCCACGGACCACgCGGAGGACGGCTCC-3'
 pHIS8-VstJ-F79A-R: 5'-GGAGCCGTCTCcgCGTGGTCCGTGGC-3'
 pHIS8-VstJ-S109A-F: 5'-GCGGTGGGCACGgCGGGCCGGTACCTG-3'
 pHIS8-VstJ-S109A-R: 5'-CAGGTACCGGCCcCGTGCCACCGC-3'
 pHIS8-VstJ-G110A-F: 5'-GTGGGCACGAGTgCGCGGTACCTGGGC-3'
 pHIS8-VstJ-G110A-R: 5'-GCCCAGGTACCGcCGACTCGTGCCAC-3'
 pHIS8-VstJ-R111A-F: 5'-GGCACGAGTGGCgCGTACCTGGGCAAG-3'
 pHIS8-VstJ-R111A-R: 5'-CTTGCCCAGGTACGCGCCACTCGTGCC-3'
 pHIS8-VstJ-Y112A-F: 5'-CACGAGTGGCCGGgCGCTGGGCAAGAAG-3'
 pHIS8-VstJ-Y112A-R: 5'-CTTCTTGCCCAGcCGCCGACTCGTG-3'
 pHIS8-VstJ-K115A-F: 5'-CGGTACCTGGGCgCGAAGGGGACGAGG-3'
 pHIS8-VstJ-K115A-R: 5'-CCTCGTCCCCTTcCGGCCAGGTACCG-3'
 pHIS8-VstJ-R119A-F: 5'-CAAGAAGGGGACGgCGCACTTCCAGCTC-3'
 pHIS8-VstJ-R119A-R: 5'-GAGCTGGAAGTGcCGCTCCCCTTCTTG-3'
 pHIS8-VstJ-D125A-F: 5'-TTCCAGCTCGTCgCGCGGCCGACGGT-3'
 pHIS8-VstJ-D125A-R: 5'-ACCGTCGGGCCGcCGGACGAGCTGGAA-3'
 pHIS8-VstJ-D128A-F: 5'-GTCGACCGGCCcCGGGTGAGACCACG-3'
 pHIS8-VstJ-D128A-R: 5'-CGTGGTCTCACcCGGGCCGGTTCGAC-3'

変異を入れるための塩基配列を小文字で示した。

表 3-14 VstJ 変異酵素の比活性測定の実験条件

50 mM	Tris-HCl pH8.0
60 μ M	2
10 μ M	Naringenin (IS)
10 μ g ml ⁻¹	VstJ

結果

F38A、F79A、G110A、Y112A、R119A の変異酵素については不溶性となり、可溶性画分に得られなかった。このことからこれらの残基は VstJ の構造形成に重要であることが示唆された (図 3-23)。可溶性タンパク質として E7A、E8A、E9A、E7Q、E8Q、E9Q、D44A、E45A、I50A、V58A、L59A、Q71A、S109A、R111A、K115A、D125A、D128A を得た (図 3-22)。各酵素の比活性を図 3-22 に示した。結果について以下に述べる。変異体の後の()内は相対活性を表した。E7A (99.0%)、E8A (97.3%)、E9A (96.5%)、E7Q (69.5%)、E8Q (90.8%)、E9Q (74.0%)、D44A (91.9%)、S109A (107.1%)、R111A (86.6%)、D125A (69.8%)、D128A (71.3%) では大きな比活性の低下は見られなかった。これらの比活性の結果から、VstJ のドッキングシミュレーションで触媒活性に関与することが示唆された Glu8 残基は VstJ の活性に重要ではないこと、さらにアラインメント上で保存されているように見られた S(T)GRY(F)LG 配列の残基についても VstJ の活性には影響しないことが示された。一方で E45A (32.2%)、I50A (10.2%)、V58A (50.9%)、L59A (22.2%)、Q71A (5.2%)、K115A (35.0%) では、大幅な比活性の低下することが示された。これらの残基、特に I50A、Q71A が VstJ の触媒活性において重要であることが示唆された (図 3-23)。

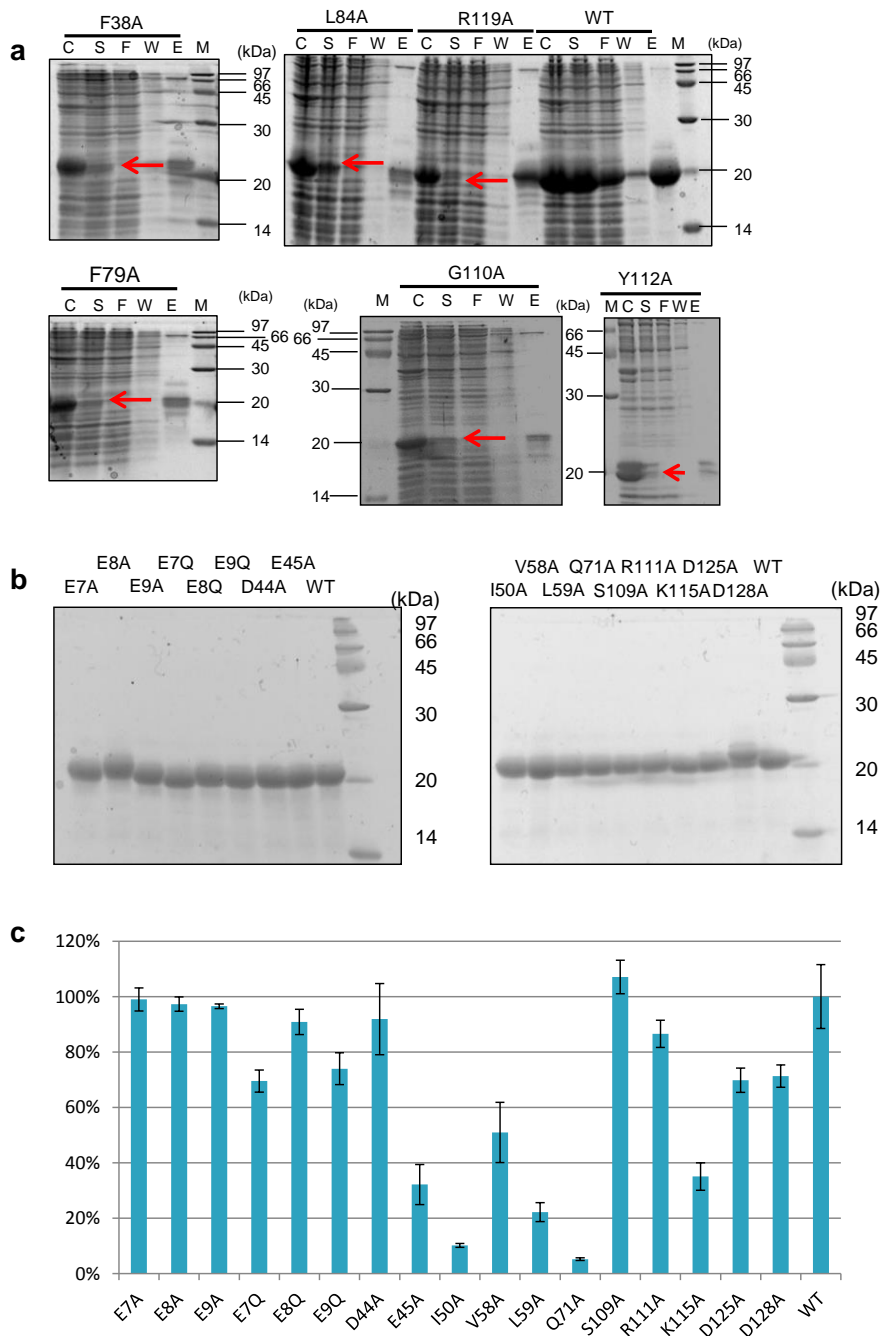


図 3-22 VstJ 変異体の SDS-PAGE と比活性測定の結果

a. 不溶性画分に得られた VstJ 変異体の SDS-PAGE の結果。C: 総タンパク質、S: 可溶性画分、F: Ni^{2+} -アフィニティーカラム非結合画分、W: Ni^{2+} -アフィニティーカラム非特異的結合画分、E: 精製画分、M: 分子量マーカーを示した。可溶性画分において赤矢印で示した箇所にバンドが得られなかったため不溶性と判断した。**b.** 可溶性タンパク質として得られた VstJ 変異体の SDS-PAGE。**c.** 各変異体酵素の比活性の結果。棒グラフは 3 回の測定結果の平均を示し、エラーバーは標準誤差を示した。

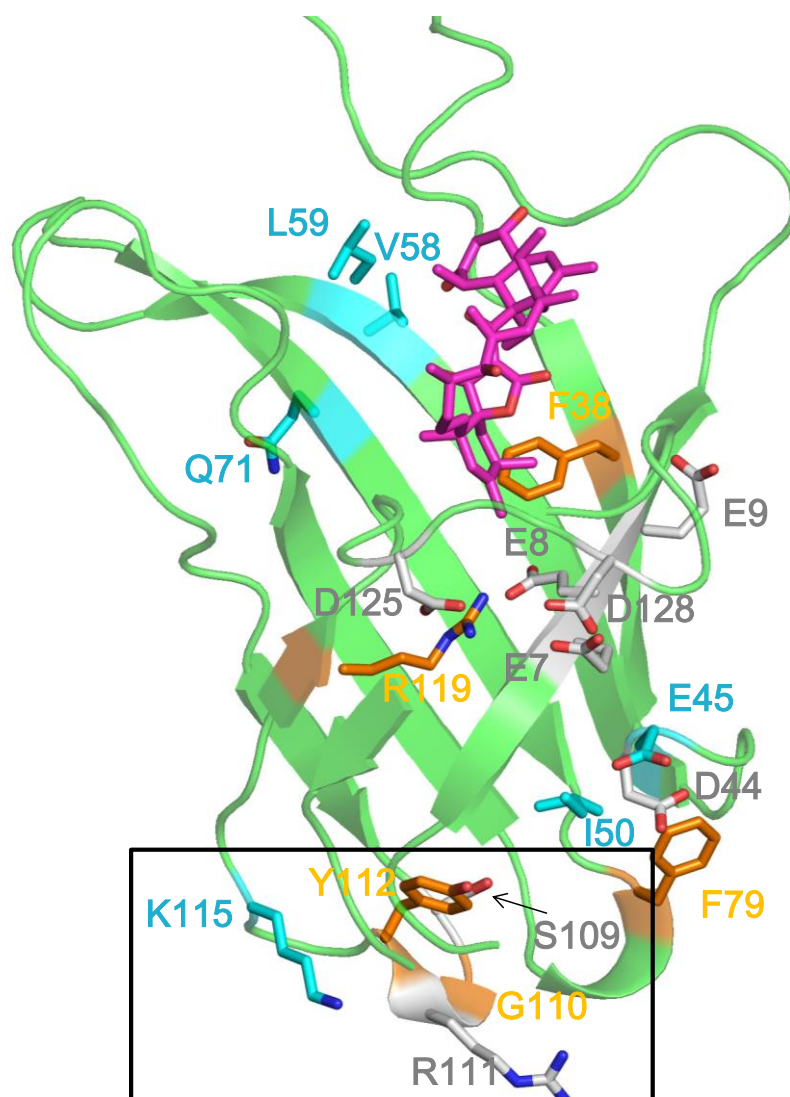


図 3-23 VstJ 変異酵素の結果

Ala 置換によって、不溶性になった残基をオレンジ、比活性に大きな変化がなかった残基をグレー、比活性が 50%以下となった残基をシアン色の stick 表示で示した。S(T)GRY(F)LG 配列にあたる残基を黒の枠で囲んで示した。見やすさのため、バレル手前の β シートを隠し、R119 と E8 が見えるように表示した。

考察

第 8 節第 1 項から第 5 項では VstJ および abyssomicin 生合成遺伝子クラスター内の VstJ ホモログ、Abycyc についての構造情報を得るために VstJ の結晶構造解析を試みた。VstJ についてはスクリーニングを行ったが良好な結晶を得ることはできなかった。一方、Abycyc については Native タンパク質、および Se-Met タンパク質について結晶を取得し、回折データの収集を行った。それぞれ 2.35Å、3.20Å の分解能で回折データを収集した。しかしながら、SAD 法での構造決定を試みたが構造決定には至らなかった。Abycyc 内には開始メチオニンを含めて Met 残基が 2 つしか存在しないことが SAD 法による位相決定を困難にしている可能性が考えられる。現在、VstJ と Abycyc についてさらなる結晶化条件の検討を行っている。

タンパク質の立体構造について情報が得られなかったため、VstJ についてモデリングを行った。その結果、PpAOC と構造が類似した 8 枚の逆並行 β シートから成る β バレル構造を取ることが示唆された。また、ドッキングシミュレーションにより、VstJ の活性中心ポケット内部の最奥ヘスピロテロン酸構造を収めるように 3 が結合することが示唆された。さらに β バレル構造活性中心ポケット内部は疎水的なアミノ酸残基が存在すること、活性中心の底には Glu8 残基が存在することが示唆された (図 3-20)。

そこで第 9 節で VstJ の活性に重要なアミノ酸について変異体の比活性を測定することで調べた。活性中心に位置すると考えられた Glu8 残基、および VstJ における 109 番目の Ser 残基から保存されている S(T)GRY(F)L(A)G 配列の各残基について Ala 置換体を作製し、比活性について調べた。また、VstJ ホモログ間で保存されているアミノ酸残基についても Ala 置換体を作製し、比活性を調べた。その結果、Glu8 残基と S(T)GRY(F)L(A)G 配列の残基については、変異体で比活性が低下するものの取得はできなかった。S(T)GRY(F)L(A)G 配列は活性中心とは離れた位置に存在することがモデル上で示された (図 3-23)。

変異を入れた残基のうち、VstJ ホモログ間で比較的保存度が高い E45A、I50A、V58A、L59A、Q71A、K115A においては活性が低下していることが示された。このことからこれらのアミノ酸残基が VstJ の活性に関与することが示唆された。活性が低下したもののうち、V58A、L59A、Q71A については活性中心の入り口付近に位置した。一方で、E45A、I50A、K115A は活性中心からは離れた位置に存在した (図 3-23)。これらがどのように作用して VstJ の活性に影響を及ぼしているのかについては不明である。またバレル内部の残基である F38 や R119 の Ala 置換によって VstJ が不溶性となることが示された (図 3-23)。

今回 VstJ のモデル構造のテンプレートに用いられた PpAOC は Lipocalin ファミリータンパク質と呼ばれるタンパク質ファミリーに属する。Lipocalin ファミリータンパク質にはレチナル結合タンパク質などが知られ、疎水的な β バレルのポケットに疎水性分子を結合することで、結合する疎水性低分子の細胞間の物質輸送などに関与することが知られている¹²⁸。AOC においても β バレル内部の疎水的な活性中心に、基質である 12,13-EOT が結合し、5 員環を形成する。12,13-EOT は反応性が高いため、AOC がない場合でも、自発的に分

解反応を受け α -ketol とラセミ体の OPDA へと変換される。AOC による反応では基質の活性化よりも立体制御を AOC が行っていると考えられる。AOC による反応は 12,13-EOT の共役二重結合の立体配座が *s-trans* から *s-cis* へと変化することが必要であり、活性中心ポケットの基質結合サイトはこの異性を許容するように空間的な余裕がある構造となっていることが結晶構造において示されている (図 3-19)。

VstJ においても基質である **2** は非常に疎水性の高い分子であり、おそらく β バレル内部の疎水的なポケットに **2** が結合して反応が起こることが期待できる一方で、フレキシブルな **2** の両末端を VstJ が積極的に近づける役割を持つことも予想できる。そのためには rigid な β バレル構造の他に、大きく稼働可能なループ構造などが基質ポケット付近に存在し、**2** と相互作用しながら、基質の運動を助けるようにループが動くことで、活性中心へ基質の両末端を導くような機構が考えられる。今後 VstJ による触媒反応についてより確実な知見を得るには、結晶構造解析 VstJ の立体構造情報の取得が必要と考えられる。さらには溶液内でのタンパク質の NMR 等により、VstJ と基質の相互作用する残基の情報や、反応進行とともにどのように構造が変化するかについての動的な知見が得られればより詳細な VstJ の触媒機構を明らかにできると考えられる。

本章ではこれまでに知られていなかったスピロテロン酸形成に必須の [4+2] 環化付加反応を触媒する VstJ の分子基盤を確立し、VstJ が非常にフレキシブルな分子 **2** の 16 結合も離れた末端オレフィンと共役ジエンとの間で [4+2] 環化付加反応を触媒する新奇なタンパク質であることを示した。またホモロジーモデリングから VstJ 構造は Lipocalin ファミリーのタンパク質と類似した β バレル構造を取り、反応は β バレル内部の疎水的なポケットで行われることが強く示唆された。

第4章 4083-SVS6 生合成遺伝子クラスター内に見出された *trans*-AT
型 type I PKS を中心とする生合成遺伝子クラスターの異種
発現

第4章 4083-SVS6株のドラフトシーケンス内に見出された *trans*-AT型 type I PKS を中心とする生合成遺伝子クラスターの異種発現

これまでに、放線菌の全ゲノムシーケンス情報の解析から、1種の放線菌は、平均して20-30個の生合成遺伝子クラスターを持つことが明らかにされつつある⁴。一方で、一般的に多くの遺伝子クラスターは実験室における培養条件では発現しないことも報告されている。このような眠った (“silent”) 生合成遺伝子クラスターを利用する方法の一つに異種放線菌での遺伝子発現が用いられている。そこで第1章で取得した4083-SVS6株のドラフトシーケンスおよびBACライブラリを活用することで、4083-SVS6株が持つ未知の巨大生合成遺伝子クラスター由来の新規中分子化合物を取得することを目指し、研究に取り組んだ。

第1節 *in silico* 解析による未利用生合成遺伝子クラスターの探索

方法

第1章で取得した4083-SVS6株のドラフトゲノムシーケンスにおいて、ポリケタイド合成酵素および非リボソームペプチド合成酵素の周辺を精査し、遺伝子クラスターの探索を行った。特にcosmidライブラリでの最大インサート長である40 kbを越える生合成遺伝子クラスターに焦点を当て、コスミドライブラリでは取得できないような生合成遺伝子クラスターの取得を目指して探索することとした。

結果

4083-SVS6株のドラフトゲノムシーケンスからVST生合成遺伝子クラスター以外でI型PKSを含む生合成遺伝子クラスターとして、図4-1に示した*trans*-AT型 type I PKSとNRPSを含む87.7 kbにわたる推定生合成遺伝子クラスター領域を見出した。この他に40 kbを越える生合成遺伝子クラスターは見いだされなかった。クラスター内の各遺伝子のBLAST検索を用いたアノテーションの結果を表4-1に示した。

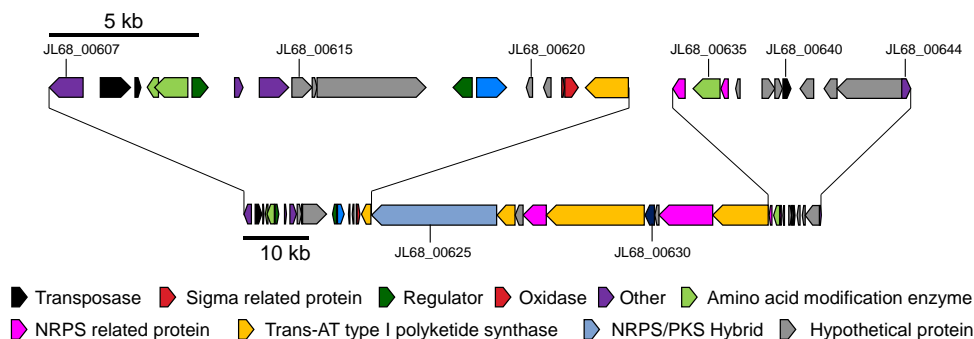


図 4-1 4083-SVS6株から見出された *trans*-AT型 type I PKSとNRPSを含む生合成遺伝子クラスター

表 4-1 BLAST 検索による各遺伝子の機能予測

PKS、NRPS のドメイン構成については()内に示した。また oxazolomycin 生合成遺伝子と
 相同性を示すものについては対応する遺伝子を()内に書いた

Gene	Amino acids (aa)	Proposed function	Blast hit protein [Origin]	Identity/ Similarity (%)	Accession number
JL68_00607	367	geranylgeranyl diphosphate synthase	geranylgeranyl diphosphate synthase [<i>Streptomyces viridochromogenes</i>]	86/88	WP_048579142
JL68_00608	302	transposase	transposase IS4 family protein [<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. rimosus ATCC 10970]	35/38	ELQ77076
JL68_00609	65	transposase	transposase IS4 family protein [<i>Streptomyces rimosus</i> subsp. rimosus ATCC 10970]	9/9	ELQ77076
JL68_00610	117	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase [<i>Streptomyces bingchenggensis</i>]	23/23	WP_014181123
JL68_00611	360	aromatic-L-amino-acid decarboxylase	Aromatic-L-amino-acid decarboxylase [<i>Streptomyces bingchenggensis</i>]	57/59	WP_014181123
JL68_00612	173	AsnC family transcriptional regulator	AsnC family transcriptional regulator [<i>Streptomyces bingchenggensis</i>]	91/92	WP_014181122
JL68_00613	87	reverse transcriptase	Reverse transcriptase [<i>Kitasatospora medicidica</i>]	14/14	WP_051967238
JL68_00614	318	error-prone DNA polymerase	DNA polymerase III subunit alpha [<i>Streptomyces viridochromogenes</i>]	19/20	WP_048581641
JL68_00615	216	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Streptomyces europaescabiei</i>]	80/82	WP_050357623
JL68_00616	54	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Streptomyces azureus</i>]	94/98	GAP50810
JL68_00617	1172	CHAT domain-containing protein	CHAT domain-containing protein [<i>Streptomyces azureus</i>]	91/93	WP_050357622
JL68_00618	211	TetR family transcriptional regulator	TetR family transcriptional regulator [<i>Streptomyces sp. Root55</i>]	80/82	KQZ17900
JL68_00619	330	aldehyde oxidase	aldehyde oxidase [<i>Streptomyces sp. R1-NS-10</i>]	88/92	WP_019074701
JL68_00620	69	-	-	-	-
JL68_00621	81	Hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Streptomyces sp. NRRL B-24891</i>]	26/33	WP_046497470
JL68_00622	97	Sigma associated protein	sigma associated protein [<i>Streptomyces azureus</i>]	57/59	GAP48060
JL68_00623	362	RNA polymerase ECF-subfamily sigma factor	RNA polymerase sigma24 factor [<i>Streptomyces mirabilis</i>]	90/92	WP_037751925
JL68_00624	1090	malonyl CoA-ACP transferase	malonyl CoA-ACP transferase (OzmM) [<i>Streptomyces albus</i>]	54/59	ABS90474
JL68_00625	6040	NRPS/PKS Hybrid (KS-KR-ACP-C-A(gly)-T-KS-KR- ACP-KS-KR-ACP-KS)	NRPS/PKS (OzmH) [<i>Streptomyces albus</i>]	39/43	ABS90470

Gene	Amino acids (aa)	Proposed function	Blast hit protein [Origin]	Identity/ Similarity (%)	Accession number
JL68_00626	885	PKS	PKS (OzmQ) [<i>Streptomyces albus</i>]	55/60	ABS90478
JL68_00627	400	Hypothetical protein	Hypothetical protein (OzmP) [<i>Streptomyces albus</i>]	71/78	ABS90477
JL68_00628	1155	NRPS	NRPS (OzmO) [<i>Streptomyces albus</i>]	52/56	ABS90476
JL68_00629	4872	PKS	PKS(OzmN) [<i>Streptomyces albus</i>]	51/55	ABS90475
JL68_00630	455	Cytochrome P450	Cytochrome P450 [<i>Streptomyces</i> sp. NRRL WC-3753]	62/67	WP_054101996
JL68_00631	193	-	-	-	-
JL68_00632	2669	NRPS	NRPS [<i>Streptomyces toyocaensis</i>]	70/74	WP_051858436
JL68_00633	2755	modular polyketide synthase	modular polyketide synthase [<i>Streptomyces bingchengensis</i> BCW-1]	47/51	ADI03434
JL68_00634	136	4'-phosphopantetheinyl transferase	4'-phosphopantetheinyl transferase [<i>Streptomyces toyocaensis</i>]	34/36	WP_037928816
JL68_00635	290	L-proline 3-hydroxylase	L-proline cis-3-hydroxylase [<i>Streptomyces</i> sp. NRRL F-6131]	73/78	WP_030310055
JL68_00636	79	MbtH-like protein	MbtH-like protein [<i>Mycobacterium smegmatis</i>]	55/64	WP_003891720
JL68_00637	60	-	-	-	-
JL68_00638	139	polyketide synthase	polyketide synthase [<i>Streptomyces</i> sp. NRRL WC-3753]		WP_054101955
JL68_00639	78	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Streptomyces albus</i>]	82/87	WP_032779783
JL68_00640	91	transposase	transposase [<i>Streptomyces</i> sp. CNS615]	14/14	WP_017950101
JL68_00641	144	Hypothetical protein	glyoxalase_2 domain containing protein [<i>Streptomyces azureus</i>]	90/91	GAP49106
JL68_00642	130	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Streptomyces</i> sp. NRRL S-813]	84/88	WP_030170328
JL68_00643	739	Hypothetical protein	Hypothetical protein [<i>Streptomyces cellulosa</i>]	71/74	WP_051858360
JL68_00644	99	2-phosphosulfolactate phosphatase	2-phosphosulfolactate phosphatase [<i>Streptomyces europaicae</i>]	35/36	WP_046704064

第2節 推定生合成遺伝子クラスター領域を含むBACクローンの取得と異種発現株による化合物の生産

方法

推定生合成遺伝子クラスターの全長を取得するため、第1章で作成したBACライブラリから表4-2に示すプライマーを用いて、第1章と同様にPCRによるスクリーニングを行い、推定生合成遺伝子クラスター領域を含むBACクローンの取得を行った。得られたBACクローンについては、*S. lividans* TK23株、および*S. albus* J1074株に導入し、*S. lividans* TK23および*S. albus* J1074株へ形質転換した。形質転換体をPC-1培地10mlを入れたバネ入り試験管にて2日間、30°C、300rpmにて培養した後、培養液と等量のアセトンを加えて抽出した。アセトンを減圧下で留去した後、残った水層に対して等量の酢酸エチル抽出を行った後、溶媒を留去しサンプルとした。得られたサンプルをメタノールに溶かし、表4-3の条件でLC/UV、およびLC/MSにて分析した。

表 4-2 スクリーニング用プライマーとPCR条件

JL68_PN1_3F :	5'- GCTGTAGACGTGCGAGGGTAGAG -3'
JL68_PN1_3R :	5'- GATGCTGGAGGAGGTGATGTACG -3'
JL68_PN1_4F :	5'- TGCTTCTCCAGGCTGATATGTGTC -3'
JL68_PN1_4R :	5'- CCTACACCGAGATGTACACCACCA -3'

結果

87.7 kbにわたる推定生合成遺伝子クラスター領域を含む160 kbのインサートDNAを含むBAC、pKU503DJL68_PN1_P10-C12を取得した。これを導入した*S. lividans* TK23::pKU503DJL68_PN1_P10-C12、*S. albus* J1074::pKU503DJL68_PN1_P10-C12、および4083-SVS6株のPC-1培地での培養抽出物のLCによる分析の結果、*S. lividans* TK23::pKU503DJL68_PN1_P10-C12では溶出時間4.58minに、*S. lividans* TK23野生株では見られない未知化合物(6)が見出された(図4-2)。6は276nmと328nmとに特徴的な極大吸収を示した。HR-ESIMS(-)分析の結果、 m/z 451.2249 [M-H]⁻ (calcd. mass for C₂₆H₃₁N₂O₅⁻: 451.2238)のシグナルが検出され、6の分子式はC₂₆H₃₂N₂O₅であることが判明した(図4-2)。本化合物6は*S. albus* J1074::pKU503DJL68_PN1_P10-C12株、および4083-SVS6株では検出されなかった。大量培養のための培養条件検討のため、*S. lividans* TK23::pKU503DJL68_PN1_P10-C12について、PC-1培地10mlを入れたバネ入り試験管にて2日間培養した後、K培地、A94964生産培地、ISP培地、GYM培地、A1培地、各100ml

入りバッフル付三角フラスコにて 27°C、180 rpm、3 日間培養したサンプルについて同様の抽出操作を経て分析したが、**6** の生産は検出できなかった。

そこで PC-1 培地 10 ml を入れたバネ入り試験管の培養条件ままスケールアップした条件で、共同研究者である産業技術総合研究所の泉川美穂博士とともに得られたピーク **6** の単離精製と構造決定を行った。その結果図 4-2 に示した oxazole、triene を部分構造に持つ構造であることが決定された (図 4-2)。

表 4-3 LC 分析条件

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	A, water (+ 0.1% formic acid); B, methanol (+ 0.1% formic acid) 2-98% B over 6 min 98% B for 2 min
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40°C
Detector	Photo Diode Array (X-LC™ 3110MD, JASCO, Tokyo, Japan)

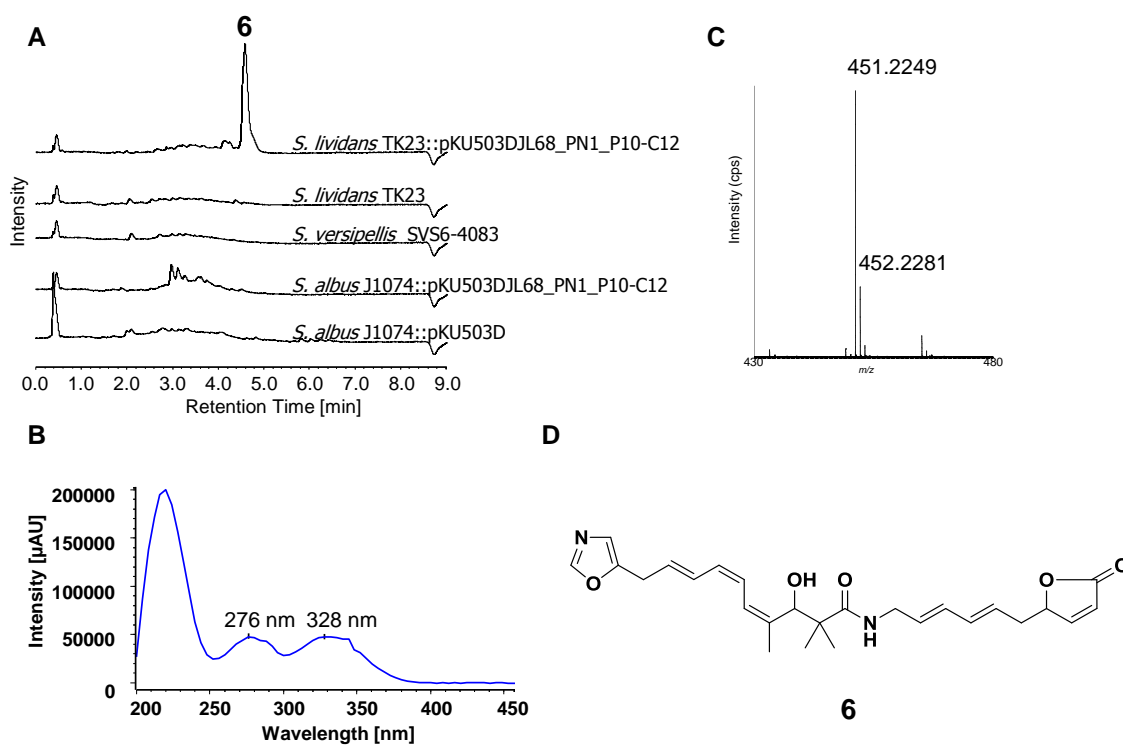


図 4-2 pKU503DJL68_PN1_P10-C12 の導入による遺伝子クラスターの異種発現

A. 各異種発現株および 4083-SVS6 株の培養抽出物の LC 分析によって得た 328 nm におけるクロマトグラム。B. *S. lividans* TK23::pKU503DJL68_PN1_P10-C12 サンプルの溶出時間 4.58 分における UV-VIS スペクトル。C. 目的ピークの HR-ESIMS (−) 解析の結果 D. NMR によって決定された **6** の構造。

考察

以上の結果より、4083-SVS6 株のゲノム上に存在する未利用生合成遺伝子クラスターを見出し、*S. lividans* TK23 株を宿主とした異種発現系にて Oxazolomycin と類似の oxazole、triene を部分構造に持つ新規化合物の決定に成功した。4083-SVS6 株では **6** の生産は確認されず、*S. lividans* TK23 株を宿主に用いた場合にのみ **6** の生産が確認された。*S. albus* J1074 株を宿主とした系では、**6** の生産は確認されなかった。このことから、宿主で利用されない生合成遺伝子クラスターでも適切なホストを用いることで遺伝子を異種発現させ、未知の化合物を取得できることが実証された。一方で、*S. lividans* TK23 株を宿主に用いた場合でも、バネ入り試験管を用いて PC-1 培地の条件でのみ **6** の生産が確認されたことから、遺伝子発現のためには宿主の検討の他に古典的な培養条件等の検討も有効であることが示された (図 4-2)。

Oxazolomycin の生合成遺伝子クラスターは既に報告されているため¹²⁹、これとの比較により生合成遺伝子クラスターのドメイン構造から、**6** の生合成機構を図 4-3 のように推定した。生合成機構は oxazolomycin の生合成経路と類似していた。Oxazole 環の形成は oxazolomycin の PKS-NRPS との比較から、最初のモジュール上の formate transferase domain によって転移された formyl 基から分子内環化反応によって形成すると考えた。Oxazolomycin の PKS-NRPS と比較して、**6** の生合成経路では DH ドメインを欠いたモジュール (モジュール 1、2、3、4、7、8) が存在することが示された。一方で得られた **6** の構造には DH ドメインによる脱水反応によると考えられる二重結合が **6** つ確認できた。このことから、truncate な DH ドメインの機能を持つタンパク質が存在し、脱水反応を担っていることが考えられる。しかしながらこの DH ドメインの機能にあたる反応を触媒するタンパク質の候補は相同性検索からは見いだされなかった。

Oxazolomycin の生合成と異なり、**6** はモジュール 11 以降にはロードされず、モジュール 10 上で切り出されてしまうような形で得られていることが推定できた。Trans-AT type の I 型 PKS によって生合成される pederin や calyculin の生合成では伸長反応の途中のモジュールで PKS から切り出される生合成機構が提唱されている^{130, 131}。また、他の可能性として異種発現株で、00632 が発現していないことも考えられる。

もし 00632 が発現していないなら、00632 の上流配列、もしくは生合成遺伝子クラスターの経路特異的な転写制御因子と考えられる 00623、00618、00612 の遺伝子の上流配列に *ermE* などのプロモーターなどを配置することで、下流の遺伝子の発現を促進し、**6** とは異なる構造の化合物が取得できることを期待している。

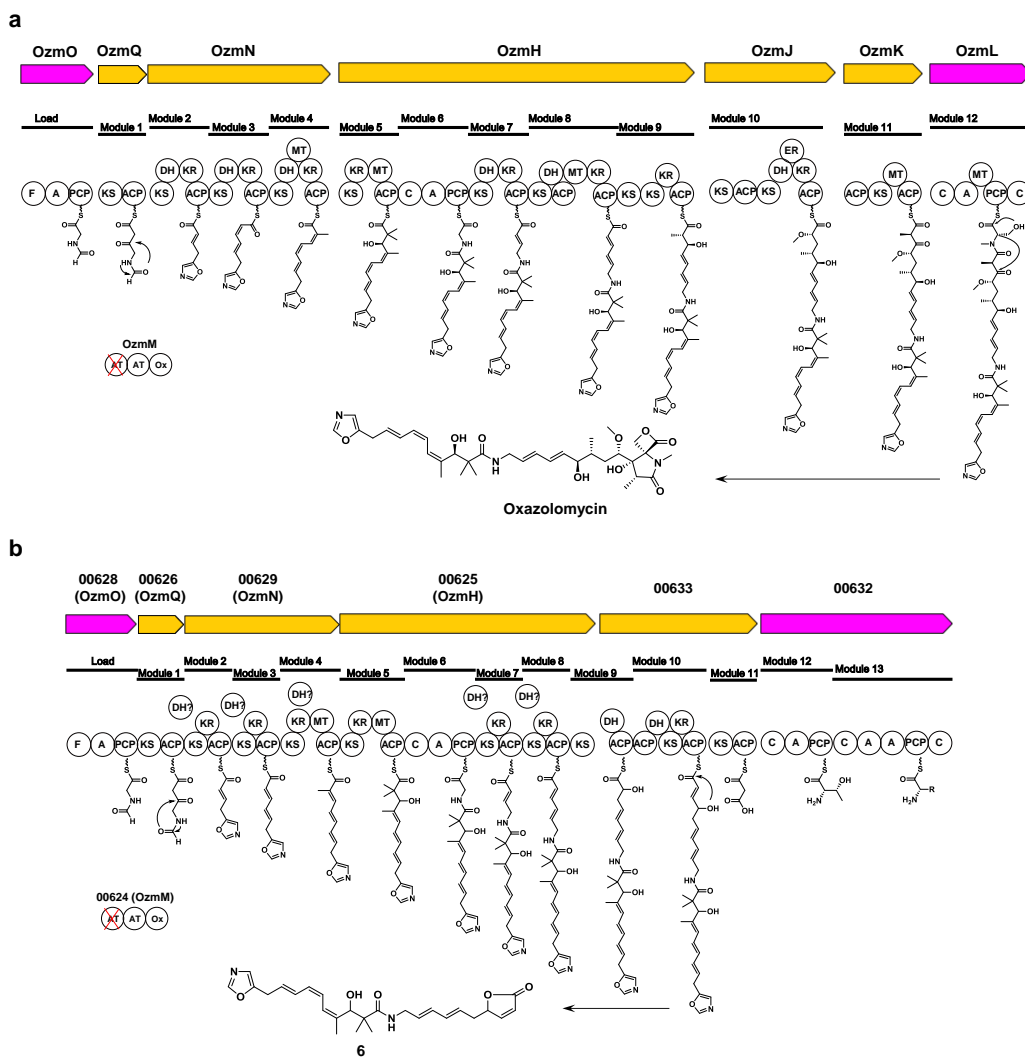


図 4-3 Oxazolomycin と 6 の推定生合成経路の比較¹²⁹

NRPS を紫、PKS を黄色で示した。また F は formate transferase を表す。a. Oxazolomycin 生合成経路。最終モジュール上の NRPS から切り出されて oxazolomycin が生合成される。trans-AT である OzmM がマロニル CoA のローディングを担っている。b. 6 の推定生合成経路。モジュール 10 上で分子内ラクトン形成反応によって切り出されて、6 が形成すると考えられる。Oxazolomycin 生合成遺伝子クラスターのモジュール 1、2、3、4、7、8 に存在する DH ドメインは 6 の生合成遺伝子クラスターには存在しなかった。一方で 6 においても脱水反応によって形成すると考えられる二重結合が存在することから、discrete な DH ドメインが存在し 6 の生合成に関与することを考え DH? で表した。モジュール 11、モジュール 12、モジュール 13 は 6 の生合成には関与していないと考えた。伸長反応が進行していないモジュール 11 の ACP には trans-AT によってマロニル CoA、モジュール 12 の PCP には A ドメインに依って Thr がロードされることが予想された。一方モジュール 13 上の A ドメインの機能は推定できなかったため、アミノ酸の側鎖を R で示した。

第5章 Bafilomycin の側鎖生合成に関わる酵素 BfmI と BfmJ の
機能解析

第5章 Bafilomycin の側鎖生合成に関わる酵素 BfmI と BfmJ の機能解析

本章では bafilomycin の PKS による基本骨格形成後の修飾反応である BFM A のフマル化反応により BFM C を形成する酵素 BfmIJ の機能解析について述べる。序論で述べたように、フマル化反応によって BFM の活性は BFMA のフマル酸エステル化によって上昇することが知られている。本研究室において前任者の沼田淳による BFM 側鎖生合成に関与する 5 つの遺伝子 *bfmIJKLM* の破壊実験と組換え酵素による *in vitro* 試験によって、BFM A から BFM C への変換には BfmIJ が関与することが示されていたが、各酵素の機能単独については明らかにされていなかった。そこで本章では BfmI と BfmJ の組換え酵素を用いて *in vitro* で反応を行い、生産物の解析を行うことで各酵素の機能解析を行った。

第1節 BfmIJ による BFM A から BFM C への変換反応

BfmJ は AMP 結合サイトを持つ機能未知遺伝子、BfmI はアシル基転移酵素と相同性を持つため、BfmJ が fumaryl-CoA を生成し、BfmI がアシル基転移酵素として fumaryl-CoA を転移させる反応を行うと考えられた。そこでまず、BFM A から BFM C への BfmIJ による変換反応に CoA、ATP が必要かどうかを確かめるため、BfmIJ、フマル酸、CoA、ATP、BFM A を基質として BFM A から BFM C への変換反応を行った。

方法

BfmI と BfmJ の組換え酵素の精製を行った。pHIS8 の *EcoRI* サイトと *HindIII* サイトに *bfmI* 遺伝子および *bfmJ* 遺伝子のそれぞれをクローニングしたベクター pHIS8_ *bfmI* および pHIS8_ *bfmJ* を大腸菌 BL21(DE3) へと導入し、N 末端にヒスチジンタグが付加した組換えタンパク質を発現した。Ni²⁺-アフィニティークロマトグラフィーと透析により精製した (図 5-1)。精製の詳細は実験項に記した。得られた BfmIJ を用いて、BFM A、フマル酸、Mg²⁺、ATP、CoA を加えた反応系 (表 5-1) を 100 μ l ずつ作製して、30°C で 16 時間反応させた。反応液を酢酸エチルにて抽出した後溶媒を留去し、残渣を MeOH に溶かし、LC/MS にて表 5-2 の条件にて分析した。

結果

BfmIJ と ATP、フマル酸を加えた系によって BFM C への変換反応が検出できた。CoA を加えた系では変換反応の進行が ATP のみと比較して低下していた (図 5-2)。ATP を加えない場合には変換反応は進行しなかったことから、ATP は BfmIJ の反応に必要なが、CoA は必要ではないことが明らかとなった。

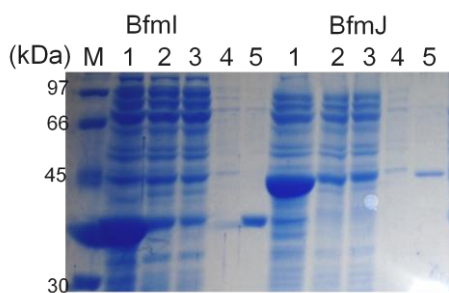


図 5-1 精製した各酵素の SDS-PAGE

M: Low Molecular Weight marker、それぞれの酵素について、1. 菌体破砕液、2. 菌体破砕上清、3. Ni^{2+} -アフィニティーカラムでのフロースルー、4. Wash 画分、5. 精製タンパク質

表 5-1 BfmI と BfmJ による BFMA から BFM C への反応系

	1. 基本反応系	2. +CoA	3. -ATP	4. 酵素非添加
HEPES-NaOH (pH 7.5)	100 mM	100 mM	100 mM	100 mM
glycerol	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)
MgCl_2	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
BFM A	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM	0.1 mM
Fumate	5mM	5 mM	5 mM	5 mM
ATP	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
CoA	-	5 mM	-	-
BfmI	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	-
BfmJ	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml	-

表 5-2 LC/MS 分析条件

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	isocratic elution of 80% MeOH + 0.1% formic acid
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40°C
ESI-MS(+)	Triple TOF™ 5600 (AB Sciex, Tokyo, Japan)

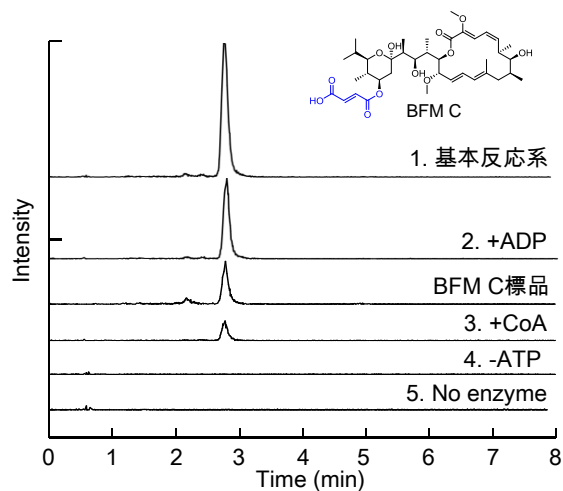


図 5-2 BfmIJ による BFMA から BFM C の形成反応

m/z : 743.4 におけるクロマトグラム。

第 2 節 BfmJ 単独反応の反応産物の検出

BfmIJ の 2 酵素反応の結果から、BfmIJ の反応には CoA が不要であることが明らかとなった。相同性検索の結果、BfmJ は AMP 結合モチーフを持つことから、フマル酸と ATP を基質として BfmJ により活性化されたアシル中間体が形成した後、BfmI によって転移されると予想した。フマル酸の活性化は ATP によるリン酸化、もしくは AMP 化が行われている可能性が高いと推測した。そこでまず、BfmJ における反応において fumaryl-AMP を経由することを考え、BfmJ による ATP 分解活性の検討と、BfmJ 単独の反応による反応産物の検出とその構造決定を目指した。

方法

前節で精製した BfmJ を用い、反応系 100 μ l を作製し、30°C、16 時間反応を行った。BfmJ による ATP の分解活性を見るために ATP、5 mM の系 (表 5-3) と、フマル酸の活性化反応の検出のためにフマル酸と ATP、フマル酸と ADP を加えた系を作製した (表 5-5)。対照として酵素を加えない系も作製した。100 μ l の MeOH を加えて酵素を変性させ、遠心分離によって夾雑物を除き、表 5-4 の条件で HPLC にて分析した。

結果

BfmJ は ATP を ADP へ変換する反応と、ADP を AMP へ変換する反応を行うことが示された (図 5-3)。フマル酸を加えた反応系では AMP 様の UV 吸収を持つ新規ピーク 7 が検出された。検討の結果、表 5-5 の反応系においてフマル酸ナトリウムの濃度を 20 mM にして反応を行うと BfmJ 反応の 7 の大幅な増大が検出された (図 5-4)。そこで大スケールにて反

応を行いピーク 7 について精製し、HRESI-MS (–)、NMR によりその構造を決定した。単離した 7 の HRESI-MS (–) による測定の結果、 m/z 462.0668 $[M-H]^-$ (calcd. mass for $C_{14}H_{16}N_5O_{11}P^-$: 462.0662) のピークが検出された。MS フラグメントパターン (図 5-5) から、リン酸、アデニン骨格、AMP 構造を持つことが推測できた。さらに NMR による解析結果 (表 5-6) も合わせて、7 が 3''-hydroxy-succinyl AMP であることが示された (図 5-6)。得られた 3''-hydroxy-succinyl-AMP (7) は fumaryl-AMP の二重結合に水が Michael 付加することで形成したと推定した (図 5-6)。この結果は BfmJ によって fumaryl-AMP が形成することを強く示唆した。

表 5-3 BfmJ による ATP、ADP、AMP の分解反応の反応系

	1. ATP	2. ADP	3. AMP
HEPES-NaOH (pH 7.5)	100 mM	100 mM	100 mM
glycerol	10% (v/v)	10% (v/v)	10% (v/v)
MgCl ₂	5 mM	5 mM	5 mM
ATP	5 mM	-	5 mM
ADP	-	5 mM	-
AMP	-	-	5 mM
BfmJ	1 mg/ml	1 mg/ml	1 mg/ml

表 5-4 LC の分析条件

Column	CAPCELL PAK C18 MG-II 4.6 mm x 250 mm (C18, Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	A: 5 mM Dibutyl ammonium acetate, B: MeOH B20% to 90% over 20 min, 90% to 20% over 1 min, B20% for 15 min
Flow rate	1.0 ml min ⁻¹
Detector	Photo Diode Array (JASCO MD-2010 Plus, JASCO, Tokyo, Japan)

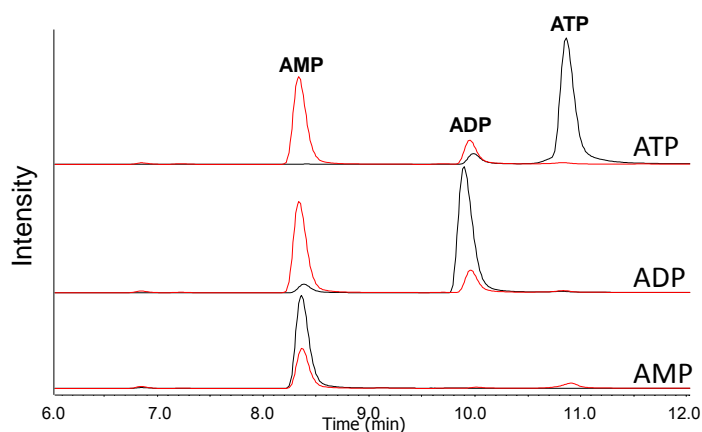


図 5-3 BfmJ による ATP と、ADP、AMP の分解反応

非酵素添加サンプルを黒のクロマトグラム、酵素添加サンプルを赤のクロマトグラムで示した。

表 5-5 BfmJ による反応系

	1. 基本反応系	2. +ADP
HEPES-NaOH (pH 7.5)	100 mM	100 mM
glycerol	10% (v/v)	10% (v/v)
MgCl ₂	5 mM	5 mM
フマル酸二ナトリウム塩	5mM	5 mM
ATP	5 mM	-
ADP	-	5 mM
BfmJ	1 mg/ml	1 mg/ml

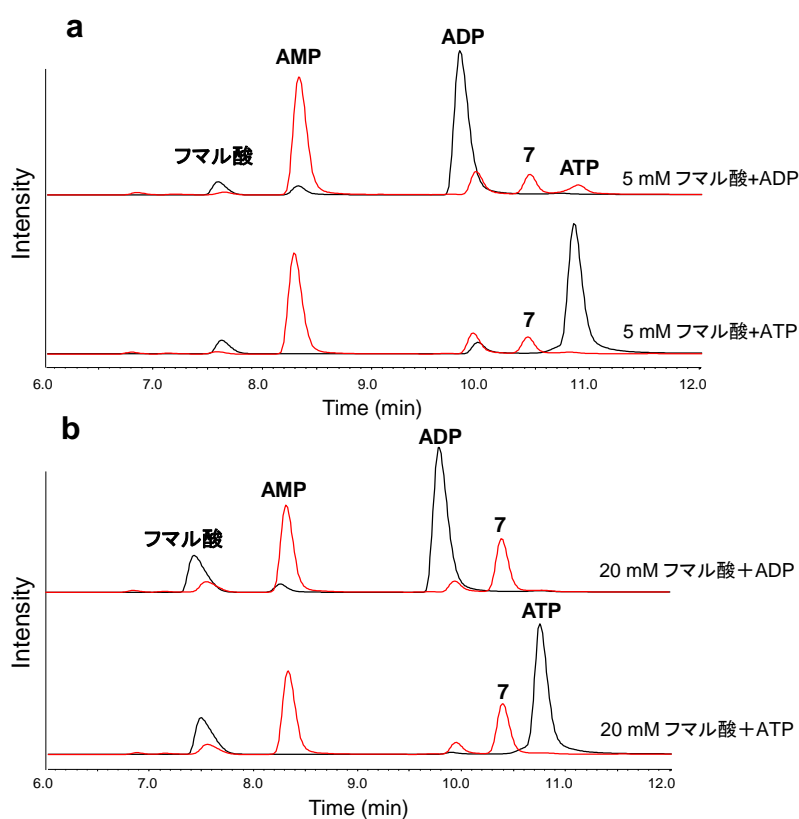


図 5-4 BfmJ による反応産物の検出

a. フマル酸 5 mM での反応の分析結果。b. フマル酸 20 mM での反応の分析結果。
非酵素添加サンプルを黒のクロマトグラム、酵素添加サンプルを赤のクロマトグラムで示した。

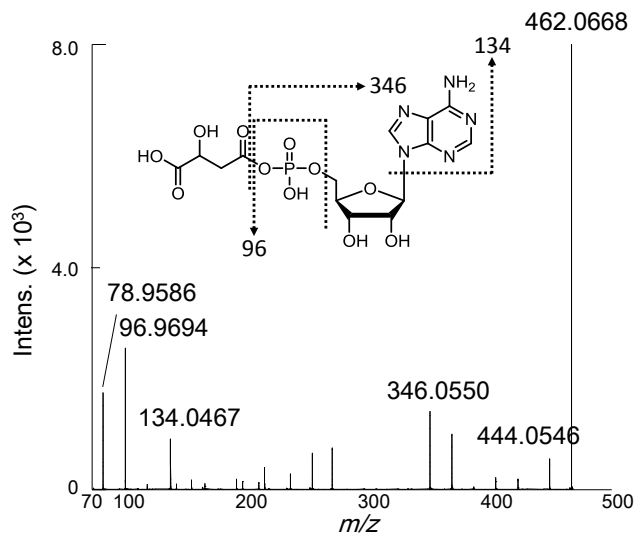


図 5-5 MS/MS による BfmJ 反応産物の解析

表 5-6 7 の NMR スペクトル

Position	δ_C	δ_H (H, mult. J in Hz)
1	154.2	
2	152.9	8.13 (1H, s)
3	148	
4	139.6	8.42 (1H, s)
5	119	
1'	86.8	6.0 (1H, d, 5.4)
2'	74.7	4.64 (1H, t, 5.4)
3'	70.7	4.36 (1H, t, 4.8)
4'	84.7	4.22 (1H, m)
5'	63.5	3.87 (2H, 2H, t, 4.8)
1''	179.2	
2''	40	2.74 (1H, dd, 4.2, 15.6) 2.59 (1H, dd, 9.6, 15.6)
3''	54.1	*4.6
4''	179.4	

^1H NMR (600 MHz), ^{13}C NMR (150 MHz), D_2O adjusted at pH 9.0 with NaHCO_3 .

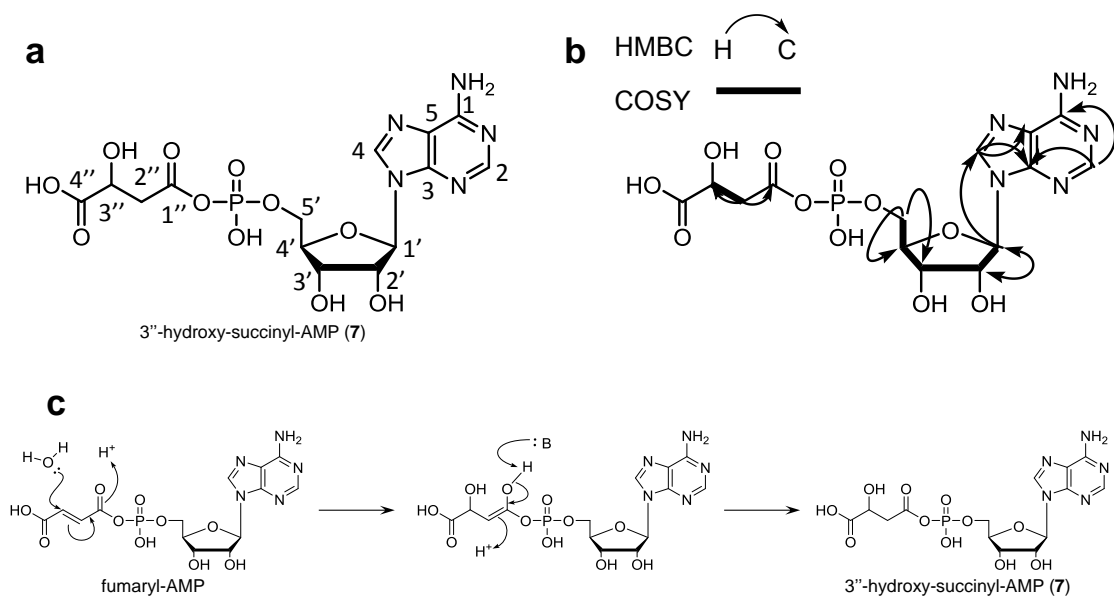


図 5-6 3''-hydroxy-succinyl-AMP の構造

a. 3''-hydroxy-succinyl-AMP の構造。 **b.** HMBC、DQF-COSY の解析結果。 **c.** 3''-hydroxy-succinyl-AMP の推定形成機構。リン酸エステルによって活性化された 2 重結合に水分子が Michael 付加して **7** が形成される。

第 3 節 3''-hydroxy-succinyl-AMP (7) と BfmI による BFMA へのアシル基転移反応の検討

方法

前節で単離した 3''-hydroxy-succinyl-AMP (7) について第 1 節で精製した BfmI を用いてアシル基の BFM A への転移反応が起こるかについて、表 5-7 の条件で 30°C にて 16 時間反応させた。反応液を酢酸エチル抽出し、抽出画分を MeOH に溶解し、表 5-2 の条件にて LC/MS にて解析した。

結果

6 を基質として用いた BfmI による BFM A への転移による BFM C の生成は検出できなかった (図 5-7)。以上の結果から、化合物 A は BfmI によって形成された fumaryl-AMP に反応溶液中の水分子が付加して生成したアーティファクトであると結論付けた (図 5-6)。

表 5-7 BfmI による反応系

	1. 反応系	2.-BfmI
HEPES-NaOH (pH 7.5)	100 mM	100 mM
MgCl ₂	1 mM	1 mM
6	1 mM	1 mM
BFM A ₁	0.1 mM	0.1 mM
BfmI	1 mg/ml	-

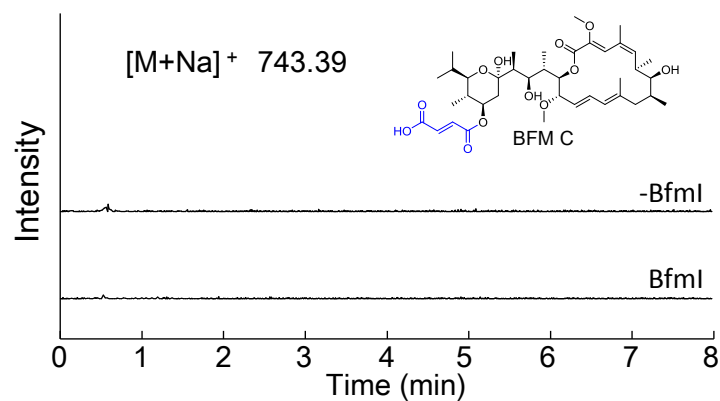


図 5-7 BfmI と化合物 A と BFMA による反応

BFM C のピークは検出されなかった。

第4節 共発現による BfmIJ 相互作用の解析

前節の結果から、BfmJ は水と反応性が高い fumaryl-AMP を中間体として生成していることが支持された。KM-6054 株において、*bfmI* 破壊株、*bfmJ* 破壊株ではともに BFM A が蓄積する。*bfmIJ* は染色体上に並んで存在し *bfmJ* の開始コドンは *bfmI* の終始コドンより上流に存在することから、タンパク質の翻訳の際、リボソームは *bfmI* の終止コドンによる mRNA からの解離が行われず、そのまま *bfmJ* の翻訳が続けられることで、両者がタンデムに翻訳されることが考えられる (図 5-8)。さらに BfmI の基質と考えられる fumaryl-AMP は水と反応しやすいことから、BfmI と BfmJ が複合体を形成し、不安定な中間体である fumaryl-AMP が酵素間を受け渡されることを想像した。もし BfmI と BfmJ がヘテロ複合体を形成するならば、BfmI と BfmJ は相互作用をすると考えた。そこで、共発現ベクター pETDuet1 を用いて共精製、およびゲル濾過クロマトグラフィーによる相互作用の検出を試みた。

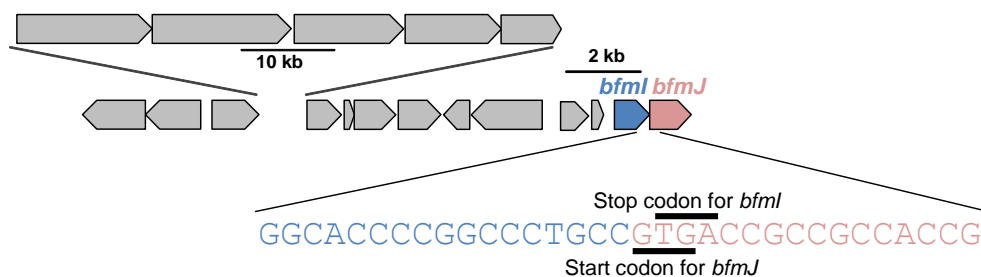


図 5-8 BFM 生合成遺伝子クラスター内の *BfmI* と *BfmJ* の位置と両者の終始コドンと開始コドンの周辺の配列

方法

プラスミド内に 2 つのマルチクローニングサイト (MCS) を持つ pETDuet1 に両遺伝子をクローニングすることで大腸菌内で共発現することを考えた。表 5-8 のようにプライマーを設計し、pHIS8-*bfmI*、pHIS8-*bfmJ* を鋳型に PCR にて目的配列を増幅した。増幅断片をゲルから切り出し、pT7Blue vector にサブクローニングした。取得したプラスミドのうち、まず *Bam*HI と *Eco*RI サイトを付加した *bfmI*、および *bfmJ* 配列を完全消化し、それぞれを pETDuet1 ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) 1 の *Bam*HI サイトと *Eco*RI サイト間にクローニングし、pET-Duet1-*bfmI* および pET-Duet1-*bfmJ* を取得した。得られたプラスミドに対し pET-Duet1-*bfmI* の MCS2 の *Nde*I サイトと *Bgl*III サイトに *bfmJ* を、pET-Duet1-*bfmJ* の MCS2 に *bfmI* をクローニングすることで *BfmI* の N 末端に His タグ配列を付加した His-*BfmI* と *BfmJ* の共発現プラスミド、pETDuet1-*bfmIJ* 及び、*BfmJ* の N 末端に His タグを付加した His-*BfmJ* と *BfmI* の共発現プラスミド、pETDuet1-*bfmJI* を作製した (図 5-9)。

各ベクターを大腸菌 BL21(DE3) へ導入してタンパク質を Ni²⁺-アフィニティーカラムを

用いて精製し、各精製画分のサンプルに対して SDS-PAGE を行い BfmI と BfmJ が相互作用によって共精製されるかどうかについて調べた。また、pETDuet1_bfmIJ から共精製されたサンプルについてはゲル濾過クロマトグラフィーを行い、ゲル濾過クロマトグラフィーでも相互作用するかについて検討するとともに、各々の溶液中での分子量と多量体形成について調べた(図 5-9)。精製条件の詳細は実験項に記した。

表 5-8 プライマー配列

pETDuet1_bfmIJ	
bfmI_MCS1_F:	5'-GGG <u>GGATCC</u> GAGTCTGGGGTACCTGTTCGG-3' (<i>Bam</i> HI)
bfmI_MCS1_R:	5'-GGG <u>GAATTC</u> GTCTCACGGCAGGGCCGGGGTGC-3' (<i>Eco</i> RI)
bfmJ_MCS2_F:	5'-GGG <u>CATATG</u> ACCGCCGCCACCGGCACCACC-3' (<i>Nde</i> I)
bfmJ_MCS2_R:	5'-GGG <u>AGATCT</u> GTCAGTAGAGGCCCTCGGGGG-3' (<i>Bgl</i> II)
pETDuet1_bfmJI	
bfmJ_MCS1_F:	5'-GGG <u>GGATCC</u> GACCGCCGCCACCGGCACCAC-3' (<i>Bam</i> HI)
bfmJ_MCS1_R:	5'-GGG <u>GAATTC</u> GTCTCAGTAGAGGCCCTCGGGGG-3' (<i>Eco</i> RI)
bfmI_MCS2_F:	5'-GGG <u>CATATG</u> ACCGCCGCCACCGGCACCACC-3' (<i>Nde</i> I)
bfmI_MCS2_R:	5'-GGG <u>AGATCT</u> GTCAGTAGAGGCCCTCGGGGG-3' (<i>Bgl</i> II)

下線で制限酵素サイトを示した

結果

BfmI の N 末端に His タグを付加し、BfmJ にはタグを付加していない pET-Duet1_bfmIJ による共発現後の精製によって、BfmJ が BfmI とともに共精製された (図 5-9)。このことから、確かに BfmI と BfmJ は相互作用していることが示された。一方、BfmJ の N 末端に His タグを付加し、BfmI にはタグを付加していない pET-Duet1_bfmJI による共発現後の精製では、BfmI と BfmJ とは共精製されなかった (図 5-9)。

His タグ付き BfmI と BfmJ が相互作用することから、BfmJ の N 末端側に付加している His タグが 2 つのタンパク質間相互作用に対して阻害的に働いていることが予想できる (図 5-9)。このことから、BfmI と BfmJ の相互作用には BfmJ の N 末端側が関与していることが示唆された。

ゲル濾過では BfmI と BfmJ は別々の画分へ溶出した (図 5-9) ことから、ゲル濾過クロマトグラフィーでは BfmIJ 会合状態を解析することはできなかった。ゲル濾過ではタンパク質濃度が希釈されてしまうため、相互作用が検出できない可能性が考えられる。ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定の結果から BfmI と BfmJ の分子量はそれぞれ、BfmI が約 47,800、BfmJ が約 87,160 であった (図 5-9)。BfmI のアミノ酸配列からの分子量は 34 kDa、BfmJ は 40 kDa であるので、溶液中で BfmI は単量体、BfmJ は 2 量体で存在していることが

推定された。

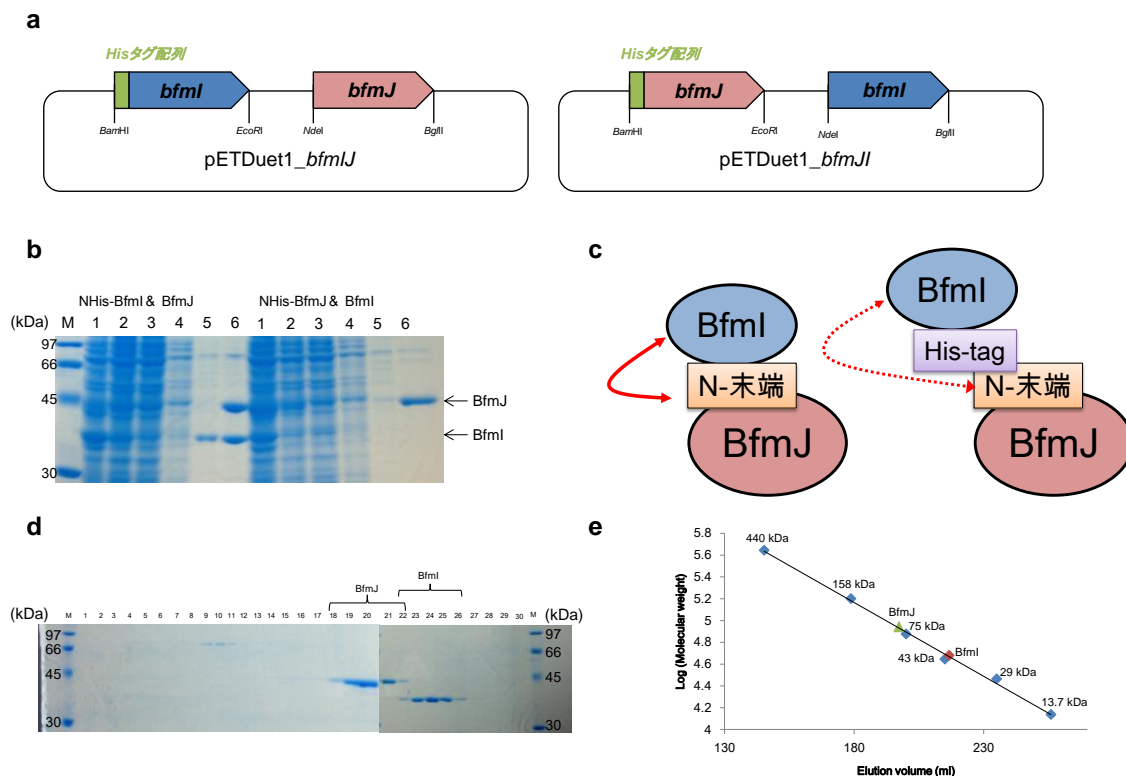


図 5-9 Ni^{2+} -アフィニティー精製とゲル濾過クロマトグラフィーによる *BfmI* と *BfmJ* の相互作用の解析

a. *BfmI* と *BfmJ* との共発現に用いたコンストラクトの図。 **b.** Ni^{2+} -アフィニティーカラムによる共精製の結果。 NHis-*BfmI* と *BfmJ*、 NHis-*BfmJ* と *BfmI*、 各サンプルにつき M: Low Molecular Weight marker、 それぞれの酵素について、 1. 菌体破碎液、 2. 菌体破碎上清、 3. Ni^{2+} -NTA カラム精製でのフロースルー、 4. Wash 画分 1、 5. Wash 画分 2、 6. Elution 画分。 *BfmI* の N 末端にタグを付加した共発現系では、 *BfmI* と *BfmJ* との相互作用により共精製された。 一方 *BfmJ* の N 末端にタグを付加した共発現系では、 両者は共精製されなかった。 **c.** *BfmI* と *BfmJ* の相互作用の模式図。 *BfmI* の N 末端に His タグを付加した NHis-*BfmI* は *BfmJ* と相互作用し、共精製される一方で *BfmJ* の N 末端に His タグを付加した NHis-*BfmJ* は共精製されないことから両者の相互作用は *BfmJ* の N 末端の関与が示唆された。 **d.** ゲル濾過クロマトグラフィーの結果。 M: Low Molecular Weight marker、 数字は各フラクション。 *BfmI* と *BfmJ* とは異なる画分に溶出されたことから相互作用は検出されなかった。 **e.** 分子量測定の結果。

考察

本章では BFM 側鎖生合成における BfmIJ による BFM A から BFM C への変換反応における各酵素の機能解析を行った。ポリケタイドへのフマル酸の付加反応はこれまでに報告がされていない。第 1 節から第 3 節までで、BfmIJ を用いた *in vitro* での実験から、BfmIJ が CoA ではなく、ATP または ADP を用いてフマル酸を活性化することを示した。また、BfmJ 反応産物の構造決定から **7** を得た。**7** は BfmJ によって形成された fumaryl-AMP に水分子が付加することで得られたシャント化合物と考えられた。**7** が BfmI の基質として受け入れられなかったことも **7** がシャント化合物であることを支持した。Fumaryl-AMP が得られなかったことから、BfmI 単独による転移反応の活性を示すことはできなかったが、今回行った実験結果から、BfmI が fumaryl-AMP を BFM C へ転移することが強く支持された。

第 4 節では BfmI と BfmJ の相互作用を検出するため、pET-Duet 1 ベクターを用いた共精製と、ゲル濾過クロマトグラフィーによる相互作用の検出を行った。Ni²⁺-アフィニティーによる共精製の結果から、BfmI と BfmJ とが確かに相互作用していることが示された。一方で、BfmJ の N 末端にタグをつけた場合では BfmI と J の相互作用が観測できなかったことから、BfmI と J の相互作用には BfmJ の N 末端側が関与していることが示唆された。ゲル濾過クロマトグラフィーの結果では、BfmI と BfmJ との相互作用は検出されなかった。Ni²⁺-アフィニティーによる精製と比較して、ゲル濾過ではタンパク質濃度が希釈されてしまうために、相互作用が検出できなかったものと考えている。

両者が相互作用していることと、中間体と考えられる fumaryl-AMP と水との反応性が高いことから fumaryl-AMP は BfmI と BfmJ との間で受け渡されていることが考えられる。BFM 生合成遺伝子クラスターに BfmIJ が並んで存在しており、*bfmJ* の開始コドンが *bfmI* の終止コドンよりも上流に存在することから、生体内ではこれら 2 酵素はタンデムに翻訳され、相互作用してヘテロ複合体として機能し、中間体と考えられる fumaryl-AMP が両者の間で受け渡されている可能性が考えられる。BfmI と J 相互作用への BfmJ の N 末端側の関与もタンデムな翻訳を介した相互作用の存在を示唆していると解釈できる。2 つの酵素間で不安定な反応中間体が受け渡される機構として、2 酵素の間の 2 つの活性中心ポケットの間を中間体を通る経路が存在する substrate channeling の例が知られており、tryptophan synthase¹³² や carbamoyl phosphate synthetase¹³³ などでは活性中心同士をつなぐ穴が酵素間に存在することが報告されている。また、活性中心の間をつなぐ穴が存在しない場合でも、代謝経路の連続反応を触媒する酵素間が相互作用し、活性中心が近くに存在することで反応が効率的に進行するという主張も存在する¹³⁴。一般に substrate channeling が利用される反応の例では、反応中間体の反応性が高いことが知られている¹³⁵。今回、BfmJ を用いた単独反応によって本来形成されると考えられる fumaryl-AMP は LC/MS による分析でも検出できなかった。一方で、フマル酸濃度を高くしたところ **7** が検出された。可能性として、不安定な中間体である fumaryl-AMP は BfmJ の活性中心に強く結合しており、水付加によって初めて BfmJ の活性中心から放出されるような機構によって形成していることが考えられる。

代謝経路において acyl-AMP が利用される例は、CoA 体形成の過程や、NRPS やアミド合成酵素によるペプチド形成過程で行われることが知られている¹³⁶。

BFM A から BFM C への変換反応の基質となるフマル酸は TCA サイクルを構成する一次代謝産物であり、フマラーゼの基質となる。これまでにフマル酸を基質に fumaryl-AMP¹³² を経由して生合成される二次代謝産物として *Pantoea agglomerans* が生産する dapdiamide が知られているがそのほかにフマル酸が二次代謝に利用される例は報告されていない (図 5-10)¹³⁷。

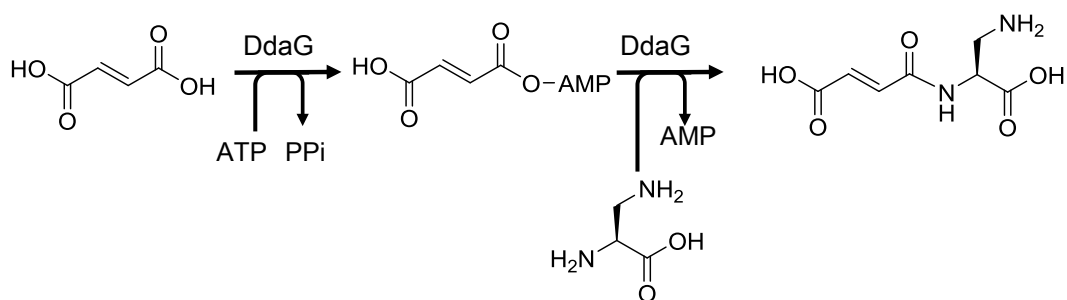


図 5-10 Dapdiamide 生合成における DdaG が触媒する反応

総括

ポリケタイドは植物を始め、細菌、真菌、海洋生物等を単離源として天然に多数存在する化合物群である。その構造多様性は PKS によるポリケタイド伸長反応に用いられる基質の構造多様性、伸長回数の多様性、PKS からポリケトメチレン鎖が切り出される際の環化の多様性、さらに PKS による生合成の後の糖付加や、酸化還元、環化反応、アシル化といった修飾反応の多様性によってさまざまな構造をもつ化合物が生合成される。^{21, 22} 部分構造が類似した化合物は互いに相同性を持つ保存された生合成遺伝子カセットを持つ。¹³

本論文の第 1 章から第 3 章までは VST の生合成機構について研究を行った。第 4 章では第 1 章で取得した 4083-SVS6 株のドラフトゲノムシーケンスと BAC ライブラリを利用し、87.7 kb にわたる機能未知な生合成遺伝子クラスターの異種発現により、新規なポリケタイド化合物の取得に成功した。第 5 章では BFM の修飾反応を担う酵素 BfmI と BfmJ について研究を行い、これら中分子ポリケタイドの生物活性の付与に関与する修飾機構について解明した。

第 1 章では 4083-SVS6 株のドラフトゲノムシーケンスデータから VST 生合成遺伝子クラスター領域を見出した。次に BAC を利用して 4083-SVS6 株の DNA ライブラリを作製することで VST 生合成遺伝子クラスターの全長を含む BAC クローン pKU503DverP10N24 を取得した。取得した pKU503DverP10N24 を染色体組込サイトである *attB* を利用して *S. albus* J1074 染色体へ導入し、VST の異種生産に成功した。今回培養を行った条件では、異種発現によって、野生株の 14 倍の生産量を得ることができた。生産量の向上によって後の生合成遺伝子破壊株での解析が容易になった。BAC を利用したポリケタイドや NRPS の生合成遺伝子クラスターの異種発現の報告がいくつかなされている。また、異種生産のための染色体を欠損させた異種発現用の放線菌宿主の開発も行われており、機能未知生合成遺伝子クラスターを含めた遺伝子クラスターの異種発現による新規化合物の同定や生合成経路の解明は今後さらに盛んになることが期待できる。

第 2 章では糖転移酵素である *vstH* と *vstI* について遺伝子破壊株を用いて中間体の解析を行い、それぞれの基質となる TDP-糖を推定した。そこで 2 つの糖転移酵素 *vstH*、*vstI* の遺伝子破壊を行うことでそれぞれの機能を明らかにした。

遺伝子破壊の結果 $\Delta vstI$ 株では VST aglycone のみが蓄積した。 $\Delta vstH$ 株からは VST aglycone に D-digitoxose が付加した新規 VST 類縁体 VST G と 37-deoxy-VST aglycone (**3**) に D-digitoxose が付加した VST H が蓄積した。また、各破壊株を共培養すると、VST の生産が回復し、生合成中間体と考えられる *O*-demethyl-VST D と VST D と思われるピークが LC/MS 解析により、確認できた。これらのことから VST の側鎖生合成は、まず *VstI* による VST aglycone への D-digitoxose の転移反応により VST G が形成し、次いで *VstH* による VST G への L-olivose への転移反応により、*O*-demethyl-VST D が形成した後、*VstB6* によるメチル基転移反応が起こり、VST D へと変換され、最後に再度 *VstI* によって VST D へ D-digitoxose が転移されて VST が形成する生合成経路が強く示唆された。生合成過程において糖転移酵素が 2 回はたらく例として lobophorin 生合成の LobGT3⁶⁶、landomycin 生合成における LanGT1 と LanGT4

が報告されている。¹¹⁷ 今後は $\Delta vstH$ 株への VST G の添加による VST D の生産、および VST D の $\Delta vstI$ 株への添加による VST の生産を確かめることで、提唱した経路で VST が生合成されることが確かめられると考えられる。糖転移酵素は基質特異性が寛容な例も多く知られている¹³⁸。多様な構造のデオキシ糖を持つ TDP-糖を基質に用いて生物変換や酵素的な合成を行うことで、より生物活性の高い VST 類縁体の生産につながる可能性がある。

第3章ではスピロテロン酸形成を担う分子内 [4+2] 環化付加反応を担う酵素 VstJ について遺伝子破壊実験と組換え酵素による試験から機能を明らかにし、生合成中間体 **2** の立体選択的な分子内 [4+2] 環化付加反応による **3** への変換に VstJ が必須であることが証明された。既知の分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素は、反応性の高い化合物を基質として用いるため、[4+2] 環化付加反応を触媒する酵素がない条件でも分子内 [4+2] 環化付加反応が起こり、生成物が生じることが知られている^{73, 75}。しかし、VstJ の場合には、酵素非添加条件での反応は進行しないことが酵素動力学から示された。

既知の [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素のうち、酸化などの他の反応の触媒能を持たず、[4+2] 環化付加反応のみの触媒能を持つ酵素としては SpnF のみが知られていた⁸²。VstJ は [4+2] 環化付加反応のみを触媒する酵素として2例目として報告できた。

VstJ の報告の後、VST などのスピロテロン酸と類似の構造を持つ、スピロテトラム酸化合物 pyrroindomycin の生合成において、VstJ ホモログである PyrI4 について機能解析が行われ、VstJ と同様に末端オレフィンと、共役二重結合を持つフレキシブルな基質の [4+2] 環化付加反応を触媒し、スピロテトラム酸構造を形成することが示された (図 I)。さらに、VstJ ホモログである ChlL が PyrI4 の基質と反応することも示され、これによって VstJ ホモログによる [4+2] 環化付加反応によるスピロテロン酸/スピロテトラム酸形成機構がこれら化合物に共通の生合成機構であることが示されつつある¹²¹。

加えて pyrroindomycin の生合成における *trans*-decalin 環形成に関与する遺伝子 PyrE3 についても、機能解析が行われた¹²¹。この PyrE3 も酵素非添加条件では進行しない分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する新規酵素であることが示された (図 I)。PyrE3 はこれまでに挙げた分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素とは相同性を持たない。VST 生合成遺伝子クラスターにおいて、PyrE3 ホモログである VstK が存在することから、VstK も PyrE3 と同様の機構で *trans*-decalin 構造の形成を担っていることが示唆された。以上の結果から VST の PKS から切り出された後の生合成機構を図 I に示した。

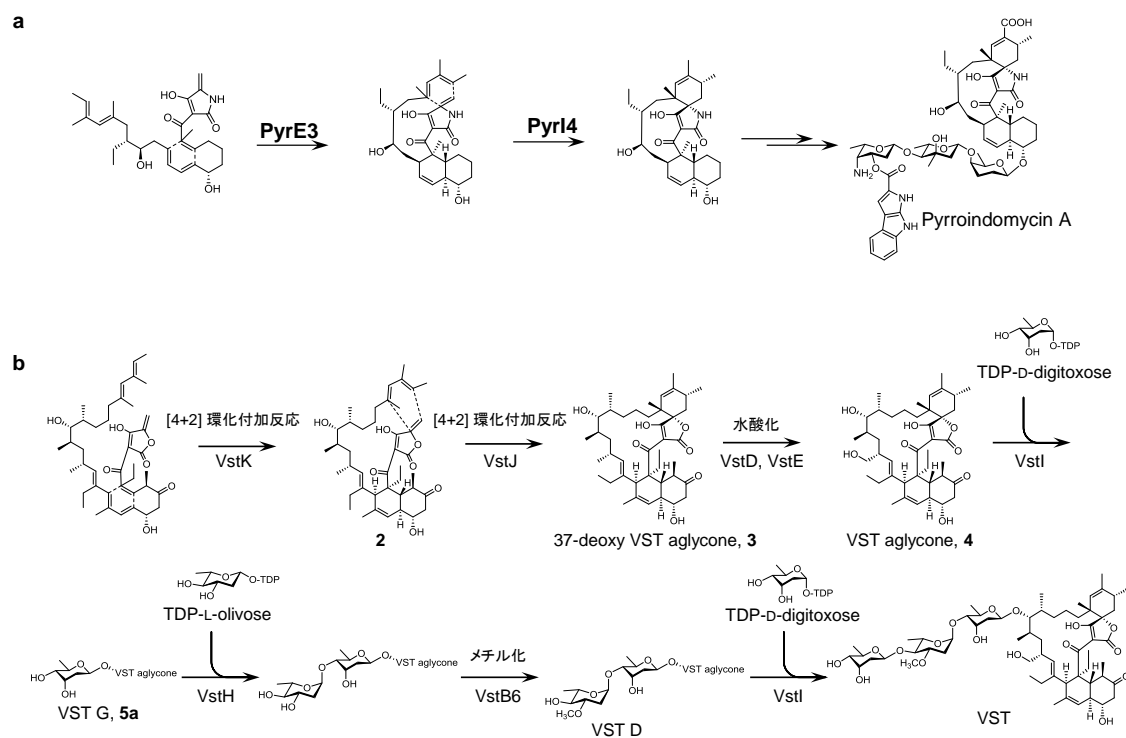


図 I Pyrroindomycin の生合成における 2 回の [4+2] 環化付加反応と
本研究から推定される VST の生合成経路

a. Pyrroindomycin の生合成における PyrE3 と PyrI4 による [4+2] 環化付加反応。PyrE3 による [4+2] 環化付加反応によって *trans*-decalin 環が形成した後、PyrI4 による [4+2] 環化付加反応によってスピロテトラム酸構造が形成し、pyrroindomycin が生合成される。**b.** VST の生合成経路。PyrE3 と相同性を持つ VstK による [4+2] 環化付加反応の後、VstJ による [4+2] 環化付加反応によってスピロテロン酸構造が形成される。その後水酸化によって 37 位に水酸基が導入され、VST aglycone が形成した後、VstI による D-digitoxose の転移、VstH による L-olivose の転移の後、VstB6 によってメチル基が導入され、再度 VstI によって D-digitoxose が転移されることで VST へと導かれる。

VstJ を発表した後、[4+2] 環化付加反応を触媒する酵素として PyrI4、PyrE3 に加えて、thiocillin 生合成の TcIM についても生化学的な解析が行われた (図 II)。¹³⁹TcIM ホモログは以前から thiostrepton、lactazole などの環状チオペプチド生合成遺伝子クラスターに保存されていることが見出されていた¹⁴⁰が、生化学的な機能解析はこれまで行われていなかった。TcIM ホモログもこれまでに挙げた[4+2] 環化付加反応を触媒する酵素とは相同性を示さない。生合成過程において前駆体ペプチドの 2 つの dehydroalanine 残基間の分子内 hetero Diels-Alder 反応と脱水反応を触媒し、大環状構造を形成する (図 II)。TcIM による大環状化反応でも、自発的な環化反応は見られず、反応は完全に酵素依存的に進行することが示された¹³⁹。

さらにケタマカビ *Chaetomium globosum* が生産する *trans*-decalin 環を持つ化合物、sch 210972 の生合成において、*trans*-decalin 環形成のための[4+2] 環化付加反応に関与する *cghA* が遺伝学的な解析から見出された (図 II)。¹⁴¹Watanabe らは M06-2X/6-31+G(d,p) による密度半関数を用いた反応遷移状態のエネルギー計算から、酵素が共役ジエンと求ジエン体との配向性を制御することで 30°C において反応の進行を 1000 倍高めることが可能と述べている¹⁴¹。*cghA* 遺伝子は既知の *trans*-decalin 環形成を担う [4+2] 環化付加反応を触媒する酵素とは相同性を示さなかった。しかし、配列情報を利用したタンパク質の立体構造予測から β バレル構造を取る lipocalin ファミリーに類似した構造を持つことが推定された¹⁴¹。

VstJ の基質となる **2** は末端オレフィンと 16 結合も離れた共役ジエンとの間の分子内 [4+2] 環化付加反応を触媒する。分子動力学シミュレーションから、VstJ の基質となる **2** は非常にフレキシブルな分子であることが示唆された。今後 VstJ やそのホモログについて、X 線結晶構造解析を行うことで、VstJ の立体構造の解明が期待できる。また、Diels-Alder 反応において反応生成物は反応遷移状態のアナログ構造となるため、生成物との共結晶が取得できれば、VstJ による触媒機構を明らかにできるだろう。本研究ではフレキシブルな基質の [4+2] 環化付加反応を触媒する分子基盤について他の研究に先駆けて明らかにすることができた。

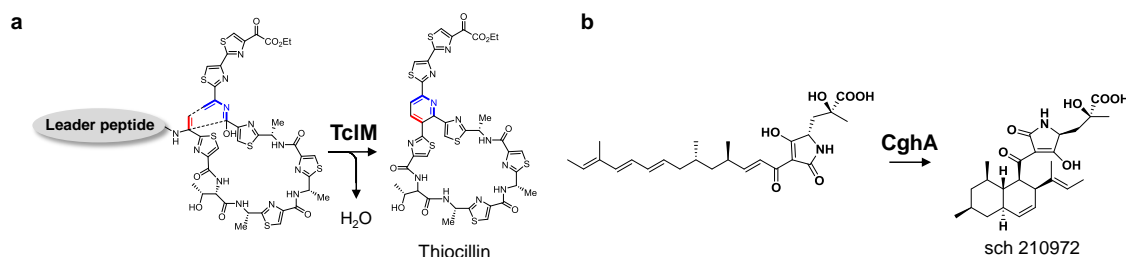


図 II a. thiocillin 生合成において TcIM が触媒する反応

b. sch 210972 の生合成において CghA が触媒すると予想される反応

第4章ではVSTのドラフトゲノムシーケンスに見出された87.7 kb にわたる *trans*-AT type のI型PKS とNRPS とのハイブリッド型生合成遺伝子クラスターの *S. lividans* TK23 を宿主とした異種発現により、新規ポリケタイド化合物 **6** の取得に成功した。BAC を用いることで100 kb 近い生合成遺伝子クラスターについても容易にその全長を取得することが可能となった。pKU503DJL68_PN1_P10-C12 は160 kb ものインサート長を含んでいた。ヒトやマウスのBACライブラリではインサート長さが300 kb のものが作製されており、技術的には300 kb の生合成遺伝子クラスターが取得可能となっている。³⁶

生合成遺伝子クラスターを保持していた4083-SVS6株、および *S. albus* J1074 を宿主とした場合では **6** の生産が見られなかった。さらに、**6** の生産は試験管で培養した場合でのみ検出された。このことはBACなどを用いて機能未知遺伝子クラスターを異種発現させることで新規化合物の取得が可能となることを示唆している。一方で、宿主や培養条件の検討といった古典的な検討が化合物生産条件を見出すために必要なことも示された。経路特異的な転写因子や、オペロン上流に誘導可能なプロモーターを導入することで、より効率的に化合物の取得が可能となることを期待している。クラスター上流にプロモーターを導入した異種発現により *ikarugamycin* 類縁体が取得された例が知られている。¹⁴²

6 の構造決定から **6** は *oxazolomycin* の類縁体であることが示された。他に類似の構造を持つ化合物として *Streptomyces* sp. KO-7888 から単離された *phthoxazolin* が知られている¹⁴³。*Phthoxazolin* についてはその生合成遺伝子クラスターは取得されていないが、**6** や *oxazolomycin* と同様の *trans*-AT type I型PKS によって生合成されることが推測できる。**6** の生合成遺伝子クラスターの遺伝子には *oxazolomycin* 生合成遺伝子クラスターの遺伝子と相同性を持つものが多く含まれた。しかし *trans*-AT type I型PKS のドメイン構成において、**6** のPKS では、*oxazolomycin* 生合成のPKS と異なり、DHドメインを持たないモジュールの存在が示され、discreteなDHドメインが機能することが示唆された。遺伝子の間に相同性があることから、進化的な関連が示唆される一方で、類縁化合物においてもその生合成機構は同一でないことが示された。**6** の分子構造から、その生合成機構において、PKSのモジュール10から切り出されて生合成されると考えられた。

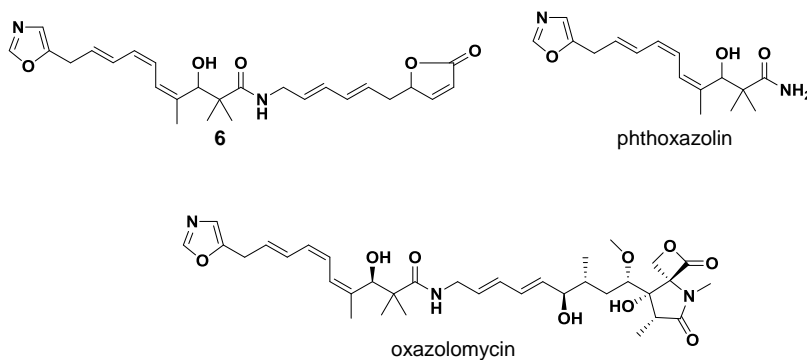


図 III **6** と類似した構造を持つ化合物

6 の構造と *phthoxazolin*、*oxazolomycin* の構造を示した。

第5章では BfmI と BfmJ の機能解析を行い、BFMA から BFMC へのエステル化反応について詳細に解析した。BfmJ 単独反応によって、fumaryl-AMP に水分子が付加して形成されると考えられる 3''-hydroxy-succinyl-AMP が単離された。このことから BfmJ によって形成される fumaryl-AMP が BfmI によるアシル基転移反応の基質として用いられ BFMA への fumaryl 基の転移反応によって BFMC へと変換されることが強く示唆された。さらに、BfmI と BfmJ とが相互作用していることをプルダウンアッセイによって示した。両者が相互作用することで水と反応しやすい fumaryl-AMP を受け渡し、反応を効率的に行っていることが示唆された。

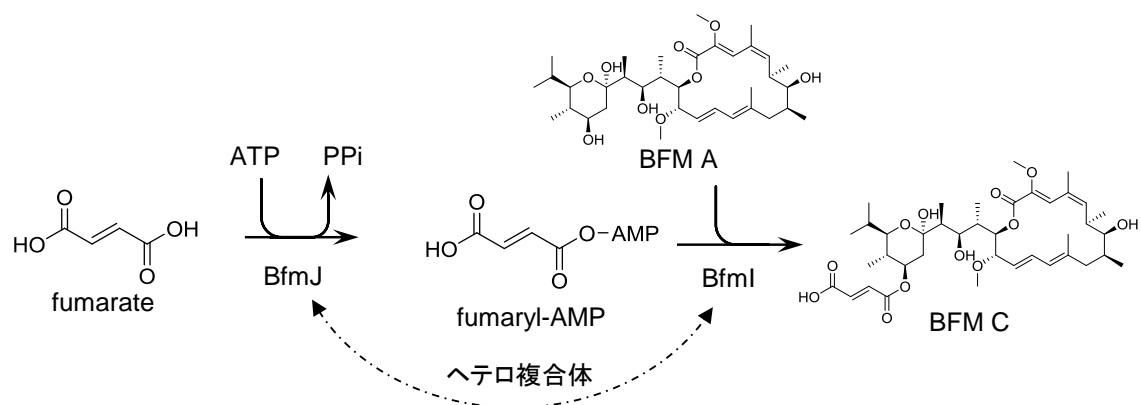


図 VI BfmI と BfmJ による BFMA へのフマル基転移反応の機構

以上 5 章からなる研究において、BAC を用いた異種発現を利用しながら、修飾反応を行う遺伝子と酵素の機能解析と、中分子ポリケタイドの生合成について研究を行った。

微生物のゲノム情報の取得が容易になったことで、生合成遺伝子クラスターからの化合物の予測、さらに機能未知遺伝子についてもその機能を推測することが以前と比べて遥かに容易になりつつある。今後も新たな機能を持つ生合成遺伝子の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターから同定されるだろう。

放線菌には多くの未利用生合成遺伝子クラスターが存在する。BAC を用いた DNA ライブラリにより、コスミドを用いた DNA ライブラリでは取得困難であった I 型ポリケタイド化合物によって生合成される中分子化合物の生合成遺伝子クラスターについても取得が容易になりつつある。本研究では、実際に、100 kb 近い遺伝子クラスターを BAC にクローニングすることで異種発現が可能である実例を示すことができた。プロモーターを利用してこれらのうち機能未知な未利用生合成遺伝子クラスターを異種宿主で強制的に遺伝子発現させることで、新規な中分子ポリケタイド化合物の網羅的な取得が期待できるだろう。今後研究が進展し、異種発現による化合物の大量供給が可能となれば、微生物をスクリーニング源とした活性物質の取得、特に生産量が少ないために、強い活性を示すにもかかわらず、これまでに利用されてこなかった天然化合物の利用が可能になるだろう。さらに今後 I 型 PKS の構造と機能に関する知見が蓄積し、 λ red recombinase などの遺伝子組換え技術を利用した I 型 PKS 遺伝子の配列を編集することでの機能を損なわないように PKS の機能の部分改変ができれば、中分子化合物の立体化学等の部分構造を部分的に改変したアナログライブラリへの展開が期待できる。遺伝子改変による化合物ライブラリの展開と、スクリーニングをフィードバック可能なサイクルとして利用できれば強力な活性を持つ中分子化合物を進化工学的に創出することが可能となるかもしれない。

実験項

BAC ライブラリーの構築

実験方法

1. ゲノム DNA 入りゲルブロックの作製

4083-SVS6 株を TSB 培地 + 0.5% glycine 10 ml で 2 日間、27°C、300 strokes/min にて培養した菌体を用いた。培養菌体を遠心（3000 rpm, 10 min）し、0.3 M sucrose で洗浄を 2 回行った。上清を除き残った菌体を STE 溶液 3 ml に懸濁し、50°C で保温した 1.2% GTG アガロース入り STE 溶液 3 ml と混合した。混合液を Disposable Plug Mold（170-3713, Bio-Rad）で固めて、ゲルブロックとした。ゲルブロックを 15 ml リゾチーム溶液（終濃度 1 mg/ml in TE Buffer）とともにシャーレに入れ、37°C で一晚処理した。処理したシャーレに 20 mg/ml proteinase K 溶液を 750 μ l 加え 50°C で 24 時間処理した。シャーレ内の溶液を除き、TE Buffer 15 ml と 100 mg/ml AEBSF 15 μ l を加え 30 分静置した。30 分後、TE Buffer を除き、再度 TE Buffer 15 ml と 100 mg/ml AEBSF 15 μ l を加え静置した。30 分後、再度 TE Buffer を除き TE Buffer 15 ml のみ加え静置した。30 分後、再度 TE Buffer を交換し、4°C で保存した

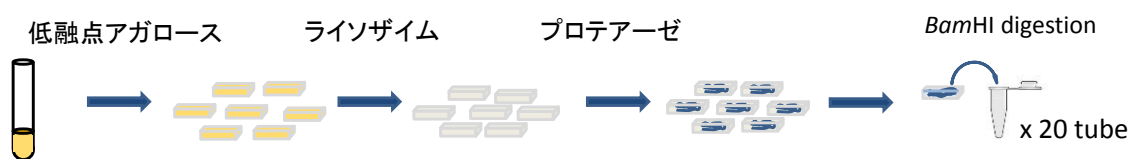


図 E-1 ゲルブロック作製の模式図

2. ゲノム DNA の切断と精製

*Bam*HI 溶液を 400 μ l に増やして 20 チューブを用意し、チューブ 1 本にゲル 1 個を入れ氷上で十分に冷やした反応溶液 400 μ l (*Bam*HI 3U) にゲル 1 個を入れ、氷上で 1 時間静置した後、*Bam*HI は 37°C、30 分反応を行った。0.5 M EDTA 40 μ l を加え反応を停止した。酵素反応を行ったゲルブロックを 4 行 x 5 列に並べて PFGE を行った。5 時間泳動した後、ゲルブロック内の菌体の残りや短い DNA 断片を除くため、埋め込んだゲルブロックおよびゲル上端から 3 cm 以下の低分子側のゲルを除去した。除去した部分に新たなゲルを流し、再度 PFGE を 1 晩行った。マーカー部分のみを切り出し、EtBr 染色を行い、マーカーサイズを目安に 145 kb – 170 kb 領域を切り出した (図 E-2)。切り出したゲルを埋め込み新たに GTG アガロースゲルを作製した。埋め込む際には切り出したゲル内の DNA 高分子側が泳動の進行方向となるようにした。再度 PFGE を 1 晩行い、ゲル内で精製および濃縮を行った。最後にマーカーとサンプルの末端を含むようにゲルを切りとって EtBr 染色を行い、染色したゲルのサンプル末端を目印として再度ゲルを切り出した (図 E-2)。

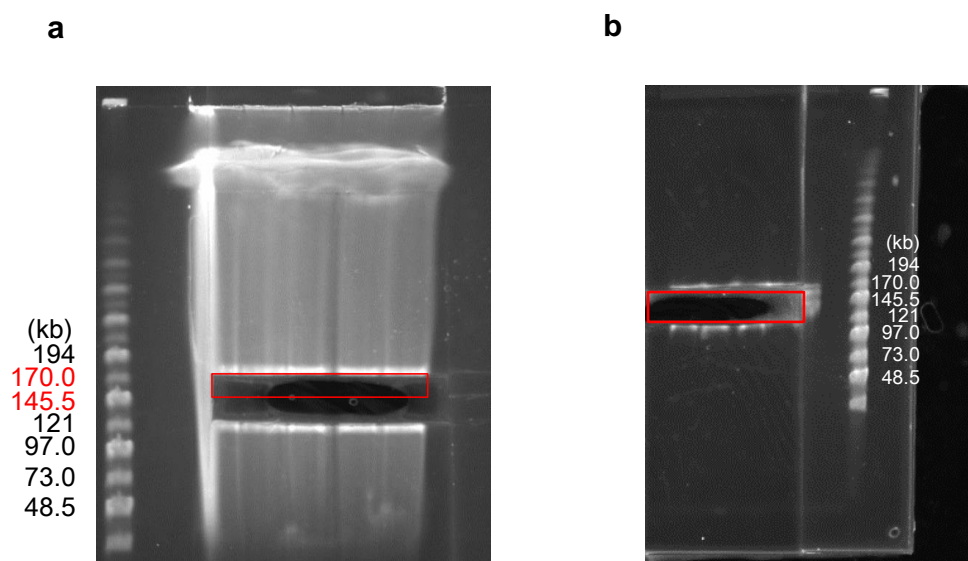


図 E-2 4083-SVS6 株ゲノムの消化と精製

a. パルスフィールド電気泳動による 1 回目の精製、切断したゲルを赤で示した。b. 2 回目の精製、赤で示した枠の部分を切断して用いた。

3. ゲルからのインサート DNA の精製とライゲーション

切り出したゲルを TE Buffer に浸し、10 min、15 min、30 min の間隔で TE Buffer を交換して洗浄した。NaI を 1.25 mg 加えて 50°C で 1 時間保温し、ゲルを溶解させ、2 ml のインサート溶液を得た。45°C の気相インキュベータ内で、シャーレに入れた TE Buffer 上に Millipore VS filter 0.025 μm を浮かべたものを 4 皿用意し、その上にインサート溶液を 500 μl ずつ乗せて、15 分透析した。それぞれに対して、ゲラーゼ溶液 20 U ml^{-1} を 50 μl ずつ加え、15 分透析した。サンプルをフィルターから 1.5 ml チューブへ回収して 40 U ml^{-1} ゲラーゼ溶液を 50 μl 加え、液相インキュベータで 3 時間 45°C で保温した。5 μl をとり、氷上においてゲル化しないことを確認した。30%PEG6000 溶液上に millipore VS filter 0.025 μm を浮かべ、その上にインサート溶液を乗せて濃縮した。濃縮したインサートの DNA 濃度を電気泳動で定量したところ、およそ 1 ng μl^{-1} だった。インサート 20 ng に対して *Bam*HI 消化および CIAP 処理した pKU503D ベクター 10 ng を加え、Takara DNA long ligation kit を用いてライゲーションを 16°C で 1 晩行った。

4. 大腸菌への形質転換とグリセロールストックの作製

ライゲーションサンプルを 0.2 x TE buffer 上で float dialysis を 1 時間行った後、大腸菌 NEB10 β 株へエレクトロポレーション法にて導入し、LB+amp+IPTG+x-gal プレートにて青白選択を行った。結果、すべて白コロニーの約 1300 コロニーの BAC ライブラリーを得た。無作為に 6 コロニーを選び PlusglowII+amp 培地にて 30°C で 1 晩培養し、Biomiga の EZgene BAC/PAC Isolation Kit を用いて BAC を精製し、6 コロニーすべてにインサートが入っていることを確認した (図 E-3)。ライブラリーは plusglow II+amp 培地が 90 μl ずつ入った 384 穴プレート 4 枚に 1 コロニーずつ植菌し、37°C で 1 晩培養した後、グリセロールストックを作製した。またスクリーニング用に TE buffer で培養液を 10 倍希釈したサンプルを作製した。

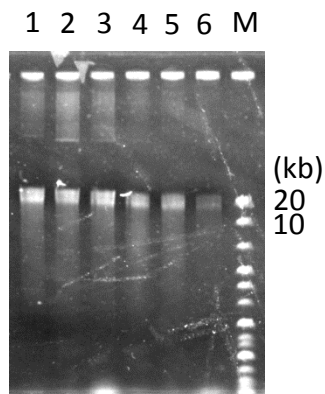


図 E-3 BAC ライブラリーのインサートの確認

M はマーカー、無作為に選んだ BAC クローンのすべてでインサートの挿入を確認した。20 kb 付近に見えるバンドは精製した後切断してしまった BAC クローンの断片。

VST 生合成遺伝子クラスターのスクリーニング

生合成遺伝子クラスターの全長を含む BAC クローンを得るために、遺伝子クラスターの両端領域を PCR によって増幅するプライマーを設計し、スクリーニングを行った。

最初のスクリーニングは遺伝子クラスター両末端のやや内側の図 2-10 の領域 2 と 4 を増幅するためのプライマーを設計した。プライマーは表 16 行 x 24 列の 384 穴プレートのサンプルを行ごとに 1 列 1 μ l ずつ 24 列分集約した集約サンプル 16 行 x プレート 4 枚分に対して PCR を行い、陽性の行の各列を展開して再度 PCR を行った。得られた 8 クローンを plusgrowII + amp 培地 5 ml で培養し、Biomiga の EZgene BAC / PAC Isolation Kit を用いて BAC を精製し、精製した BAC に対して再度 PCR をかけて確認した。得られた 8 クローン (2A20、2D9、2K8、2N24、3B19、3B24、4L11、4P2) に対して、VST 生合成遺伝子クラスターの両端で設計した図 2-10 の領域 5 と 6 (表 1-3) を増幅するプライマーを用いて再度 PCR を行い、8 クローンのうち 6 クローン (2D9、2K8、2N24、3B24、4L11、4P2) に候補を絞った。

表 E-1 スクリーニングに用いたプライマー

VST2F: 5'-CTGGGAATCGACACCGTGCAGTA-3'

VST2R: 5'-TTGAAGAAGTGCATGCCGATCACA-3'

VST4F: 5'-GCGAACAGCTGGAGAAGTACCTG-3'

VST4R: 5'-ATGTTCTGACCGAGGCACTGG-3'

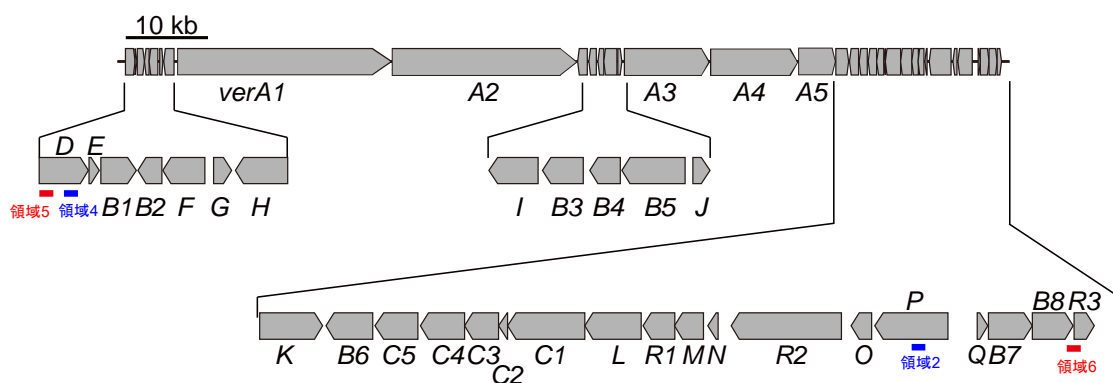


図 E-4 VST 生合成遺伝子クラスターとスクリーニング領域

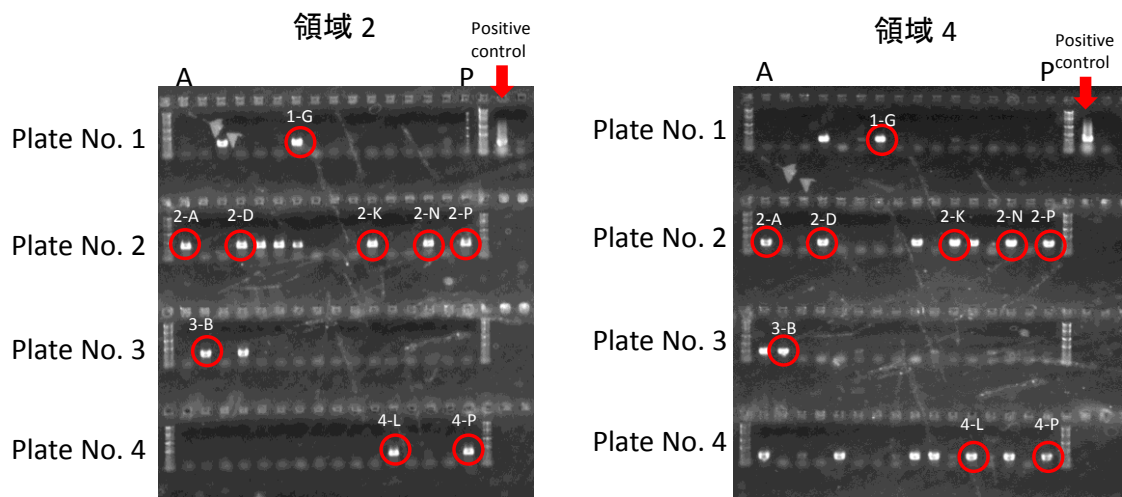


図 E-5 各プレートのスクリーニングの結果

A 行から P 行まで行ごとの集約サンプルに対して PCR を行った。領域 2 と 4 の双方で増幅したサンプルを赤丸で示した。

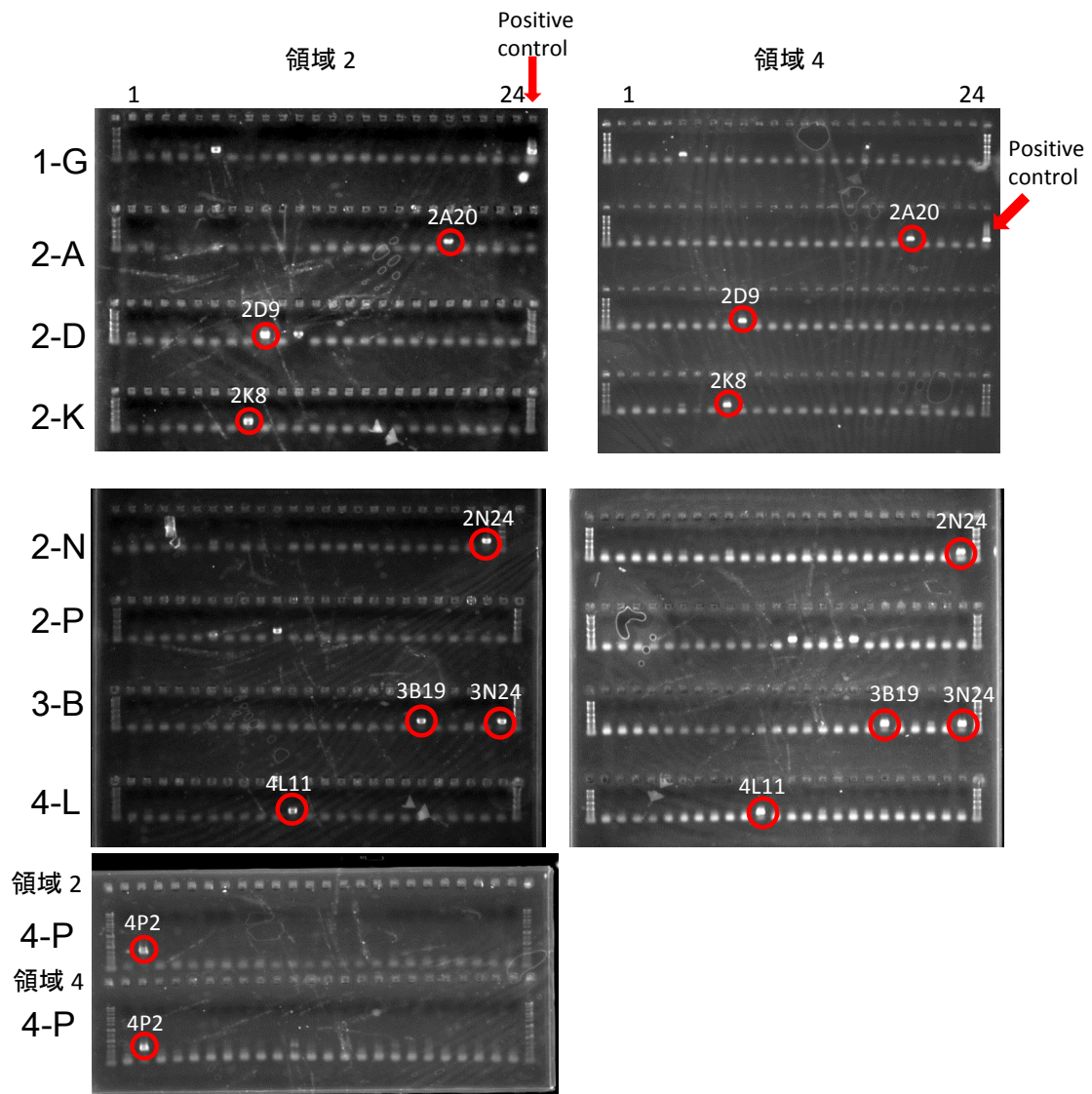


図 E-6 図 E-5 で陽性の集約サンプルを展開したスクリーニングの結果。
 行ごとの 24 列分に対して PCR を行った。領域 2 と 4 の双方で増幅したサンプルを赤丸で示した。

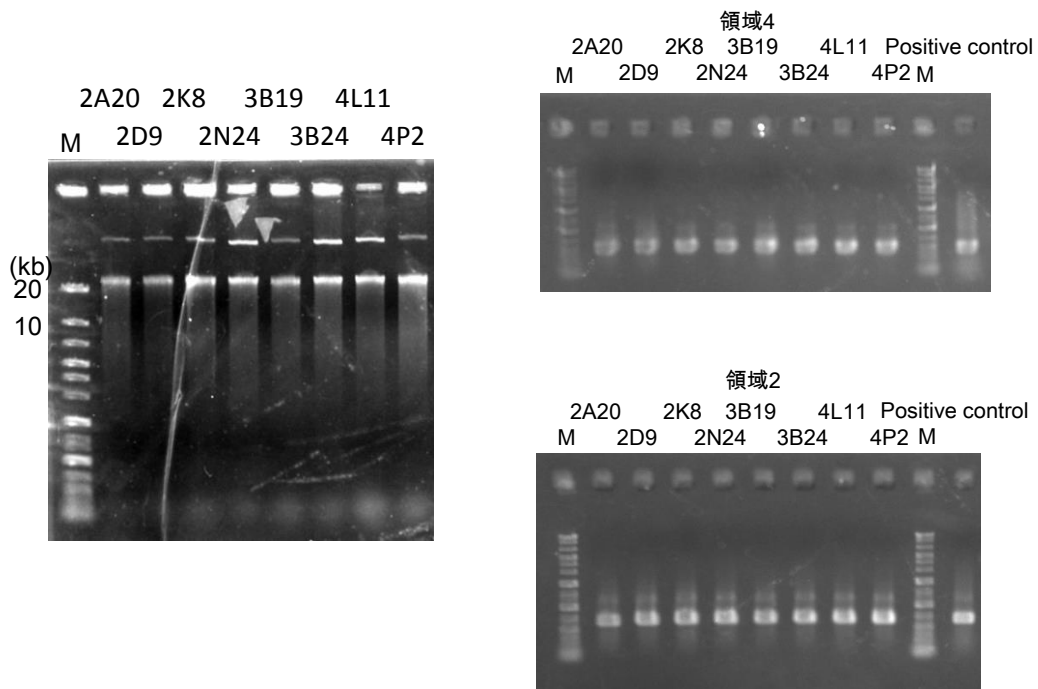


図 E-7 精製した BAC クローン(左)と各ベクターに対する領域 2 と 4 での PCR による確認(右)

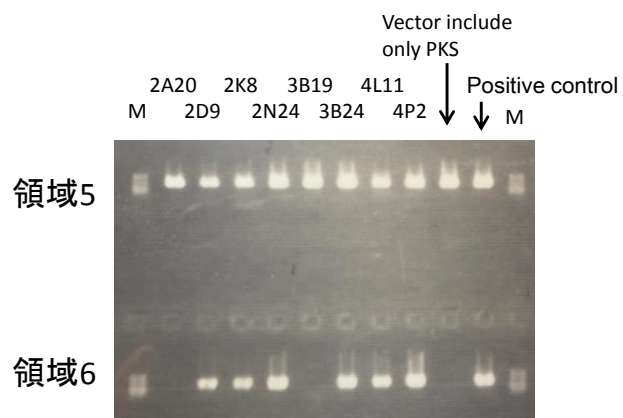


図 E-8 各ベクターに対する領域 5 と 6 における PCR スクリーニング

遺伝子操作

大腸菌を用いた遺伝子操作は”Molecular Cloning (Third Edition)”に従った。

プロトプラスト PEG 法による放線菌の形質転換

形質転換に用いる放線菌は R2YE 培地にて培養した。*S. lividans* TK23 株を用いる場合のみ YEME 液体培地に glycine を終濃度 0.5%、塩化マグネシウム六水和物終濃度 0.5 mM 添加した培地を用いた。

培養液を回収し、3000 rpm、10 min の遠心操作で集菌した。菌体を 10.3%スクロース溶液を用いて懸濁して洗浄し、再度 3000 rpm、10 min の遠心操作で集菌した。上清を除き、菌体を 10 ml の P バッファーへ懸濁した。ここへ適当な濃度のリゾチームを含む 10 ml の P バッファーを添加し、30°C にて保温した。菌体を顕微鏡観察し、菌糸が解けて細胞がプロトプラスト化していることを確認した。綿栓を用いて菌体液を濾過した。濾過された溶液を 3000 rpm、10 min にて遠心して菌体を回収した。回収した菌体を 10 ml P Buffer で懸濁し綿栓で濾過後、3000 rpm、10 min にて遠心して菌体を回収する操作を 2 回繰り返した。上清を捨て、プロトプラスト化した菌体を適当な量の P Buffer に懸濁し、100 μ l ずつを分注し、プロトプラスト菌体とした。

プロトプラスト菌体に形質転換する DNA を適宜加え、直ちに 500 μ l の 25%PEG 溶液 (P buffer に溶解) を加えて、転倒混和して 1 分間静置し、その後 800 μ l の P Buffer を加えて混合し、450 μ l ずつ R2YE プレートに塗り広げた。30°C で 14 時間培養した後、選択マーカーを 1.5 ml の滅菌水にとかし、上から重層して 30°C で培養を続けた。生育したコロニーを選択マーカーを含む TSB 培地へと植え継ぎ、30°C で培養し生育した株を形質転換体とした。

P Buffer

Sucrose	10.3 g
K ₂ SO ₄	0.025 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.202 g
Trace Element solution	0.2 ml
H ₂ O	fill up to 80 ml
以下をオートクレーブ後添加	
5.73% TES (pH7.2)	10 ml
3.68% CaCl ₂	10 ml
0.5% KH ₂ PO ₄	1 ml

25%PEG 溶液

Polyethyleneglycol#1450 1g に P Buffer 3.75 ml を加えて混合し、25%PEG 溶液とした。

化合物の精製

VST aglycone (4) の調製

VST 20.7 mg を 4.8 ml CH₂Cl₂、600 μl MeOH、1.2 ml TFA に溶解し、攪拌しながら室温で 8 分間反応させた。反応させたサンプルを飽和食塩水にて 2 回懸濁した後、Na₂SO₄ で脱水し、減圧蒸留によって溶媒を留去した。80%MeOH + 0.1% formate を用いて Develosil 4.6 × 250 mm にて分取し 1.4 mg の VST aglycone (4) を得た。

VST G (5a) と VST H (5b) の単離

培養液 3.7 l を遠心にて菌体と上清に分け、菌体はアセトンによって抽出した後、ろ過して菌体を除き、ろ液を減圧下でアセトンを除去して水層を得た。培養上清、および菌体抽出から得た水層に対し、Amberlite® XAD7HP を用いて固相抽出を行った。固相抽出したカラム担体の 3 倍量の 70%MeOH、80%MeOH、90%MeOH、100%MeOH で分画し、70%画分に VST G (5a) と VST H (5b) の両化合物が含まれることを LC/MS にて確認した。70%画分について 90%MeOH + 0.1% formate を用いて PEGASIL ODS 20 × 250 mm にて分取を行い VST G (5a) 8.7 mg と VST H (5b) 6.7 mg を得た。

2 の単離

培養液 4 l を遠心にて菌体と上清に分け、菌体はアセトンによって抽出した後、ろ過して菌体を除き、ろ液を減圧下でアセトンを除去して水層を得た。培養上清、および菌体抽出から得た水層について酢酸エチル抽出を 2 回行った。酢酸エチル層を減圧蒸留にて留去した。抽出サンプル 483.6 mg を Preparative Liquid Chromatography 上で、酢酸エチル: ヘキサン、3:1 にて展開し、3 を含む部分を掻きとった。掻きとったシリカから MeOH にて回収し、52 mg を得た。得たサンプルを 87.5%MeOH + 10 mM ギ酸アンモニウム pH3.0 を用いて PEGASIL ODS 20 × 250 mm にて分取したのち、酢酸エチルにサンプルを溶かして回収して脱塩し、12.2 mg の 2 を得た。

7 の単離

大スケール反応 (8 mL) の後、MeOH を加えて酵素を失活させたのち遠心し、上清を減圧下で留去した。MeOH 15% + 0.1% formate を用いて Develosil RPAQUEOUS-AR-5 C-30 20 × 250 mm にて、分取精製し、8.1 mg の 7 を得た。

タンパク質の発現と精製

組換えタンパク質の発現

目的タンパク質の遺伝子をクローニングしたベクターを *E. coli* BL21(DE3) へ形質転換した。

取得した形質転換体をベクターに適切な抗生物質を加えた Luria-Bertani (LB) 培地へ植菌し、37°C、300 rpm にて一晩前培養した。前培養液を適切な濃度の抗生物質を加えた Terrific Broth 培地へと 2% 植菌した。本培養には 500 ml 容坂口フラスコへ 100 ml 培地を加えた培養器を用いた。37°C、120 rpm にて 2 h 振とう培養した後、氷水につけて冷やし、IPTG を添加することで誘導をかけた。IPTG を VstJ、Abycyc では終濃度 0.1 mM、BfmI、BfmJ と BfmI と BfmJ の共発現では終濃度 0.5 mM となるように加え 18°C、120 rpm にて一晩振とう培養した。

Abycyc の Se-Met 置換体の発現

基本的には上記の方法に従った。発現用宿主に L-Met 要求株 *E. coli* B834(DE3) を用いた。TB 培地の代わりに後述の Se-Met 置換体発現用培地を使用し、植菌の際には前培養からの L-Met の持ち込みを避けるため菌体を滅菌水で洗浄した後、植菌した。

組換えタンパク質の精製

培養液は 5,000 rpm で 10 分間遠心して菌体を回収した。Lys Buffer を加えて菌体を懸濁したのち、Branson sonifier にて菌体を破碎した。菌体破碎液は 17,000 rpm で 20 分間遠心の、上清を可溶性画分として回収した。可溶性画分を Ni-NTA agarose (Qiagen) が入ったオープンカラムにてアプライし、組換えタンパク質をカラム担体へと吸着させた。カラムを Wash Buffer にて洗浄した後、250 mM のイミダゾールを含む Elution buffer で溶出した。BfmI と BfmJ の共発現サンプルでは、Elution buffer の前に Wash2 buffer でカラムの洗浄を行った。第 5 章では溶出画分を透析膜に閉じ、4°C にて一晩透析し、イミダゾールを除いた。

各章にてタンパク質精製に用いた試薬組成を次頁に示した。

タンパク質精製のバッファの組成

Lys Buffer、Wash buffer (第3章第4節、第5節、第6節)

Tris-HCl (pH8.0)	50 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH8.0)	20 mM

Elution buffer (第3章第4節、第5節、第6節)

Tris-HCl (pH8.0)	50 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH8.0)	250 mM

Lys Buffer、Wash buffer (第3章第8節)

Tris-HCl (pH8.0)	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH8.0)	20 mM

Elution buffer (第3章第8節)

Tris-HCl (pH8.0)	20 mM
NaCl	150 mM
Imidazole (pH8.0)	250 mM

Lys buffer (第5章)

HEPES (pH7.5)	50 mM
NaCl	0.1 M
Imidazole	20 mM
Glycerol	10% (w/v)
Tween	1% (v/v)

Wash buffer (第5章)

HEPES (pH7.5)	50 mM
NaCl	0.1 M
Imidazole	20 mM
Glycerol	10% (w/v)

Wash2 buffer (第 5 章)

HEPES (pH7.5)	50 mM
NaCl	0.1 M
Imidazole	50 mM
Glycerol	10% (w/v)

Elution buffer (第 5 章)

HEPES (pH7.5)	50 mM
NaCl	0.1 M
Imidazole	250 mM
Glycerol	10% (w/v)

透析バッファー (第 5 章)

HEPES (pH7.5)	50 mM
NaCl	0.1 M
Glycerol	10% (w/v)

ゲル濾過クロマトグラフィー

表 E-2 の条件で行った。

表 E-2 ゲル濾過クロマトグラフィーの条件

Column	HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200 pg (GE healthcare, Tokyo, Japan)
Solvent	(1) 20 mM Tris-HCl pH8.0, 150 mM NaCl (第3章第8節) (2) 20 mM HEPES-NaOH pH7.5, 100 mM NaCl (第5章第4節)
Flow rate	2.5 ml min ⁻¹
Column temperature	4°C

培地組成

LB 培地

Bacto tryptone	1.0%
Bacto yeast extract	0.5%
NaCl	0.5%
(Bacto agar)	1.5%

SOB 培地

Bacto Tryptone	2.0%
Bacto Yeast Extract	0.5%
NaCl	0.05%
KCl	2.5 mM
オートクレーブ後以下を添加	
MgCl ₂	10 mM

TB 培地

Bacto tryptone	12 g
Bacto yeast extract	24 g
Glycerol	4 ml
H ₂ O	fill up to 900 ml
以下をオートクレーブ後に加える	
K ₂ HPO ₄	2.31 g
KH ₂ PO ₄	12.54 g
H ₂ O	fill up to 100 ml

TSB 培地

triptone soya broth	3.0%
(agar)	1.5%

PC-1 培地

Soluble starch	1.0 %
Molasses	1.0 %
Polypeptone	1.0 %
Meat extract	1.0 %
pH	adjust to 7.2

K 培地

Soluble starch	2.5 %
Soybean meal	1.5 %
Dry yeast	0.2 %
CaCO ₃	0.4%
pH	adjust to 6.2

Trace Element Solution

ZnCl ₂	40 mg
FeCl ₃ · 6H ₂ O	20 mg
CuCl ₂ · 2H ₂ O	20 mg
MnCl ₂ · 4H ₂ O	20 mg
NaB ₄ O ₇ · 10H ₂ O	20 mg
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	10 mg
H ₂ O	fill up to 1 L

A94964 生產培地

Glucose	1.0%
Soluble starch	4.0%
Polypeptone	1.0%
Dry yeast extract	0.45%
Corn steep liquid	0.50%
Trace element solution	0.10%
pH	adjust to 7.0

ISP 培地

Pancreatic digest of casein	0.5%
Yeast extract	0.3%
pH	adjust to 7.0

A1 培地

Soluble starch	1.0%
Yeast extract	0.4%
Peptone	0.2%
pH	adjust to 7.0

GYM 培地

Glucose	0.4%
Yeast Extract	0.4%
Malt Extract	1.0%
NZ-Amine, type A	0.1%
NaCl	0.2%
pH	adjust to 7.2

R2YE 培地

Sucrose	103 g
K ₂ SO ₄	0.25 g
Glucose	10 g
MgCl ₂	10..12 g
Casamino Acid	0.1 g
Trace Element Solution	2 ml
Yeast Extract	5 g
(Agar)	23 g
H ₂ O	800 ml
オートクレーブ後以下を添加	
0.5% KH ₂ PO ₄	10 ml
5 M CaCl ₂ · 2H ₂ O	4 ml
20% L-proline	15 ml
5.73% TES (pH7.2)	5.73 g

Plusgrow II 培地

Plusgrow II(ナカライテスク)	4%
----------------------	----

表 E-1 本研究で使用した菌株

Strain	Description
<i>S. versipellis</i> 4083-SVS6	versipelostatin producing strain
<i>S. albus</i> J1074	host strain for heterologous expression
<i>S. albus</i> J1074::pKU503D	transformant with pKU503D empty vector
<i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N24	transformant with pKU503DverP10N24 containing vst biosynthetic gene cluster
<i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N24 Δ vstI	double cross over disruptant of <i>vstI</i> from <i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N24
<i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N25 Δ vstH	<i>vstI</i> double cross over disruptant from <i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N25
<i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N26 Δ vstJ	<i>vstI</i> double cross over disruptant from <i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N26
<i>S. lividans</i> TK23	host strain for heterologous expression
<i>S. lividans</i> TK23::pKU503DJL68_PN1_P10-C12	transformant with pKU503DJL68_PN1_P10-C12 containing biosynthetic gene 6
<i>E. coli</i> NEB10 β	host strain for BAC library
<i>E. coli</i> DH5 α	host strain for gene cloning
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	host strain for protein expression
<i>E. coli</i> B834(DE3)	<i>E. coli</i> methionine auxotrophic strain for Se-Met substituted protein expression <i>metE</i>

表 E-2 本研究で使用したプラスミド

plasmid	description	reference of source
pKU503D	vector used for construction of BAC library, amp ^r , neo ^r	(39)
pUC118Apr	pUC118 vector harboring aac (3) IV gene between <i>Hind</i> III and <i>Eco</i> RI sites;this plasmid was used for <i>in-frame</i> gene deletion of <i>S. albus</i> J1074::pKU503DverP10N24	(114)
pT7Blue T-Vector	general cloning vector with TA-cloning site, amp ^r	Novagen
pKU503DverP10N24	BAC clone containing <i>vst</i> biosynthetic gene cluster	this study
pUC118aprΔ <i>vst</i> I	Plasmid for double-crossover gene disruption of <i>vst</i> I	this study
pUC118aprΔ <i>vst</i> H	Plasmid for double-crossover gene disruption of <i>vst</i> H	this study
pUC118aprΔ <i>vst</i> J	Plasmid for double-crossover gene disruption of <i>vst</i> J	this study
pHIS8	vector for protein expression with N-terminal 8-histidines tag	(119)
pHIS8- <i>vst</i> J	the <i>vst</i> J fragment was inserted into <i>Nco</i> I and <i>Bam</i> HI sites of pHIS8	this study
pKU503DJL68_PN1_P10-C12	BAC clone containing biosynthetic gene cluster of 6	this study
pHIS8- <i>bfm</i> I	the <i>bfm</i> I fragment was inserted into <i>Eco</i> RI and <i>Hind</i> III sites of pHIS8	(95)
pHIS8- <i>bfm</i> J	the <i>bfm</i> J fragment was inserted into <i>Eco</i> RI and <i>Hind</i> III sites of pHIS8	(95)
pETDuet1	vector for protein co-expression with N-terminal 8-histidines tag for MCS1	Novagen
pETDuet1- <i>bfm</i> IJ	the <i>bfm</i> I fragment was inserted into <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI and the <i>bfm</i> J fragment was inserted into <i>Nde</i> I and <i>Bgl</i> II of pETDuet1	this study
pETDuet1- <i>bfm</i> JI	the <i>bfm</i> J fragment was inserted into <i>Bam</i> HI and <i>Eco</i> RI and the <i>bfm</i> I fragment was inserted into <i>Nde</i> I and <i>Bgl</i> II of pETDuet1	this study

分析機器

PFGE

CHEF Mapper® XA (Bio-Rad, Tokyo, Japan)

LC/UV/MS (第1章から第3章第4節まで、第5章第1節と第3節)

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (Shiseido, Tokyo, Japan)
Pump	LC-30A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
PDA	SPD-M20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Column oven	CTO-30A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
Auto sampler	SIL-30A (Shimadzu, Kyoto, Japan)
MS	Triple TOF™ 5600 (AB Sciex, Tokyo, Japan)

LC/UV (第3章第5節と第9節、第4章第2節)

Column	CAPCELLPAK IF 2.0 × 50 mm (Shiseido, Tokyo, Japan)
Pump	X-LC 3185PU (JASCO, Tokyo, Japan)
PDA	X-LC 3110MD (JASCO, Tokyo, Japan)
Auto sampler	X-LC 3159AS (JASCO, Tokyo, Japan)
Column oven	X-LC 3067CO (JASCO, Tokyo, Japan)

HPLC (第5章第2節)

Column	CAPCELL PAK C18 MG-II 4.6 × 250 mm (Shiseido, Tokyo, Japan)
Pump	PU-2089 Plus (JASCO, Tokyo, Japan)
PDA	MD-2010 Plus (JASCO, Tokyo, Japan)
Auto sampler	AS-2057 Plus (JASCO, Tokyo, Japan)

分取 HPLC

Pump	SSC-3462 (Senshu scientific co., Ltd, Tokyo, Japan)
Detector	SSC-5410 (Senshu scientific co., Ltd, Tokyo, Japan)

NMR

JEOL ECA-600 (JEOL, Tokyo, Japan)

ゲル濾過クロマトグラフィー

AKTAprime plus (GE Healthcare BioSciences, Tokyo, Japan)

HiLoad™ 26/60 Superdex 200pg (GE Healthcare BioSciences, Tokyo, Japan)

分光学的データ

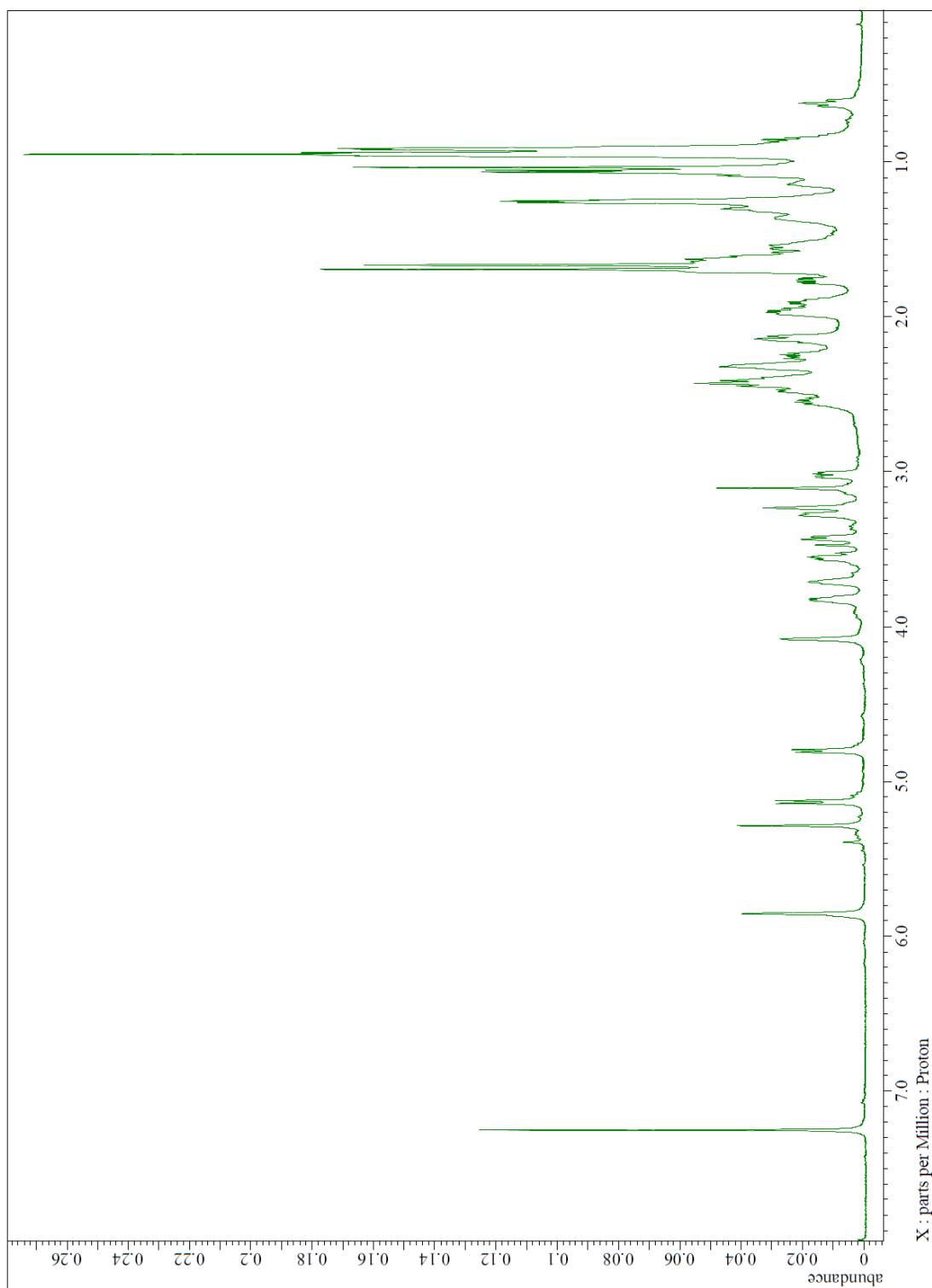
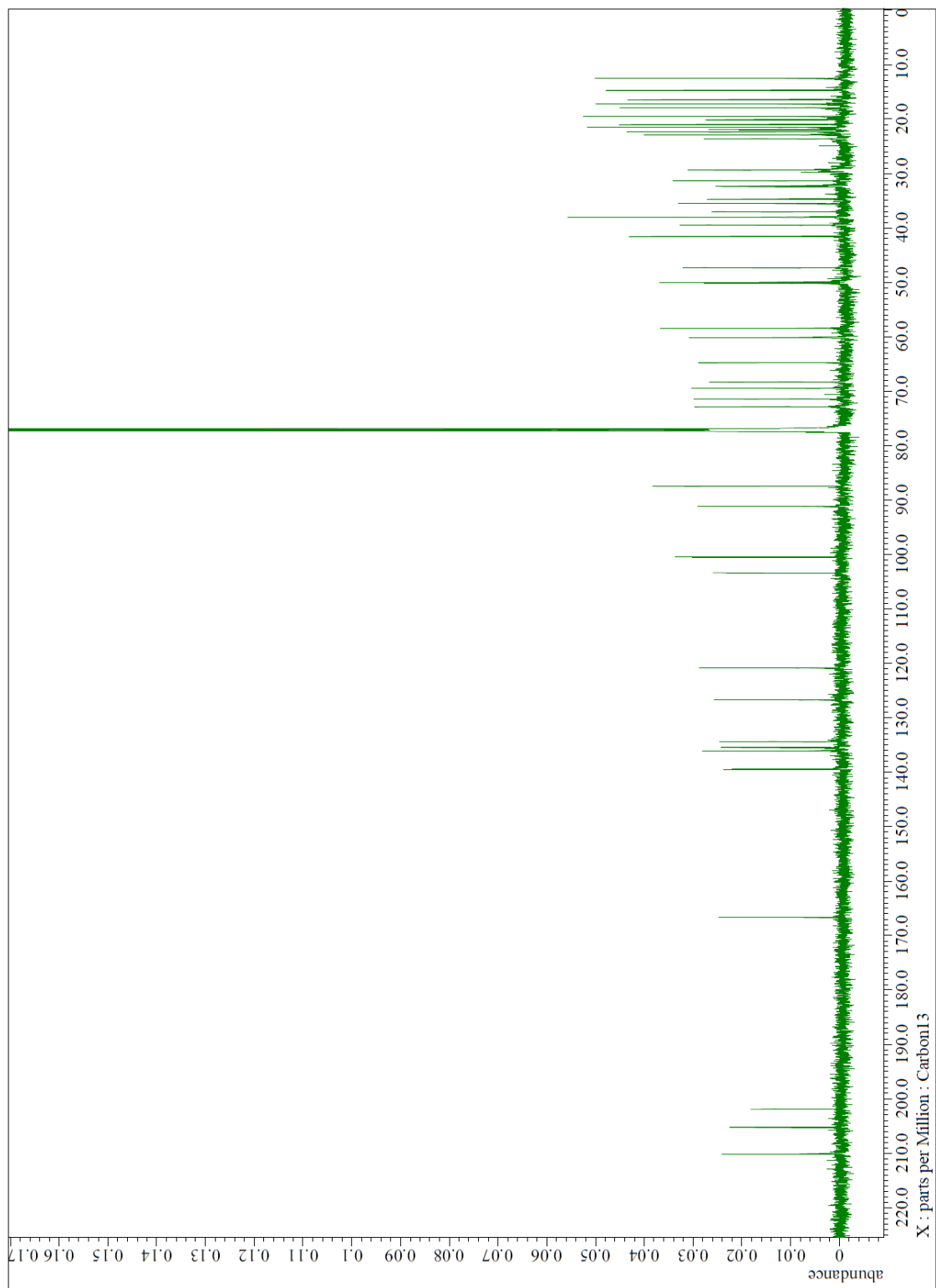
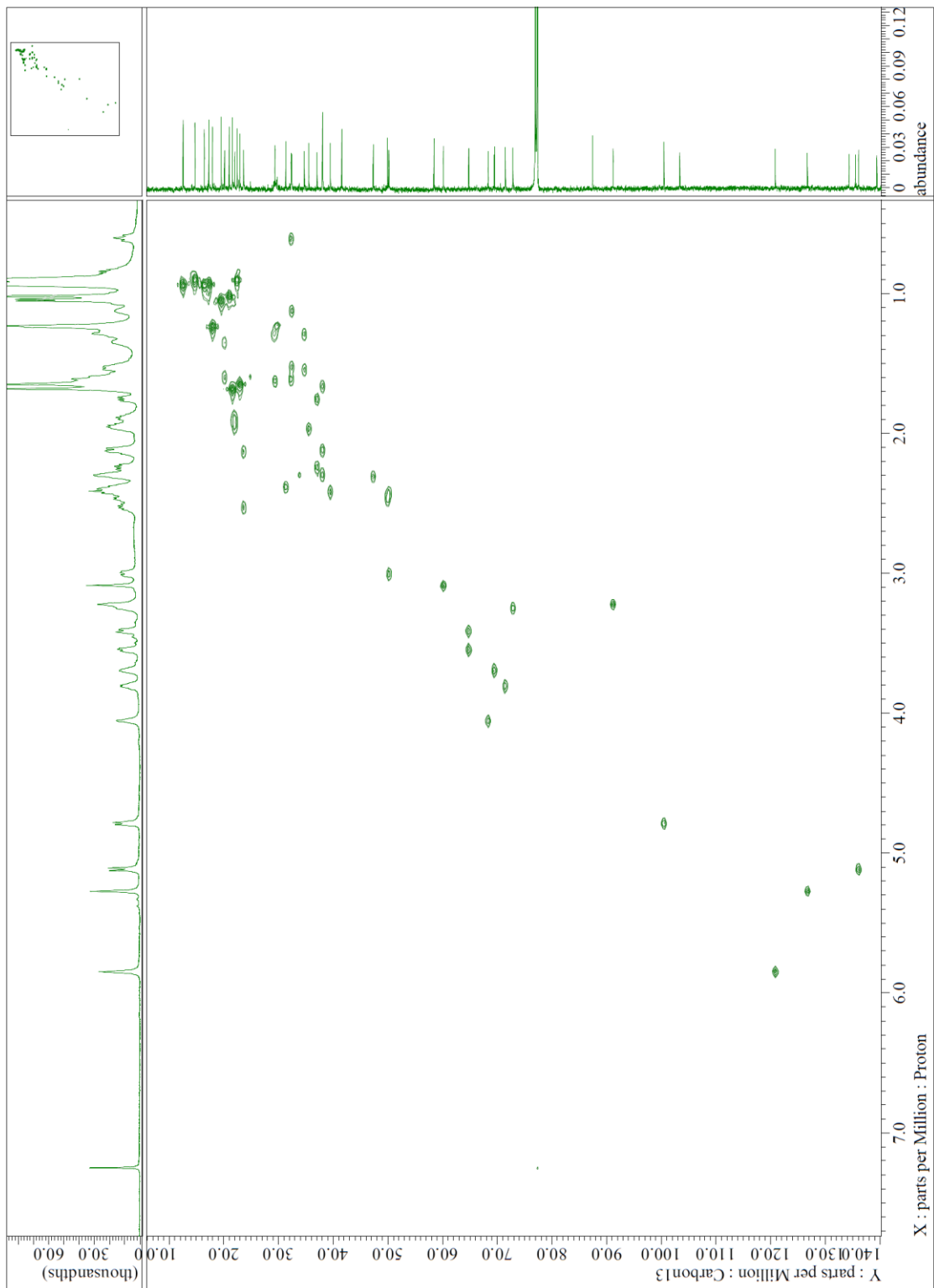


図 S-1 VST G (5a) の ^1H NMR (CDCl_3)



☒ S-2 VST G (5a) の ^{13}C NMR (CDCl_3)



☒ S-3 VST G (5a) の HSQC (CDCl₃)

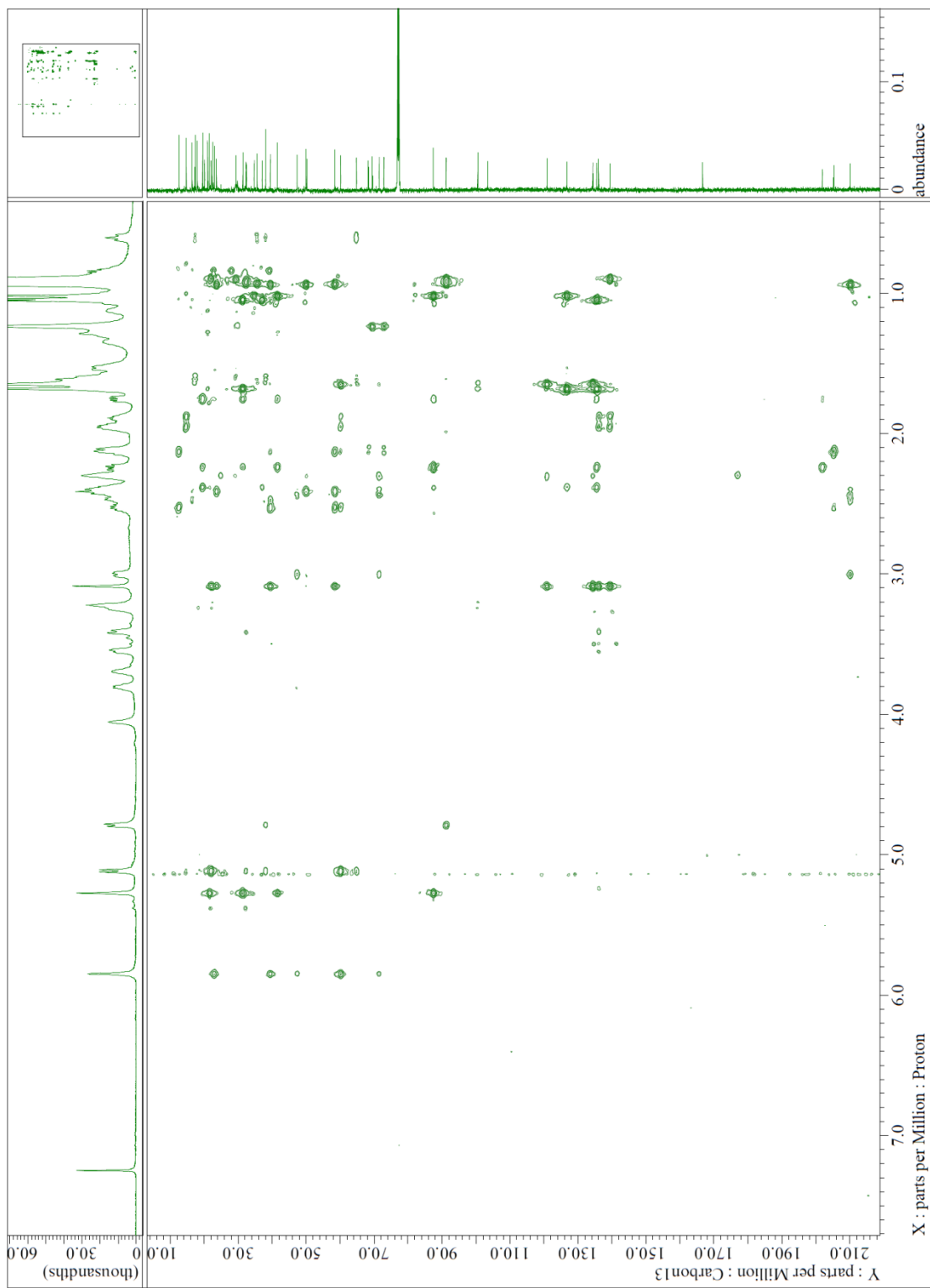
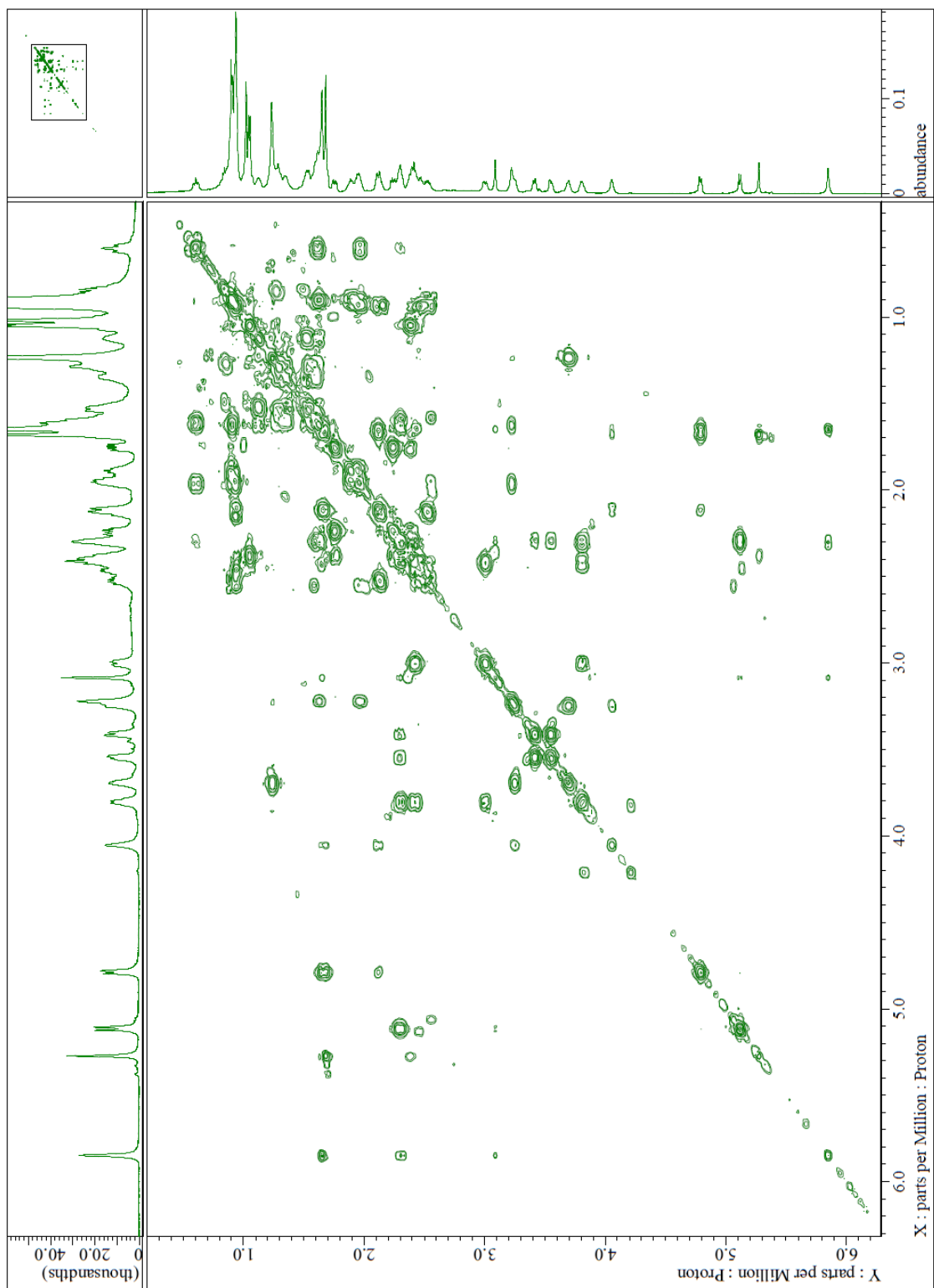
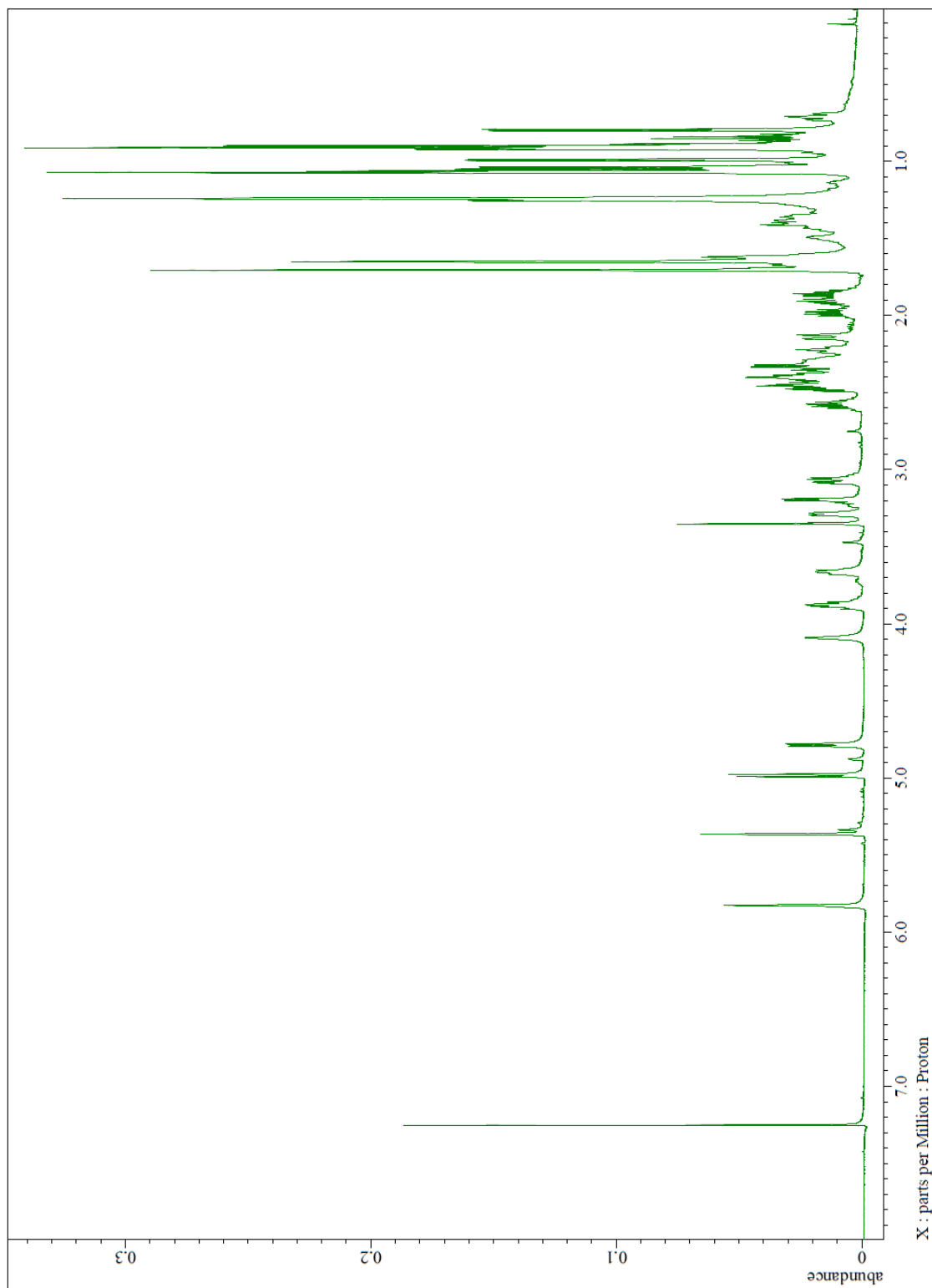


図 S-4 VST G (5a) の HMBC (CDCl₃)



☒ S-5 VST G (5a) の DQF-COSY (CDCl₃)



☒ S-6 VST H (5b) の ^1H NMR (CDCl_3)

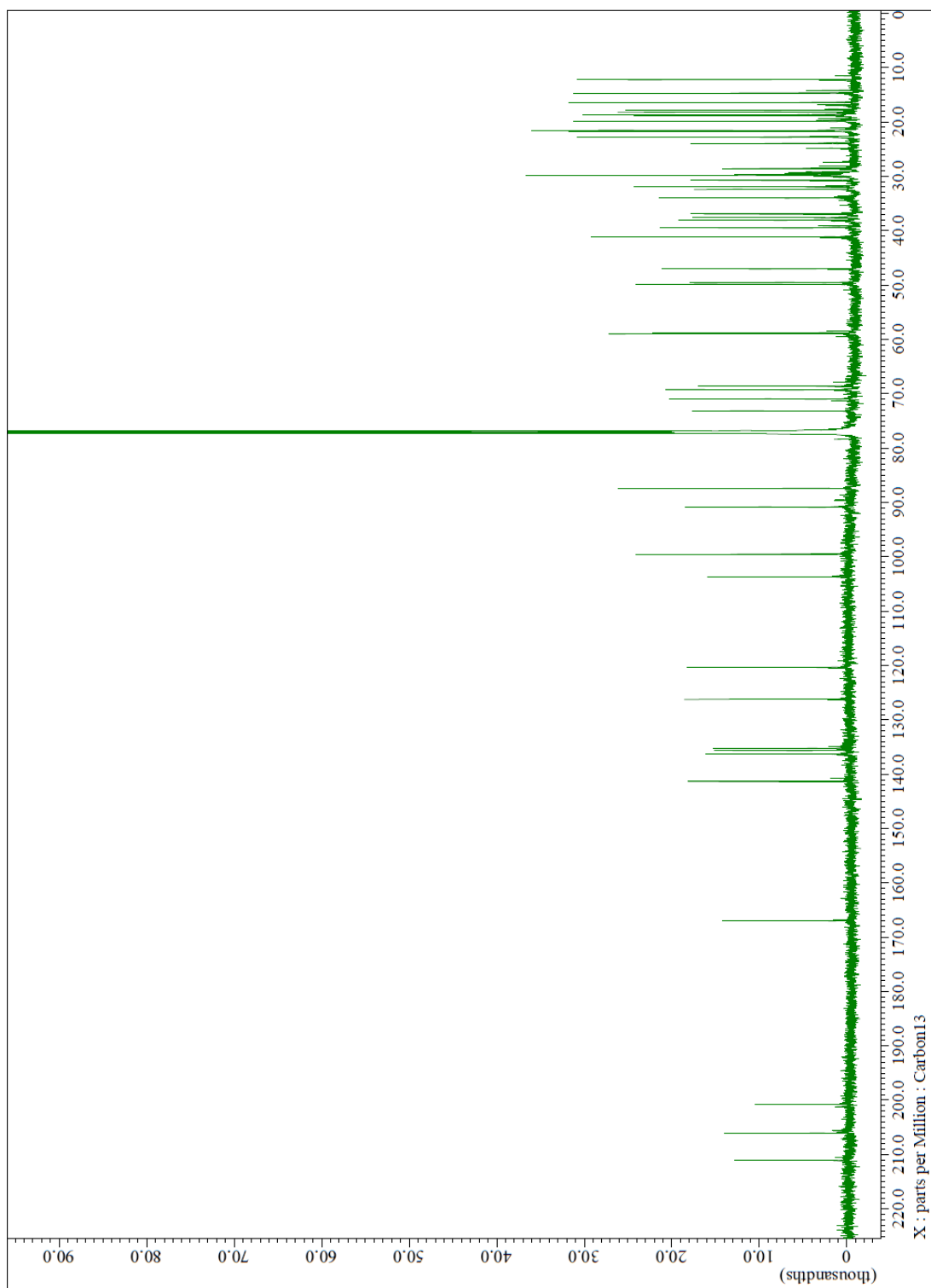
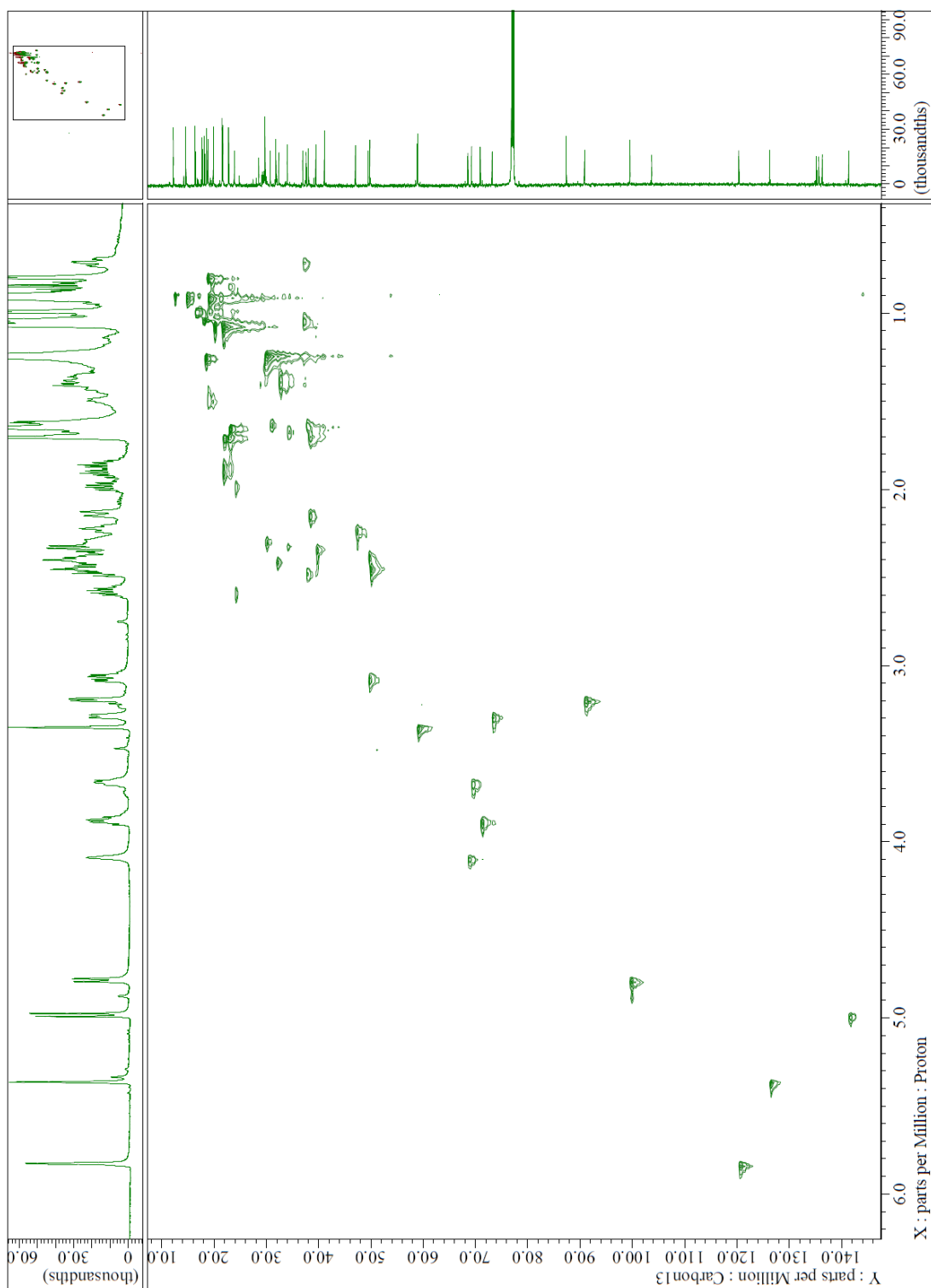


図 S-7 VST H (5b) の ^{13}C NMR (CDCl_3)



☒ S-8 VST H (5b) の HSQC (CDCl₃)

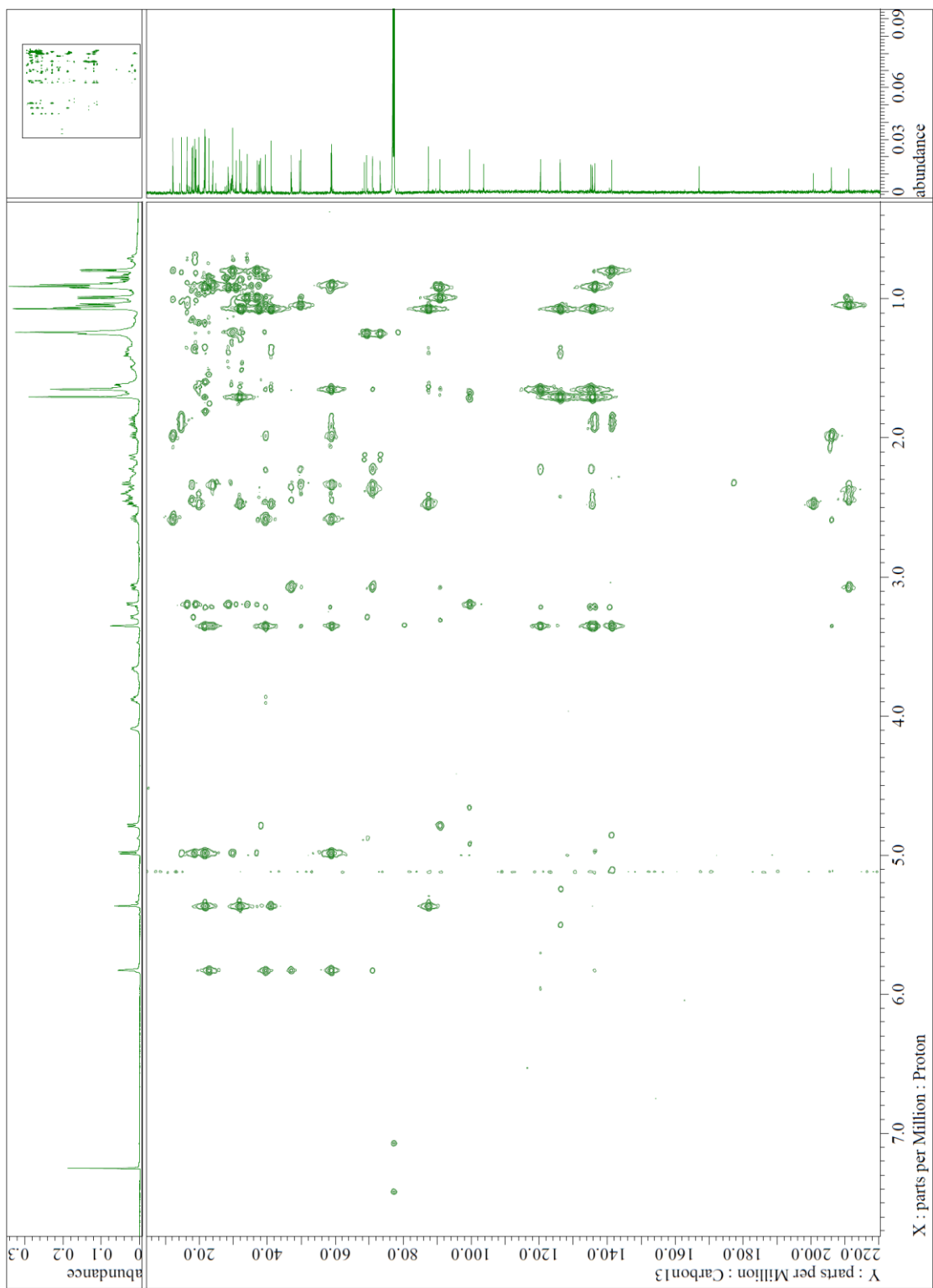
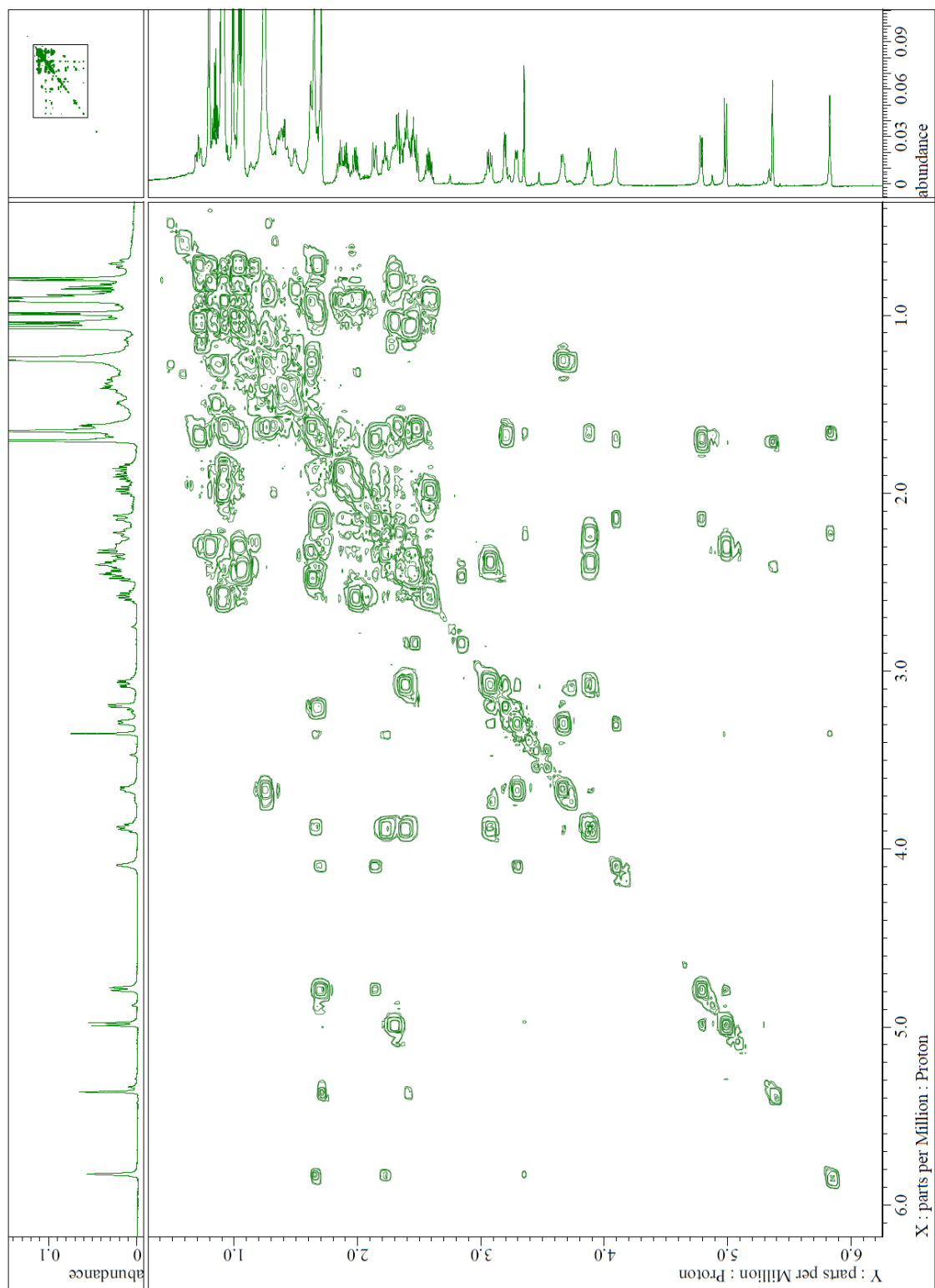


図 S-9 VST H (5b) の HMBC (CDCl₃)



☒ S-10 VST H (5b) の DQF-COSY (CDCl₃)

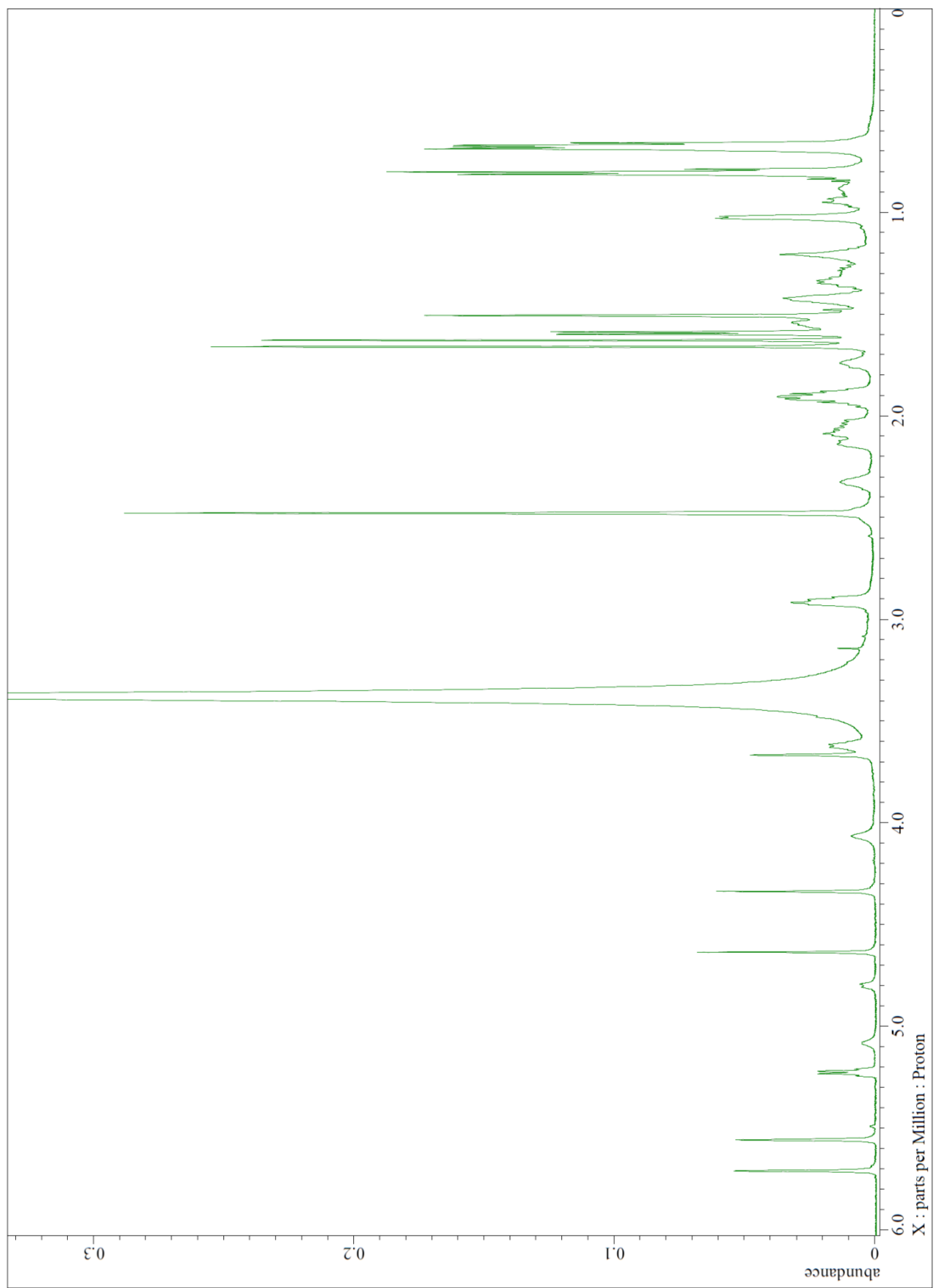
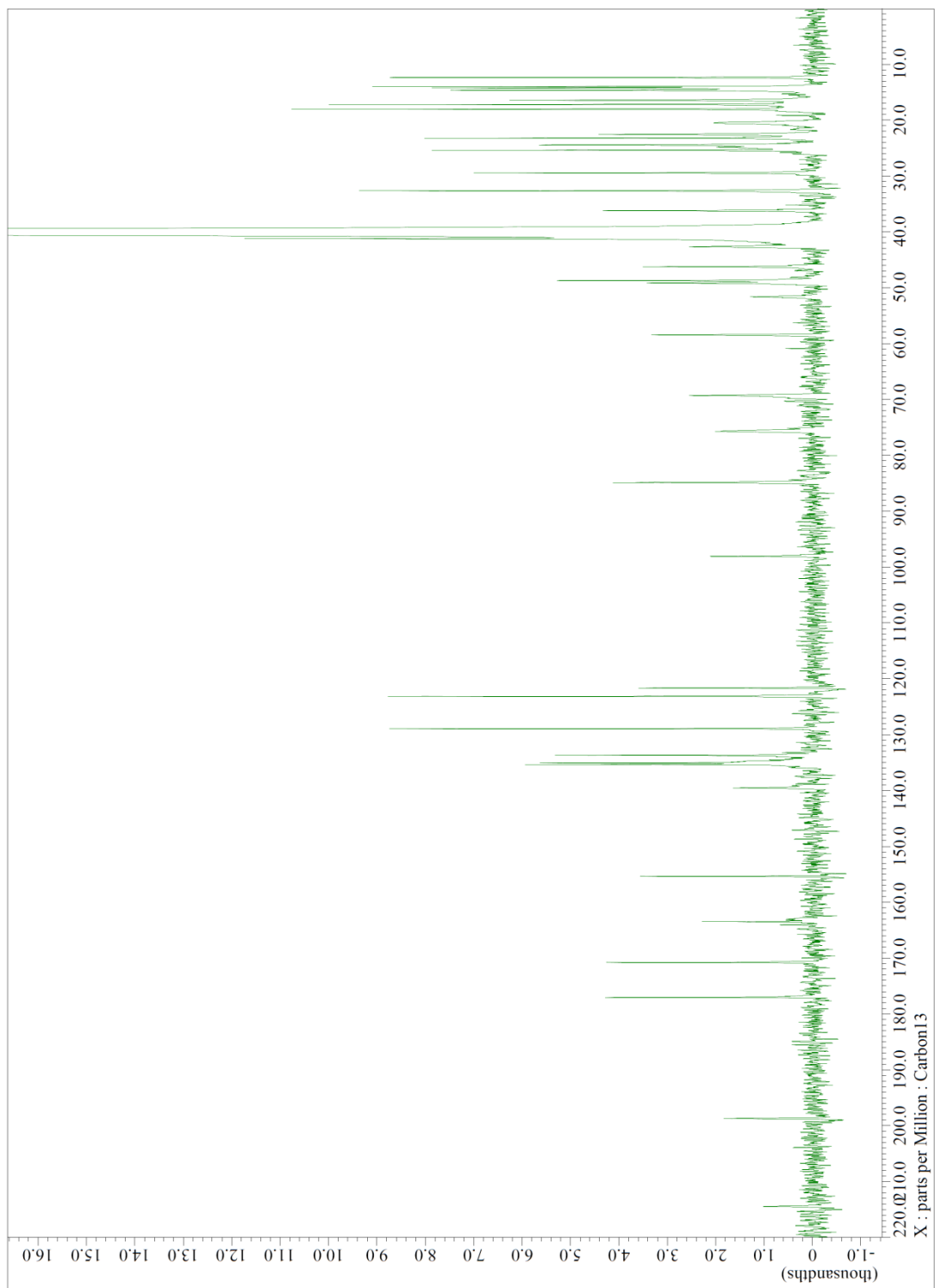


図 S-11 2 の $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$)



☒ S-12 2 の ^{13}C -NMR (DMSO-*d*₆)

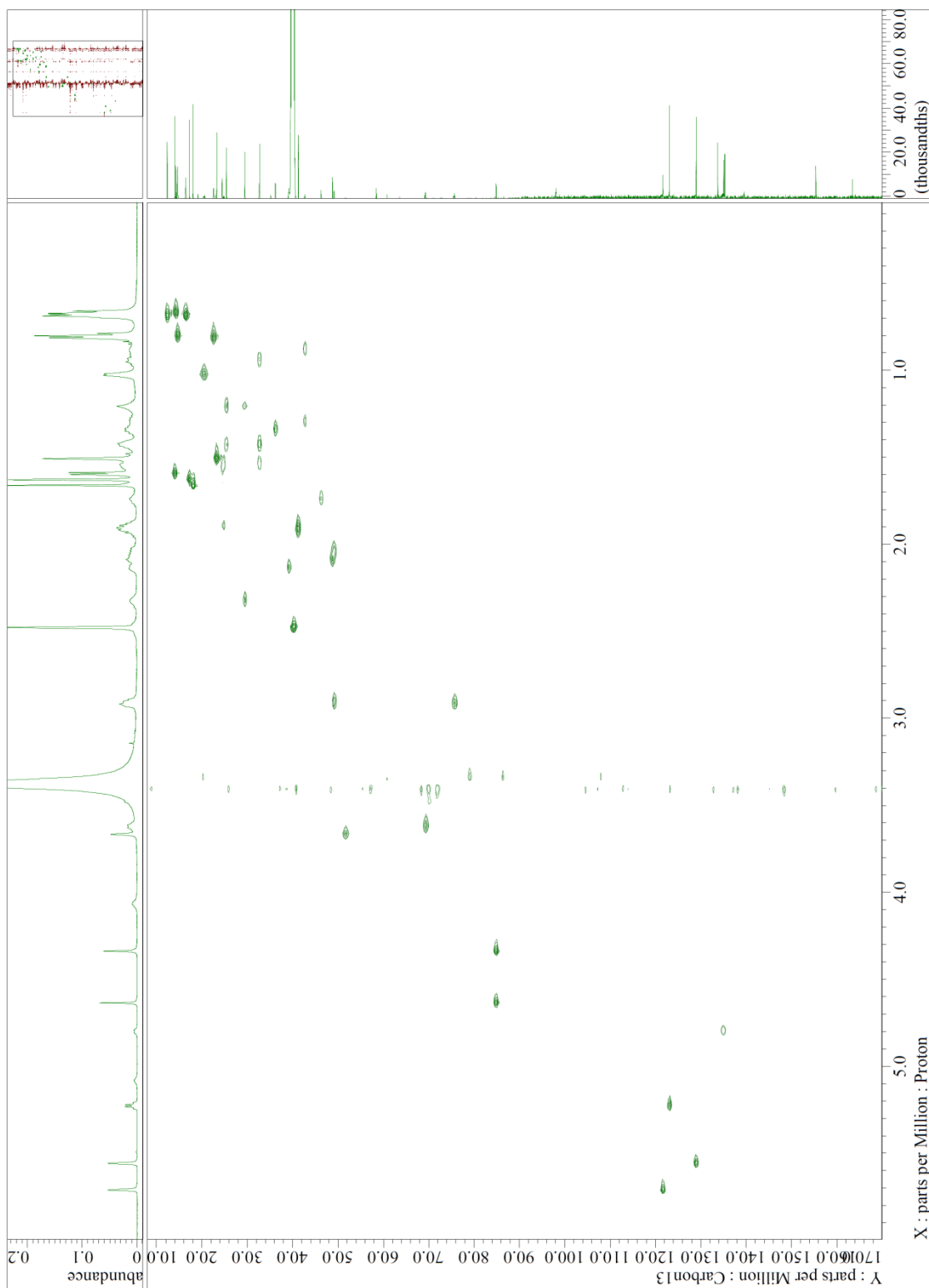


図 S-13 2 の HSQC (DMSO-*d*₆)

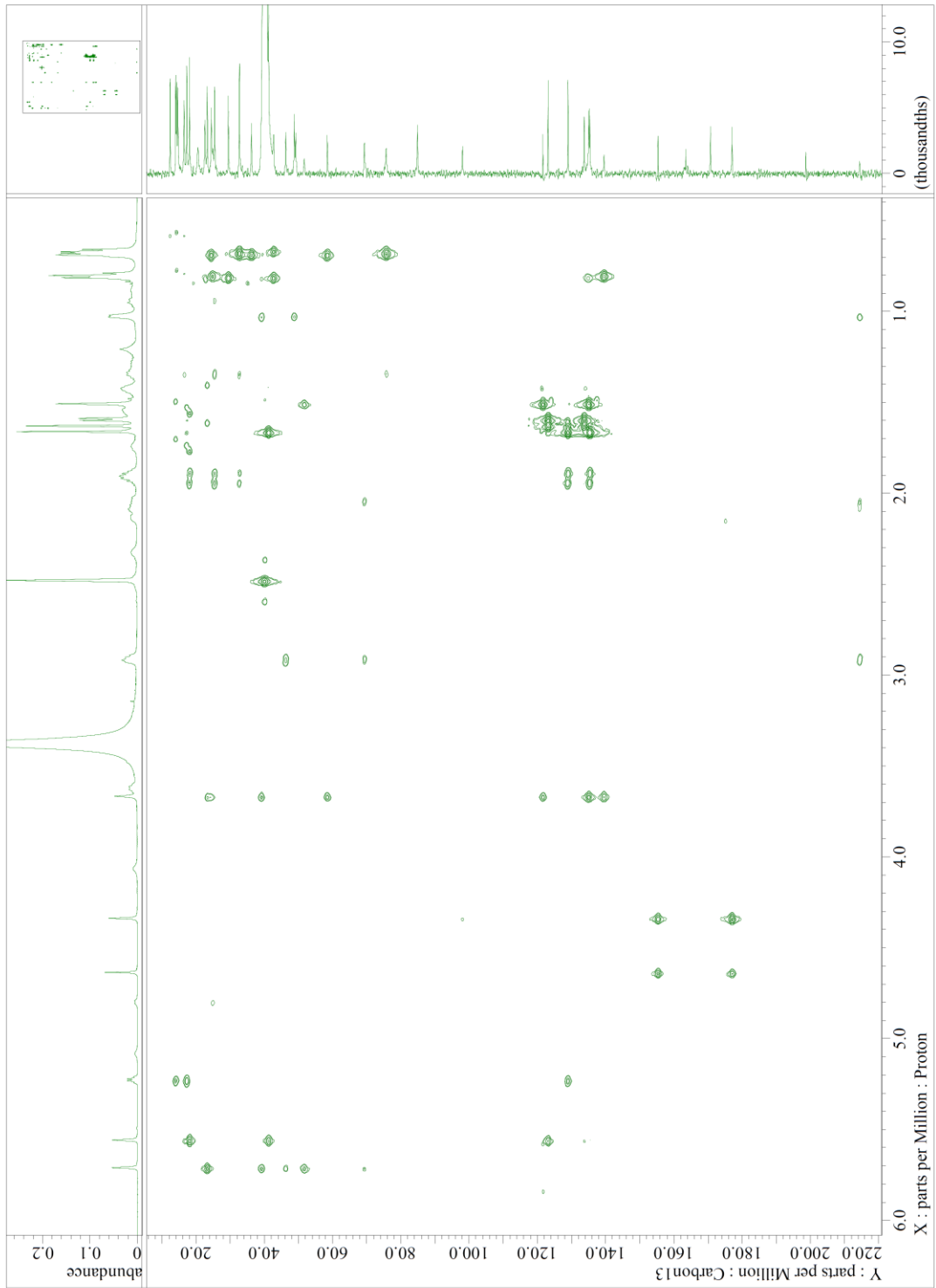
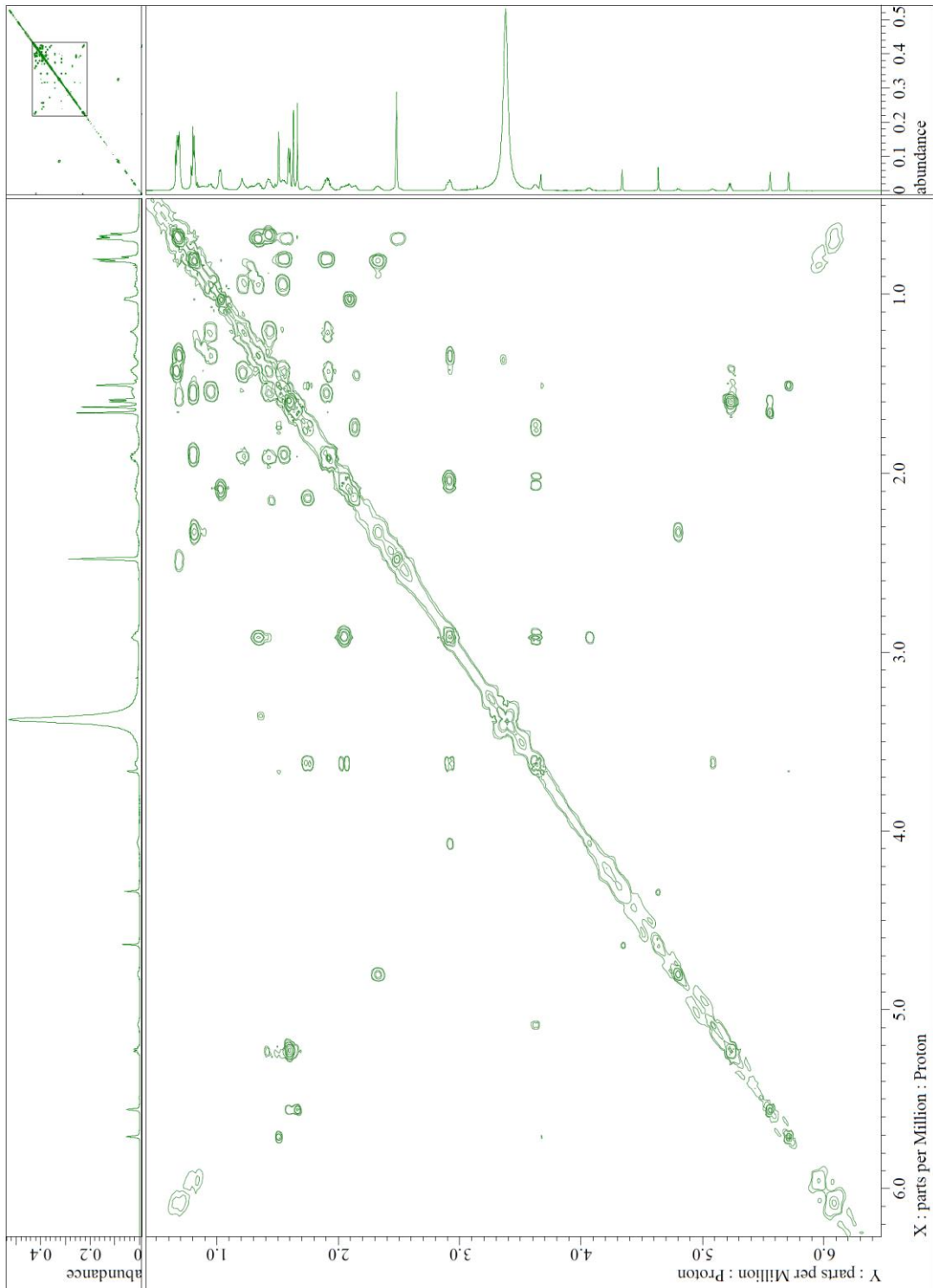
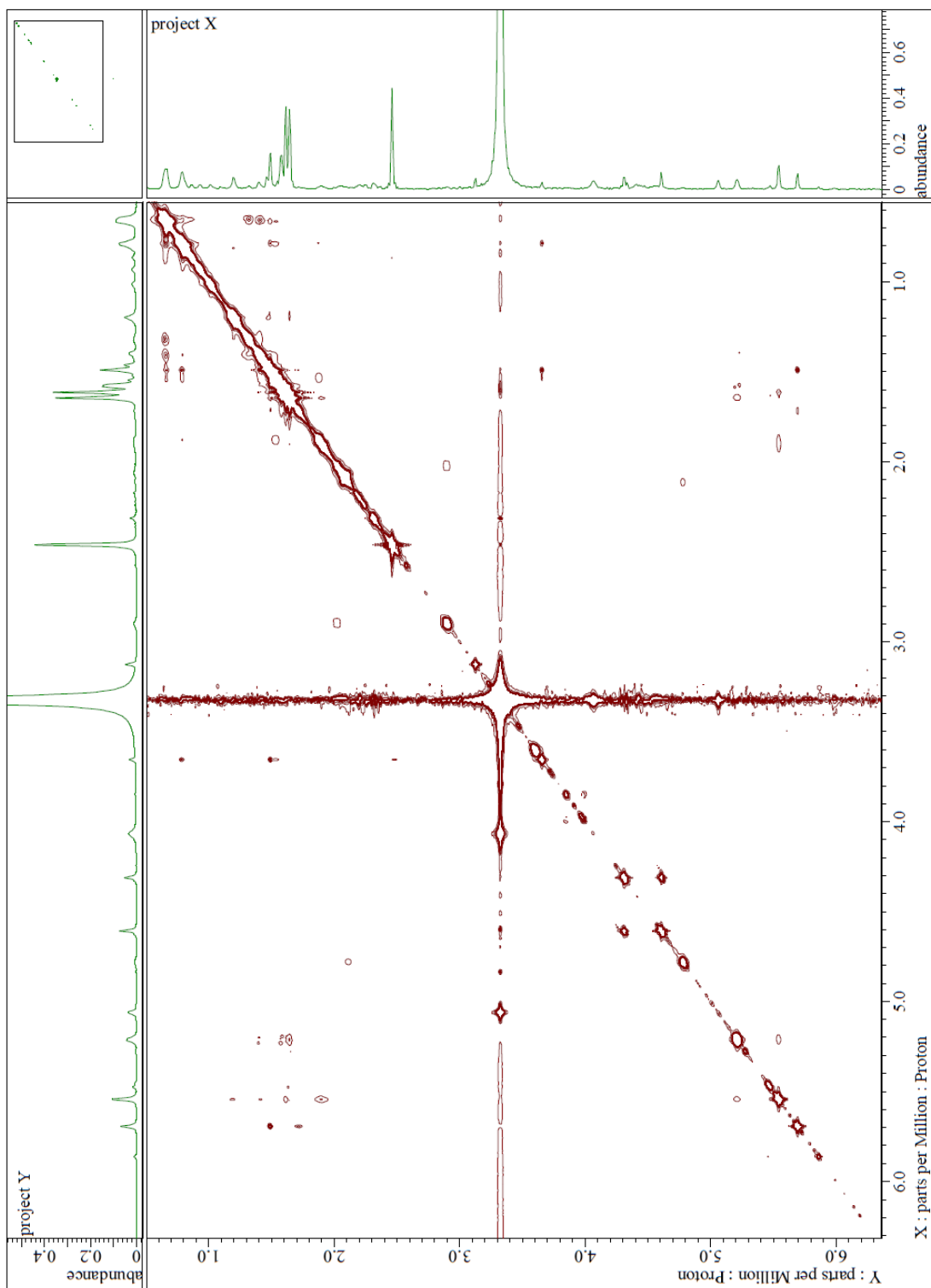


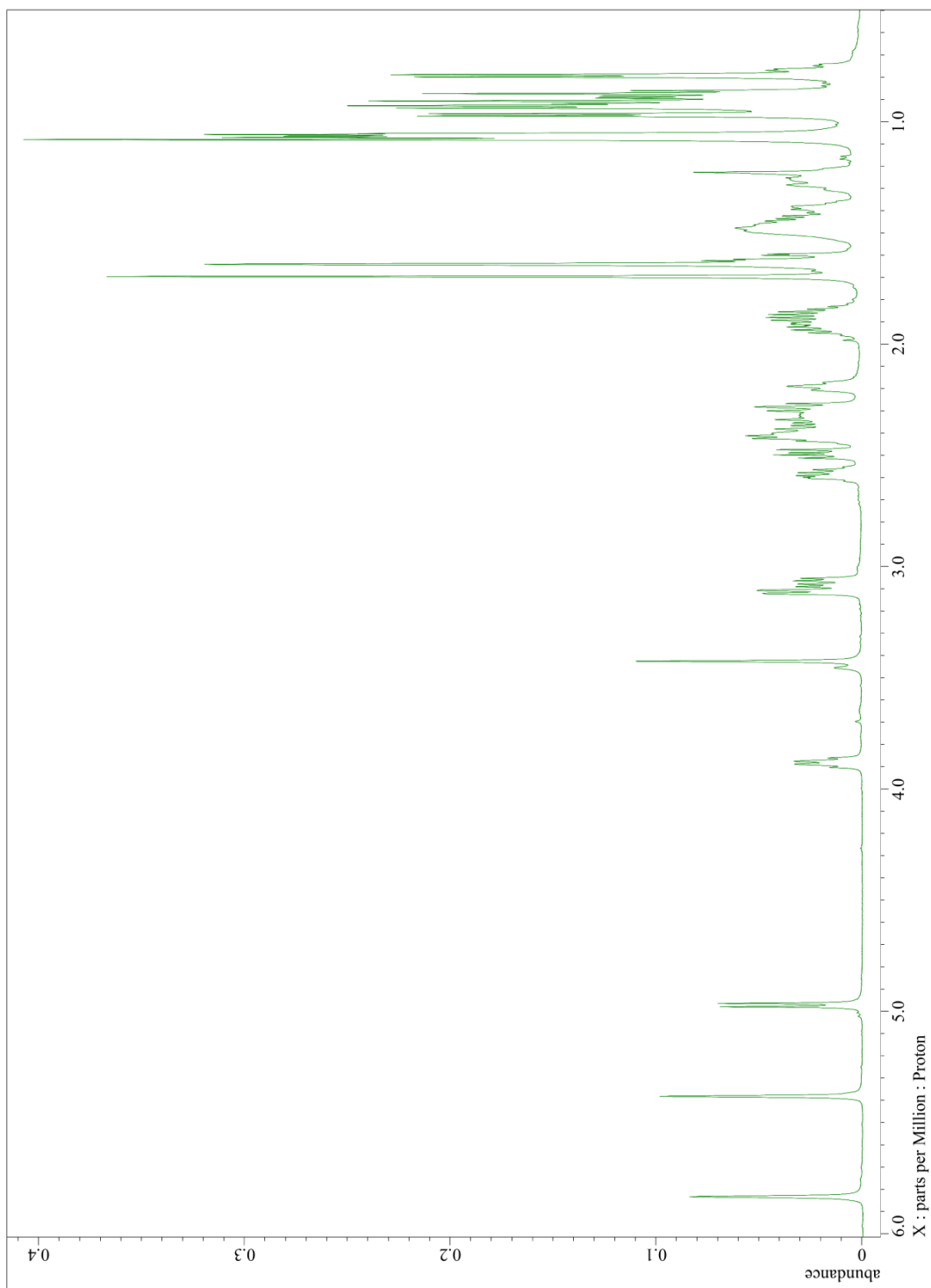
図 S-14 2 の HMBC (DMSO-*d*₆)



☒ S-15 2 の DQF-COSY (DMSO-*d*₆)



☒ S-16 2 の NOESY (DMSO- d_6)



☒ S-17 3 の $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)



図 18 3 の ^{13}C -NMR (CDCl_3)

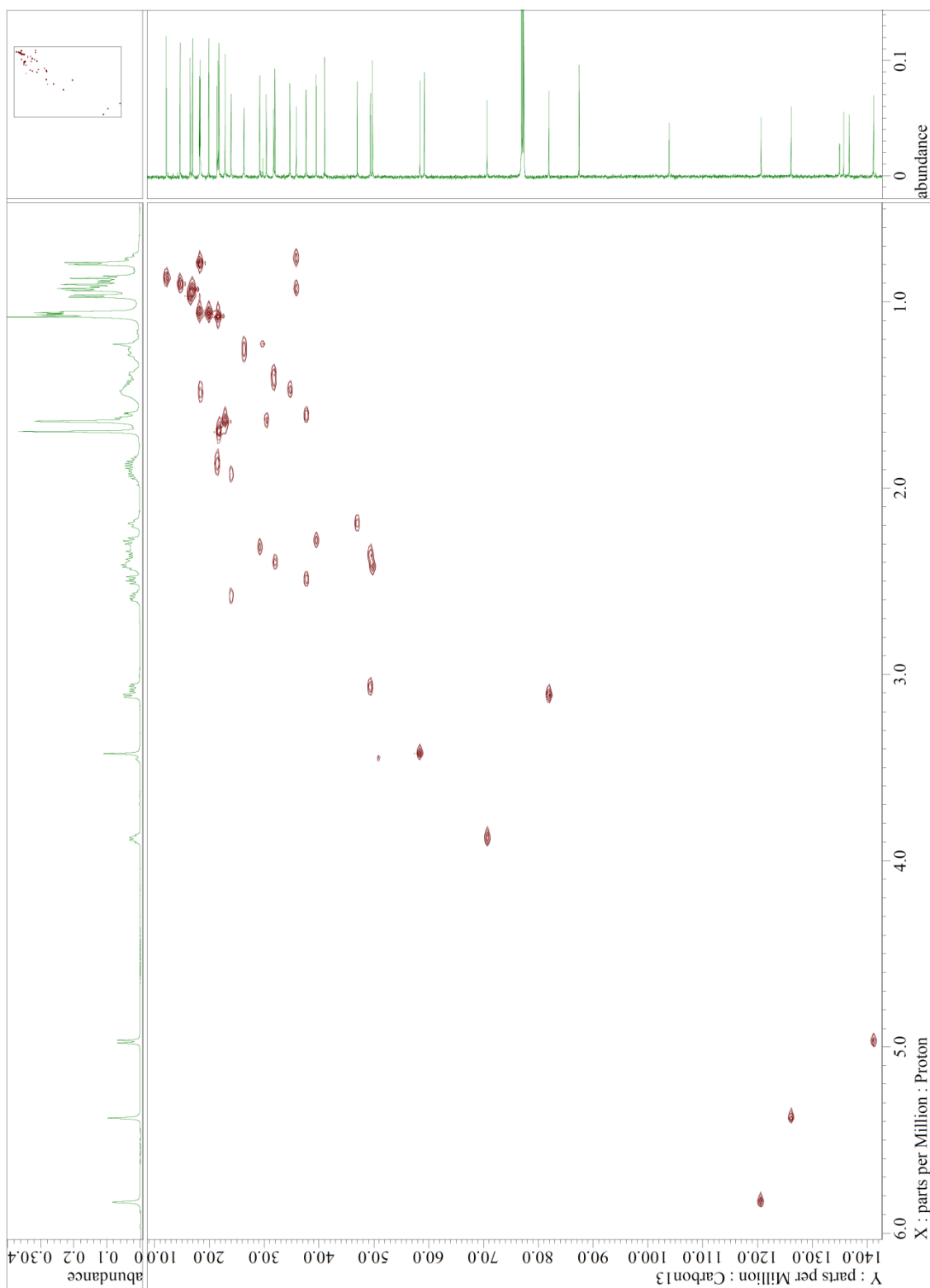


図 S-19 3 の HSQC (CDCl₃)

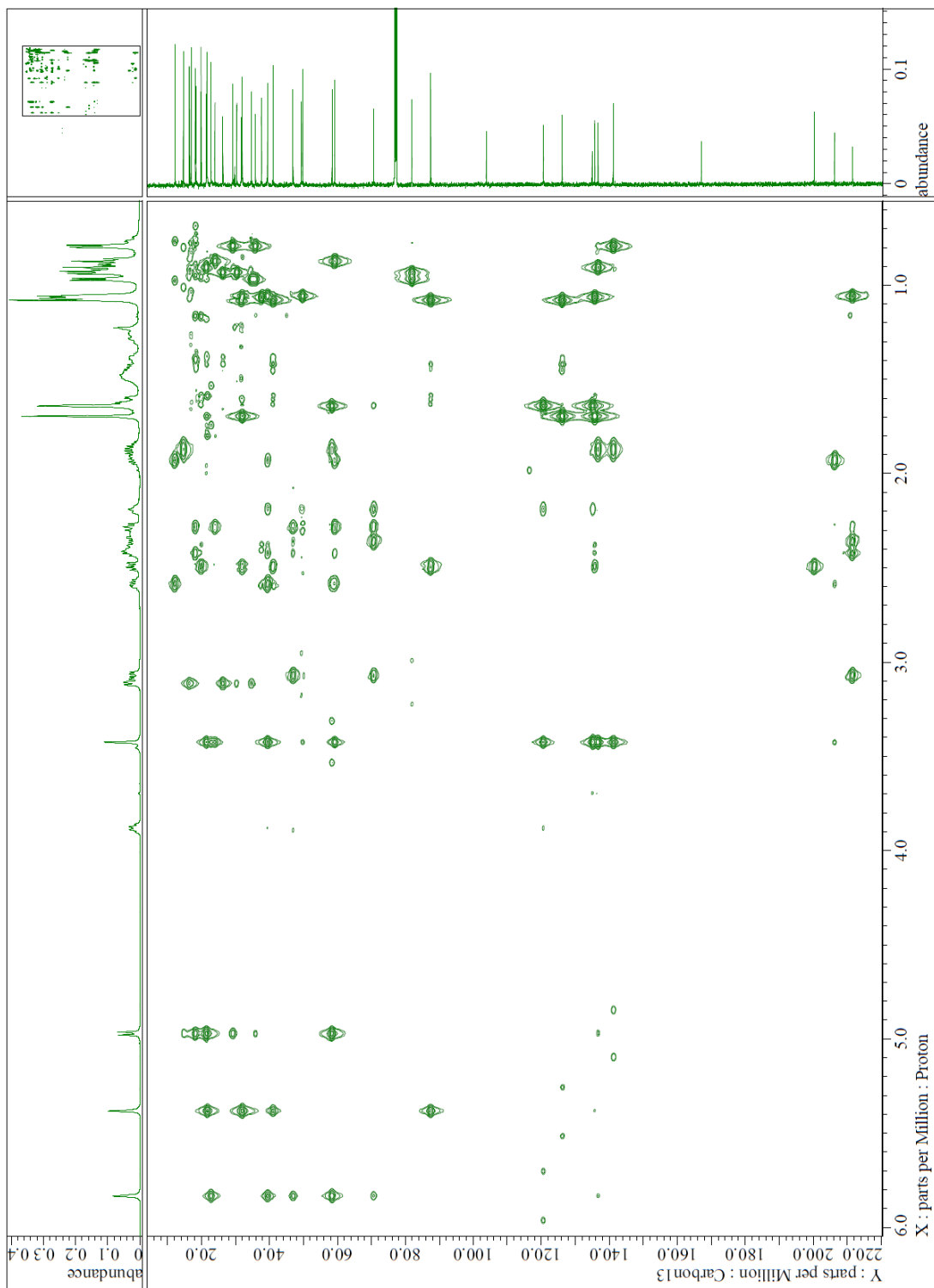
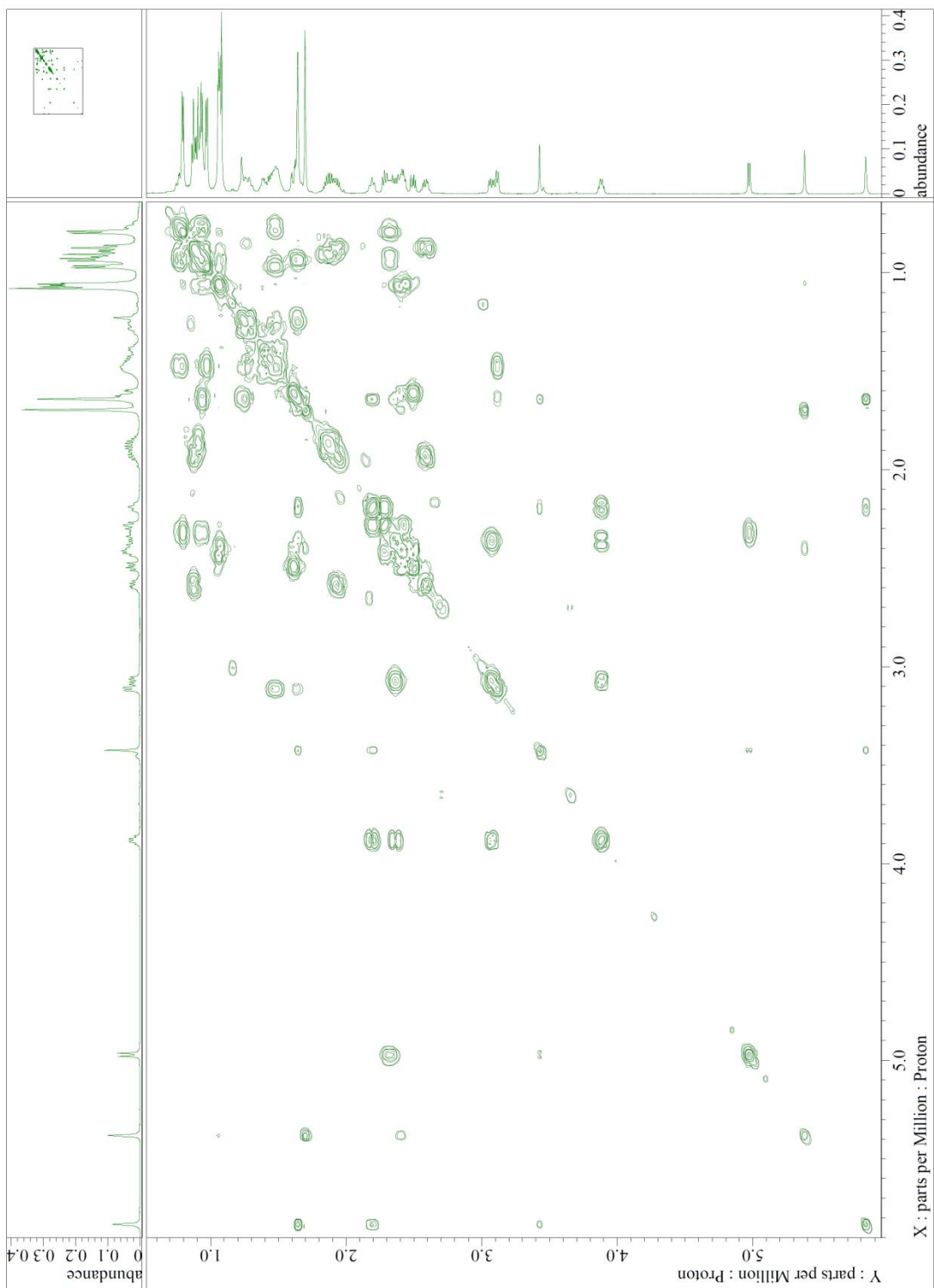


図 S-20 3 の HMBC (CDCl₃)



☒ S-21 3 の DQF-COSY (CDCl₃)

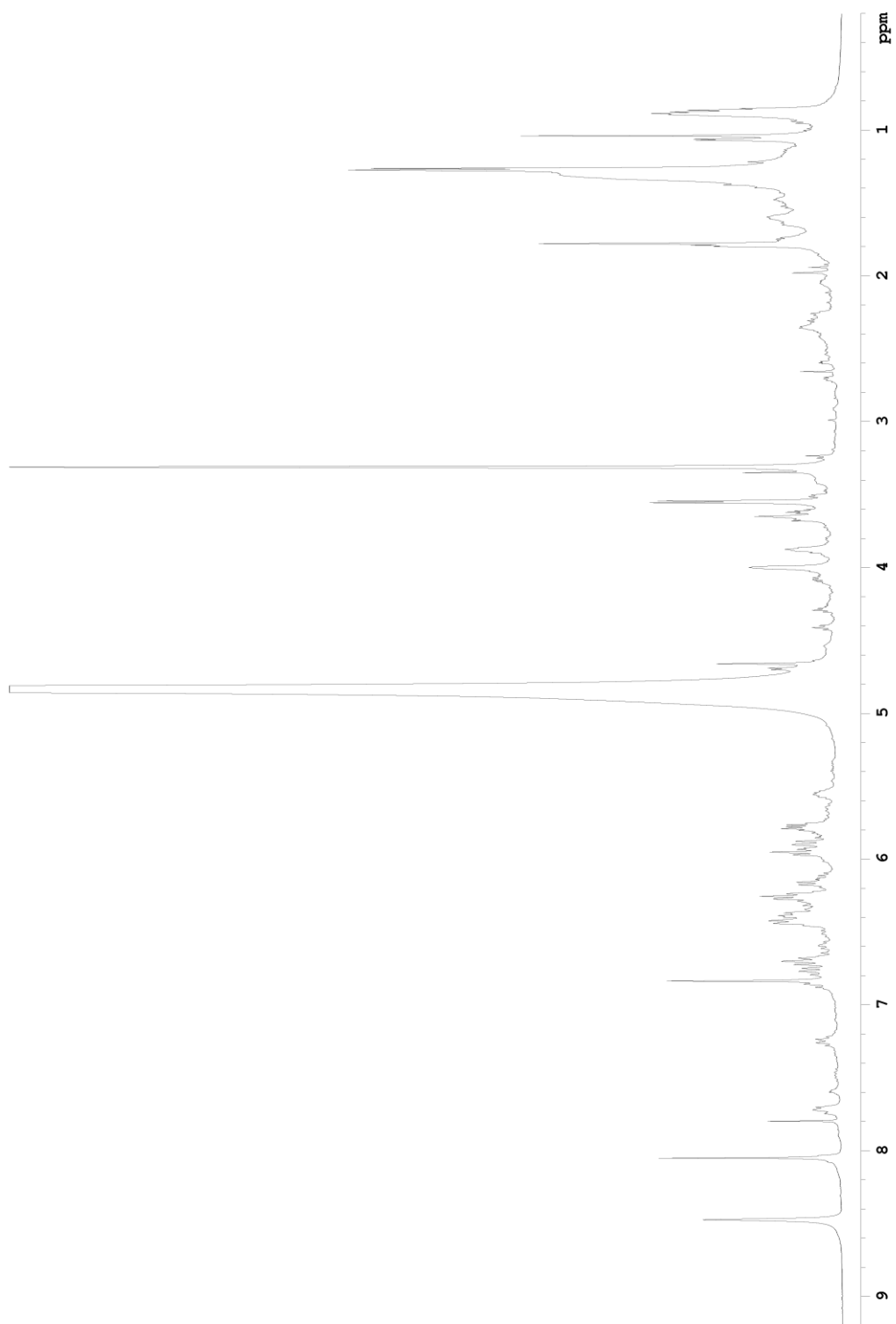


図 S-22 6 の ^1H NMR (CD_3OD)

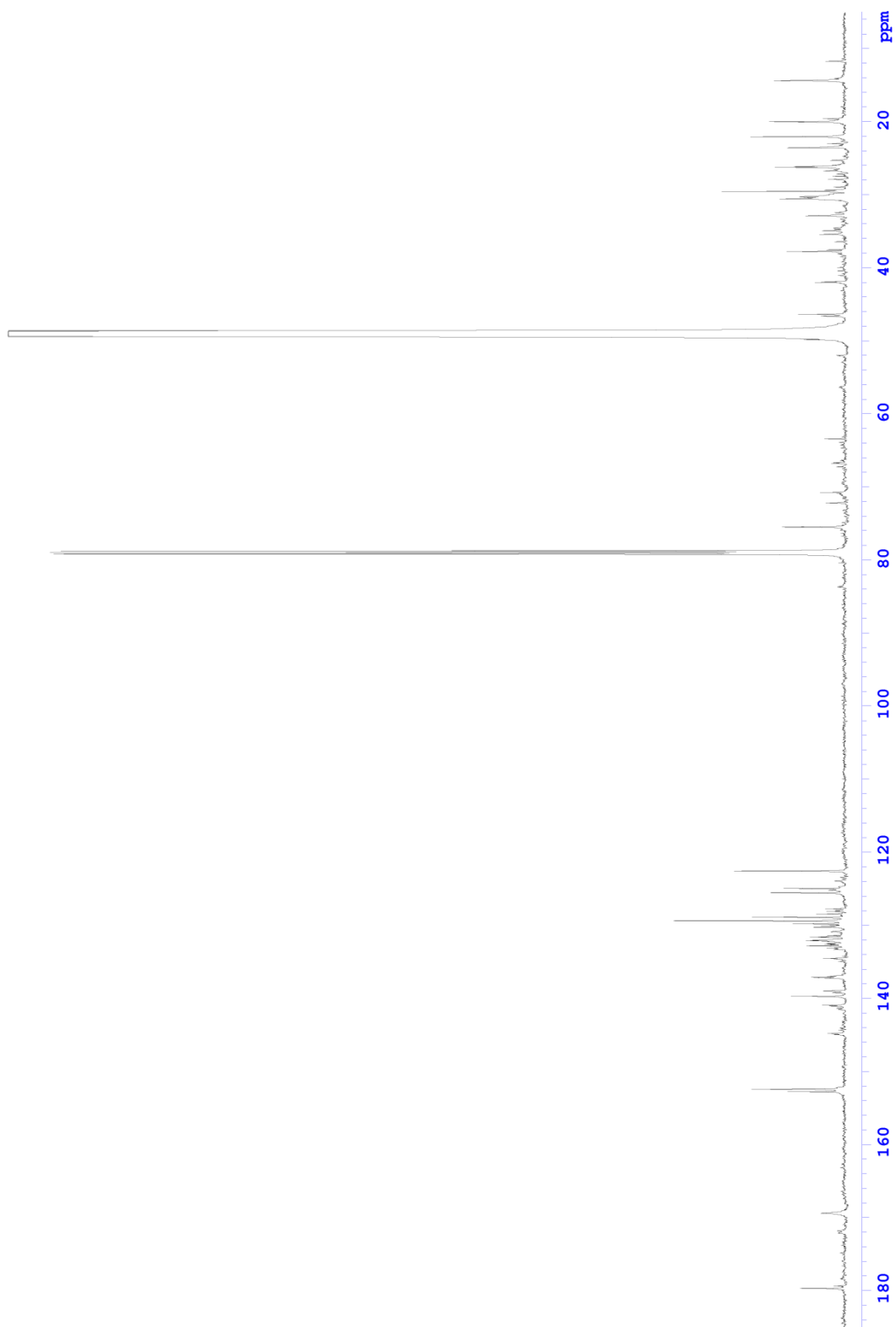
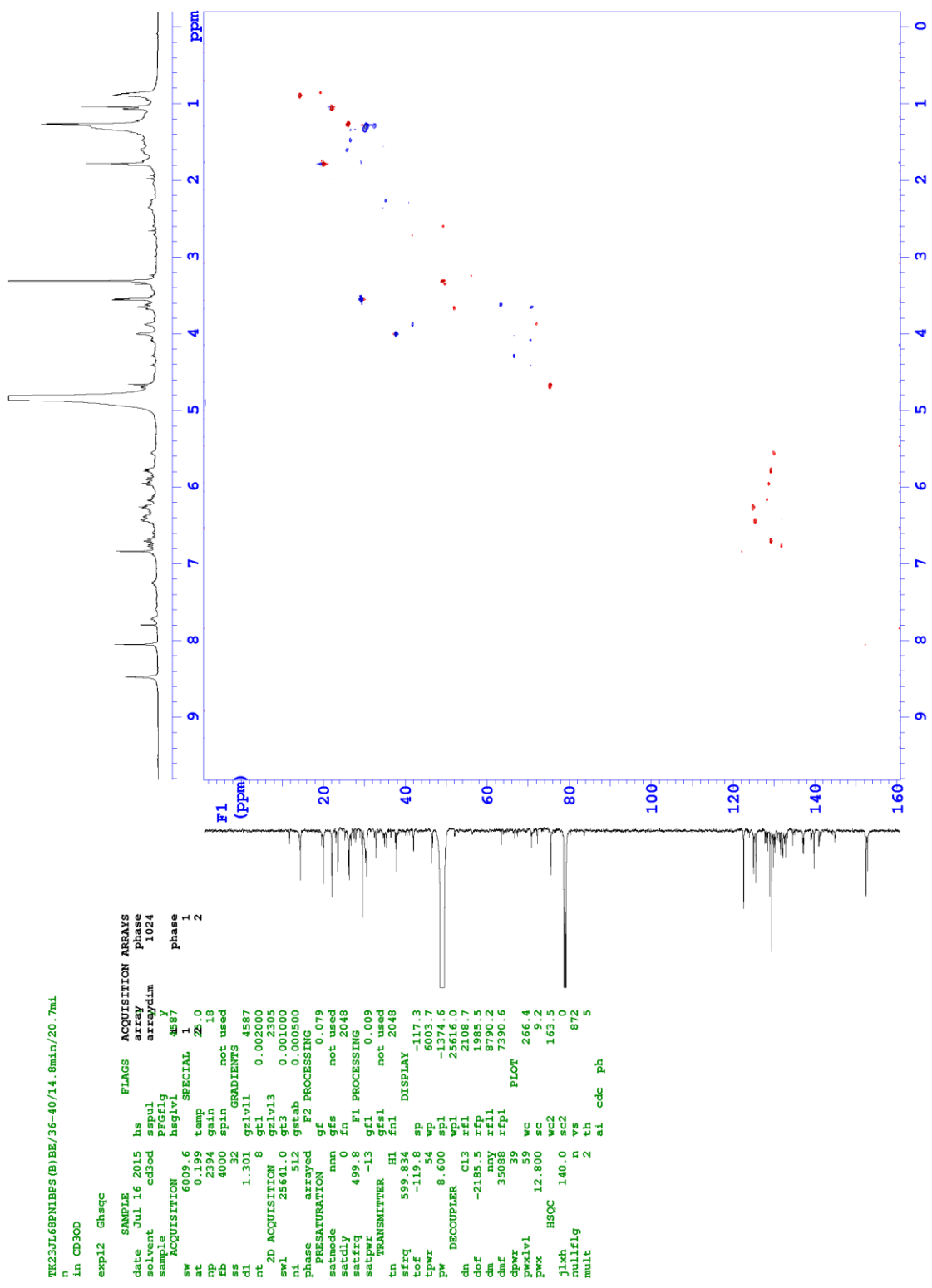


図 S-23 6 の ^{13}C NMR (CD_3OD)



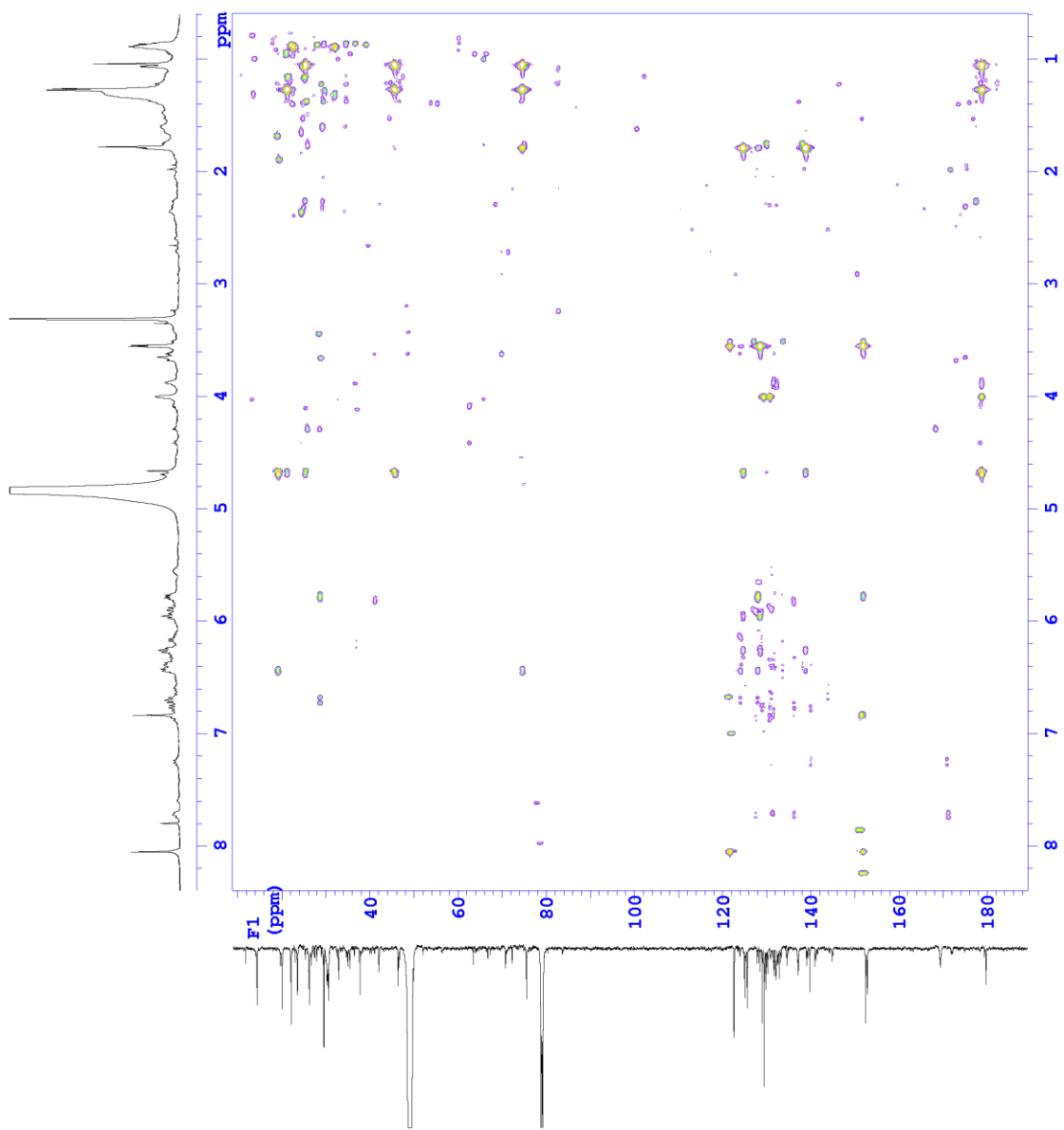
```

TK23JL68PHBS(B)BE/36-40/14.8min/20.7ml
n
in CD3OD
expl2 Ghsqc

SAMPLE          FLAGS ACQUISITION ARRAYS
date Jul 16 2015 hs array phase
solvent cd3od  spul arraydim 1024
sample          PFGflg
sw ACQUISITION hsglvt 4ES7 y phase
at 0.009 6 SPECIAL Zs 0 2
  0.199 temp 18
  2394 gain 18
  4000 spin not used
  32 GRADIENTS
  1.301 gzlv11 0.002000 4587
  8 gt1
  2D ACQUISITION gzlv13 2305
  25641.0 gt3 0.001000
  512 gstab 0.000500
  arrayed F2 PROCESSING
  PRESATURATION gf 0.079
  satmode mn not used
  satflg 499 8 F1 PROCESSING 248
  satpr -13 gf1 0.009 not used
  TRANSMITTER H1 fcn1 2048
  tn HI fcn1 DISPLAY -117.3
  sfrq 599.834 sp -119.8
  tof -119.8 wp 6003.7
  tpwr 54 wp -1374.6
  pw 8.600 sp1 25616.0
  dn DECOUPLER C13 wpl 2108.7
  dof -2185.5 rfp 895.5
  dmc 35088 fcl 7390.6
  dpr 39 PLOT 266.4
  pwxlvl 59 wc 9.2
  pmx 12.800 sc 163.5
  jlxh HSQC 140.0 wc2 872
  nullflg n vs 872
  mult 2 th ai cdc ph 5

```

☒ S-24 6 の HSQC (CD₃OD)

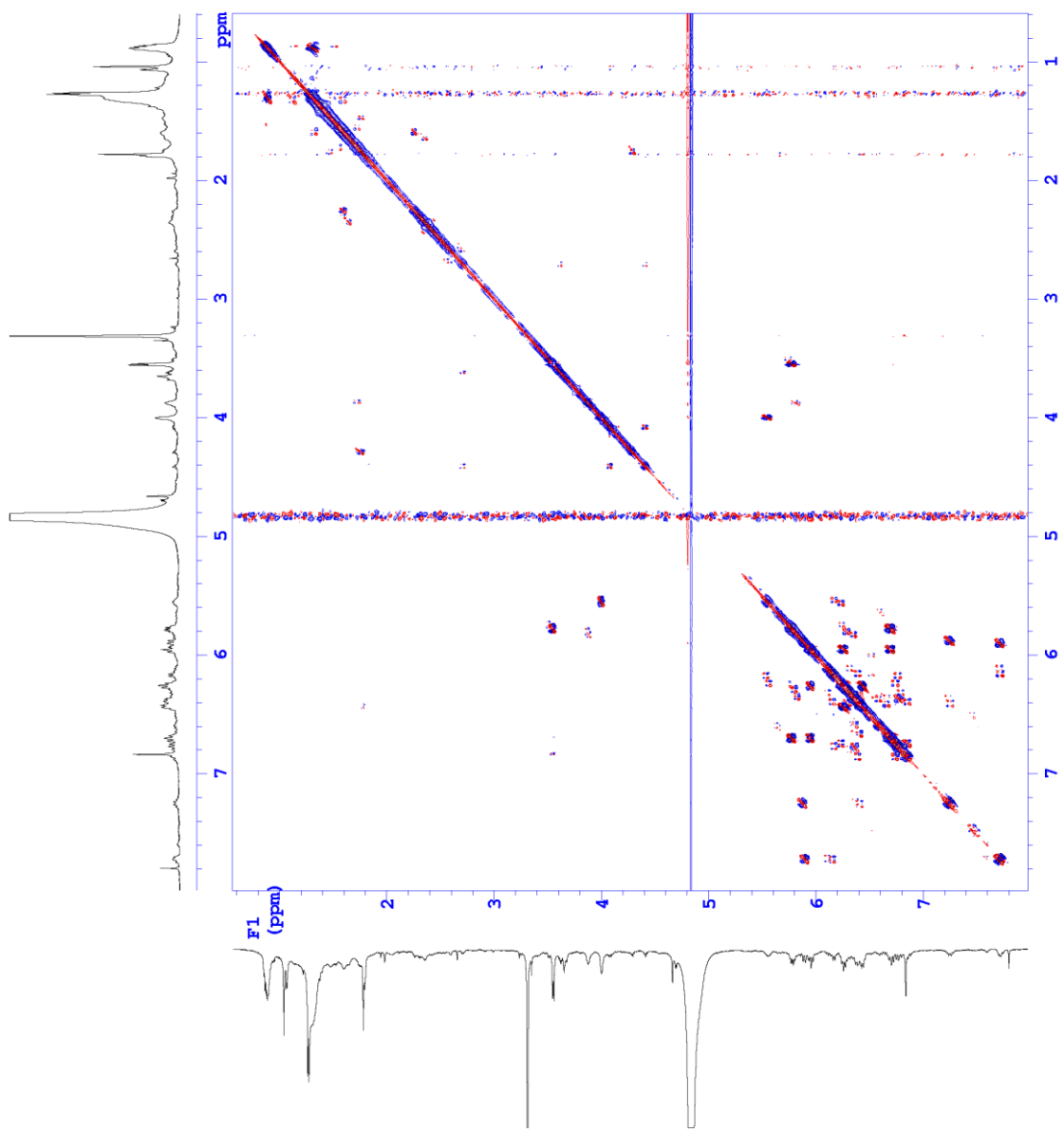


```

TK23JL68PHBS(B)BE/36-40/14.8min/20.7ml
n
in CD3OD
exp13 gmhbc_ct

SAMPLE          n
date Jul 16 2015 hs
solvent cd3od  n
sample         PFGflg y
ACQUISITION   hsglvt 4587
sw 6009.6     SPECIAL 25.0
at 0.128      temp
np 1538      gain
fb 4000      spin not used
ss 32        GRADIENTS
d1 1.000     gzlvl1 0.001000
nt 32        gzlvl3 0.001000
2D ACQUISITION gzlvl3 2305
sw1 36199.1  gtab 0.001000
ni 512       gtab 0.000500
Phase PRESATURATION 0 F2 PROCESSING
satmode mnn sb 0.064
satflg 499 8  f1 not used
satpr -13 sb1 F1 PROCESSING
TRANSMITTER -13 sb1 not used
tn HI f1 2048
sfrq 599.834 DISPLAY 356.0
tof -119.8 sp 4677.4
tpwr 54 wp 1343.1
pw 8.600 sp1 27184.7
dn DECOUPLER C13 r1 125.2
dof 2339.3 rfp 2262.0
dmf mnn r11 0
dmg 35088 r11 0
dpr 39 PLOT
pwxlvl 59 wc 266.4
pmx 12.800 sc 9.2
HMBC 140.0 wc2 163.5
j1xh 8.0 vs 328
jnxh 8.0 vs 328
ai cdc av
  
```

☒ S-25 6 の HMBC (CD₃OD)



```

TK23JL68PHBS (E)BE/36-40/14.8min/20.7ml
n
in CD3OD
exp10 Dqcoesy

SAMPLE          FLAGS
date Jul 16 2015 hs mn
solvent cd3od y
sample          y
PFGflg         y
hsglvt         4587
sw ACQUISITION SPECIAL 25.0
at 0.176 temp
np 2048 gain 18
fb 4000 spin not used
ss 32 F2 PROCESSING
dl 1.500 gf 0.079
nt 8 gfs not used
2D ACQUISITION fn 2048
sw1 6009.6 F1 PROCESSING
nl 512 gfl 0.039
tn TRANSMITTER H1 gfs1 not used
f1 599.834 f1l 2048
f1fz -119.4 sp DISPLAY 356.0
tpwr 54 wP 4430.9
pw 8.600 sP1 338.4
PRESATURATION wP1 4442.7
satmode nnn xfl 125.2
satpwr -13 rfp 0
satdly 0 rfl1 125.2
satfrq 499.8 rfp1 0
dn DECOUPLER C13 wc 218.0
dm nnn sc 10.0
wc2 218.0
sc2
ti 7228
tl al ph 5

```

☒ S-26 6 の DQF-COSY (CD₃OD)

参考文献

1. Berdy, J. (2005) Bioactive microbial metabolites - A personal view, *Journal of Antibiotics* **58**, 1-26.
2. Osbourn, A. (2010) Secondary metabolic gene clusters: evolutionary toolkits for chemical innovation, *Trends in Genetics* **26**, 449-457.
3. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Hopwood, D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Nature* **417**. 141-147.
4. Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M., and Omura, S. (2003) Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*, *Nature Biotechnology* **21**. 526-531.
5. Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., and Horinouchi, S. (2008) Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350, *Journal of Bacteriology* **190**. 4050-4060.
6. Cimermancic, P., Medema, M. H., Claesen, J., Kurita, K., Brown, L. C. W., Mavrommatis, K., Pati, A., Godfrey, P. A., Koehrsen, M., Clardy, J., Birren, B. W., Takano, E., Sali, A., Lington, R. G., and Fischbach, M. A. (2014) Insights into Secondary Metabolism from a Global Analysis of Prokaryotic Biosynthetic Gene Clusters, *Cell* **158**, 412-421.
7. Doroghazi, J. R., Albright, J. C., Goering, A. W., Ju, K.-S., Haines, R. R., Tchalukov, K. A., Labeda, D. P., Kelleher, N. L., and Metcalf, W. W. (2014) A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics, *Nature Chemical Biology* **10**, 963-968.
8. Scherlach, K., and Hertweck, C. (2006) Discovery of aspoquinolones A-D, prenylated quinoline-2-one alkaloids from *Aspergillus nidulans*, motivated by genome mining, *Organic & Biomolecular Chemistry* **4**, 3517-3520.
9. Gross, H., Stockwell, V. O., Henkels, M. D., Nowak-Thompson, B., Loper, J. E., and Gerwick, W. H. (2007) The genomisotopic approach: A systematic method to isolate products of orphan biosynthetic gene clusters, *Chemistry & Biology* **14**, 53-63.
10. Udvary, D. W., Zeigler, L., Asolkar, R. N., Singan, V., Lapidus, A., Fenical, W., Jensen, P. R., and Moore, B. S. (2007) Genome sequencing reveals complex secondary metabolome in the marine actinomycete *Salinispora tropica*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10376-10381.
11. McAlpine, J. B., Bachmann, B. O., Pirae, M., Tremblay, S., Alarco, A. M., Zazopoulos, E., and Farnet, C. M. (2005) Microbial Genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel

- antifungal agent, as an example, *Journal of Natural Products* **68**, 493-496.
12. Winter, J. M., Behnken, S., and Hertweck, C. (2011) Genomics-inspired discovery of natural products, *Current Opinion in Chemical Biology* **15**, 22-31.
 13. Medema, M. H., Cimermancic, P., Sali, A., Takano, E., and Fischbach, M. A. (2014) A Systematic Computational Analysis of Biosynthetic Gene Cluster Evolution: Lessons for Engineering Biosynthesis, *Plos Computational Biology* **10(12)**: e1004016.
 14. Feher, M., and Schmidt, J. M. (2003) Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry, *Journal of Chemical Information and Computer Sciences* **43**, 218-227.
 15. Newman, D. J. (2008) Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery?, *Journal of Medicinal Chemistry* **51**, 2589-2599.
 16. Arkin, M. R., and Wells, J. A. (2004) Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: Progressing towards the dream, *Nature Reviews Drug Discovery* **3**, 301-317.
 17. Veselovsky, A. V., and Archakov, A. I. (2007) Inhibitors of protein-protein interactions as potential drugs, *Current Computer-Aided Drug Design* **3**, 51-58.
 18. Sheng, C., Dong, G., Miao, Z., Zhang, W., and Wang, W. (2015) State-of-the-art strategies for targeting protein-protein interactions by small-molecule inhibitors, *Chemical Society Reviews* **44**, 8238-8259.
 19. Thiel, P., Kaiser, M., and Ottmann, C. (2012) Small-Molecule Stabilization of Protein-Protein Interactions: An Underestimated Concept in Drug Discovery?, *Angewandte Chemie-International Edition* **51**, 2012-2018.
 20. Aeluri, M., Chamakuri, S., Dasari, B., Guduru, S. K. R., Jimmidi, R., Jogula, S., and Arya, P. (2014) Small Molecule Modulators of Protein-Protein Interactions: Selected Case Studies, *Chemical Reviews* **114**, 4640-4694.
 21. Hertweck, C. (2009) The Biosynthetic Logic of Polyketide Diversity, *Angewandte Chemie-International Edition* **48**. 4688-4716
 22. Shen, B. (2003) Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms, *Current Opinion in Chemical Biology* **7**. 285-295.
 23. Moore, B. S., and Hertweck, C. (2002) Biosynthesis and attachment of novel bacterial polyketide synthase starter units, *Natural Product Reports* **19**, 70-99.
 24. Bisang, C., Long, P. F., Cortes, J., Westcott, J., Crosby, J., Matharu, A. L., Cox, R. J., Simpson, T. J., Staunton, J., and Leadley, P. F. (1999) A chain initiation factor common to both modular and aromatic polyketide synthases, *Nature* **401**. 502-505
 25. Long, P. F., Wilkinson, C. J., Bisang, C. P., Cortes, J., Dunster, N., Oliynyk, M., McCormick, E., McArthur, H., Mendez, C., Salas, J. A., Staunton, J., and Leadley, P. F. (2002) Engineering specificity of starter unit selection by the erythromycin-producing polyketide synthase, *Molecular Microbiology* **43**. 1215-1225
 26. Chan, Y. A., Podevels, A. M., Kevany, B. M., and Thomas, M. G. (2009) Biosynthesis of polyketide

- synthase extender units, *Natural Product Reports* **26**, 20097-20108.
27. Piel, J. (2010) Biosynthesis of polyketides by trans-AT polyketide synthases, *Natural Product Reports* **27**, 996-1047.
 28. He, J., and Hertweck, C. (2003) Iteration as programmed event during polyketide assembly; molecular analysis of the aureothin biosynthesis gene cluster, *Chemistry & Biology* **10**, 1225-1232.
 29. Tatsuno, S., Arakawa, K., and Kinashi, H. (2009) Extensive Mutational Analysis of Modular-Iterative Mixed Polyketide Biosynthesis of Lankacidin in *Streptomyces rochei*, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **73**, 2712-2719.
 30. Broadhurst, R. W., Nietlispach, D., Wheatcroft, M. P., Leadlay, P. F., and Weissman, K. J. (2003) The structure of docking domains in modular polyketide synthases, *Chemistry & Biology* **10**, 723-731.
 31. Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms, *Chemical Reviews* **106**, 3468-3496.
 32. Khosla, C., Tang, Y., Chen, A. Y., Schnarr, N. A., and Cane, D. E. (2007) Structure and mechanism of the 6-deoxyerythronolide B synthase, *Annual Review of Biochemistry* **76**, 195-221.
 33. Huang, S.-X., Yun, B.-S., Ma, M., Basu, H. S., Church, D. R., Ingenhorst, G., Huang, Y., Yang, D., Lohman, J. R., Tang, G.-L., Ju, J., Liu, T., Wilding, G., and Shen, B. (2015) Leinamycin E1 acting as an anticancer prodrug activated by reactive oxygen species, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 8278-8283.
 34. Galm, U., and Shen, B. (2006) Expression of biosynthetic gene clusters in heterologous hosts for natural product production and combinatorial biosynthesis, *Expert Opinion on Drug Discovery* **1**(5), 409-437
 35. Kim, U. J., Shizuya, H., Dejong, P. J., Birren, B., and Simon, M. I. (1992) Stable propagation of cosmid sized human DNA inserts in an F-factor based vector, *Nucleic Acids Research* **20**, 1083-1085.
 36. Shizuya, H., Birren, B., Kim, U. J., Mancino, V., Slepak, T., Tachiiri, Y., and Simon, M. (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 8794-8797.
 37. Feng, Z., Wang, L., Rajski, S. R., Xu, Z., Coeffet-LeGal, M. F., and Shen, B. (2009) Engineered production of iso-migrastatin in heterologous *Streptomyces* hosts, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **17**, 2147-2153.
 38. Alduina, R., and Gallo, G. (2012) Artificial Chromosomes to Explore and to Exploit Biosynthetic Capabilities of Actinomycetes, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 462049.
 39. Komatsu, M., Komatsu, K., Koiwai, H., Yarnada, Y., Kozone, I., Izumikawa, M., Hashimoto, J., Takagi, M., Omura, S., Shin-ya, K., Cane, D. E., and Ikeda, H. (2013) Engineered *Streptomyces avermitilis* Host for Heterologous Expression of Biosynthetic Gene Cluster for Secondary Metabolites, *Acs Synthetic Biology* **2**, 384-396.
 40. Julia, P., Xiang, L., Whiting, A., Mohammed, L., Gibson, T., Silva, C. J., Brian, P., Davies, J., Miao, V., Wrigley, S. K., and Baltz, R. H. (2006) Heterologous production of daptomycin in *Streptomyces lividans*,

- Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **33**, 121-128.
41. Baltz, R. H. (2009) Biosynthesis and genetic Engineering of lipopeptides in *Streptomyces roseosporus*, In *Complex Enzymes in Microbial Natural Product Biosynthesis, Part A: Overview Articles and Peptides*.
 42. Bertolotti, A., Zhang, Y. H., Hendershot, L. M., Harding, H. P., and Ron, D. (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response, *Nature Cell Biology* **2**, 326-332.
 43. Park, H. R., Furihata, K., Hayakawa, Y., and Shin-ya, K. (2002) Versipelostatin, a novel GRP78/Bip molecular chaperone down-regulator of microbial origin, *Tetrahedron Letters* **43**, 6941.
 44. Park, H. R., Chijiwa, S., Furihata, K., Hayakawa, Y., and Shin-Ya, K. (2007) Relative and absolute configuration of versipelostatin, a down-regulator of molecular chaperone GRP78 expression, *Organic Letters* **9**, 1457-1460.
 45. Nakamura, T., Okabe, M., Kashihara, Y., Sato, S., Furuno, A., Saitoh, S., Haga, N., Tsuruo, T., and Tornida, A. (2007) DNA microarray analysis of tumors in versipelostatin (VST) administered MKN74 xenograft nude mice, *Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting* **48**.
 46. Matsuo, J., Tsukumo, Y., Sakurai, J., Tsukahara, S., Park, H.-R., Shin-ya, K., Watanabe, T., Tsuruo, T., and Tomida, A. (2009) Preventing the unfolded protein response via aberrant activation of 4E-binding protein 1 by versipelostatin, *Cancer Science* **100**. 327-33
 47. Zhao, P., Ueda, J.-y., Kozono, I., Chijiwa, S., Takagi, M., Kudo, F., Nishiyama, M., Shin-ya, K., and Kuzuyama, T. (2009) New glycosylated derivatives of versipelostatin, the GRP78/Bip molecular chaperone down-regulator, from *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6, *Organic & Biomolecular Chemistry* **7**. 1454-60.
 48. Ueda, J.-y., Chijiwa, S., Takagi, M., and Shin-ya, K. (2008) A Novel Versipelostatin Analogue, Versipelostatin F Isolated from *Streptomyces versipellis* 4083-SVS6, *Journal of Antibiotics* **61**. 752-755
 49. Tanaka, H., Yoshizawa, A., Chijiwa, S., Ueda, J., Takagi, M., Shin-ya, K., and Takahashi, T. (2009) Efficient Synthesis of the Deoxysugar Part of Versipelostatin by Direct and Stereoselective Glycosylation and Revision of the Structure of the Trisaccharide Unit, *Chemistry an Asian Journal* **4**, 1114-1125.
 50. Kellersc.W, Muntwyle.R, Pache, W., and Zahner, H. (1969) Metabolic products of microorganisms chlorothricin and dechlorothricin, *Helvetica Chimica Acta* **52**, 127-142.
 51. Tomita, F., Tamaoki, T., Shirahata, K., Kasai, M., Morimoto, M., Ohkubo, S., Mineura, K., and Ishii, S. (1980) Novel Anti-tumor antibiotics, Tetrocarcins, *Journal of Antibiotics* **33**, 668-670.
 52. Waitz, J. A., Horan, A. C., Kalyanpur, M., Lee, B. K., Loebenberg, D., Marquez, J. A., Miller, G., and Patel, M. G. (1981) Kijanamicin (sch 25663) , A novel antibiotic produced by *Actinomadura kijaniata* SCC-1256 fermentation, isolation, characterization and biological properties, *Journal of Antibiotics* **34**, 1101-1106.
 53. Tsunakawa, M., Tenmyo, O., Tomita, K., Naruse, N., Kotake, C., Miyaki, T., Konishi, M., and Oki, T. (1992) Quartromicin, A Complex Of Novel Antiviral Antibiotics .1. Production, Isolation, Physicochemical Properties And Antiviral Activity, *Journal of Antibiotics* **45**, 180-188.
 54. Jiang, Z. D., Jensen, P. R., and Fenical, W. (1999) Lobophorins A and B, new antiinflammatory macrolides produced by a tropical marine bacterium, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **9**, 2003-2006.

55. Bister, B., Bischoff, D., Strobele, M., Riedlinger, J., Reicke, A., Wolter, F., Bull, A. T., Zahner, H., Fiedler, H. P., and Sussmuth, R. D. (2004) Abyssomicin C - A polycyclic antibiotic from a marine *Verrucosporia* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway, *Angewandte Chemie-International Edition* **43**, 2574-2576.
56. Nakashima, T., Miura, M., and Hara, W. (2000) Tetrocarcin A inhibits mitochondrial functions of Bcl-2 and suppresses its anti-apoptotic activity, *Cancer Research* **60**, 1229-1235.
57. Vieweg, L., Reichau, S., Schobert, R., Leadlay, P. F., and Sussmuth, R. D. (2014) Recent advances in the field of bioactive tetronates, *Natural Product Reports* **31**, 1554-1584.
58. Sun, Y. H., Hahn, F., Demydchuk, Y., Chettle, J., Tosin, M., Osada, H., and Leadlay, P. F. (2010) In vitro reconstruction of tetronate RK-682 biosynthesis, *Nature Chemical Biology* **6**, 99-101.
59. Kanchanabancha, C., Tao, W. X., Hong, H., Liu, Y. J., Hahn, F., Samborsky, M., Deng, Z. X., Sun, Y. H., and Leadlay, P. F. (2013) Unusual Acetylation-Elimination in the Formation of Tetronate Antibiotics, *Angewandte Chemie-International Edition* **52**, 5785-5788.
60. Demydchuk, Y., Sun, Y., Hong, H., Staunton, J., Spencer, J. B., and Leadlay, P. F. (2008) Analysis of the tetronomycin gene cluster: Insights into the biosynthesis of a polyether tetronate antibiotic, *Chembiochem* **9**, 1136-1145.
61. Fang, J., Zhang, Y. P., Huang, L. J., Jia, X. Y., Zhang, Q., Zhang, X., Tang, G. L., and Liu, W. (2008) Cloning and characterization of the tetrocarcin a gene cluster from *Micromonospora chalcone* NRRL 11289 reveals a highly conserved strategy for tetronate biosynthesis in spirotetronate antibiotics, *Journal of Bacteriology* **190**, 6014-6025.
62. Jia, X. Y., Tian, Z. H., Shao, L., Qu, X. D., Zhao, Q. F., Tang, J., Tang, G. L., and Liu, W. (2006) Genetic characterization of the chlorothricin gene cluster as a model for spirotetronate antibiotic biosynthesis, *Chemistry & Biology* **13**, 575-585.
63. Zhang, H., White-Phillip, J. A., Melancon, C. E., Kwon, H. J., Yu, W. L., and Liu, H. W. (2007) Elucidation of the kijanimicin gene cluster: Insights into the biosynthesis of spirotetronate antibiotics and nitrosugars, *Journal of the American Chemical Society* **129**, 14670-14683.
64. Gottardi, E. M., Krawczyk, J. M., von Suchodoletz, H., Schadt, S., Muhlenweg, A., Uguru, G. C., Pelzer, S., Fiedler, H. P., Bibb, M. J., Stach, J. E. M., and Sussmuth, R. D. (2011) Abyssomicin Biosynthesis: Formation of an Unusual Polyketide, Antibiotic-Feeding Studies and Genetic Analysis, *Chembiochem* **12**, 1401-1410.
65. He, H.-Y., Pan, H.-X., Wu, L.-F., Zhang, B.-B., Chai, H.-B., Liu, W., and Tang, G.-L. (2012) Quartromicin Biosynthesis: Two Alternative Polyketide Chains Produced by One Polyketide Synthase Assembly Line, *Chemistry & Biology* **19**, 1313-1323.
66. Li, S., Xiao, J., Zhu, Y., Zhang, G., Yang, C., Zhang, H., Ma, L., and Zhang, C. (2013) Dissecting Glycosylation Steps in Lobophorin Biosynthesis Implies an Iterative Glycosyltransferase, *Organic Letters* **15**, 1374-1377.

67. Snider, B. B., and Zou, Y. F. (2005) Synthesis of the carbocyclic skeleton of abyssomicins C and D, *Organic Letters* **7**, 4939-4941.
68. Zapf, C. W., Harrison, B. A., Drahl, C., and Sorensen, E. J. (2005) A Diels-Alder macrocyclization enables an efficient asymmetric synthesis of the antibacterial natural product abyssomicin C, *Angewandte Chemie-International Edition* **44**, 6533-6537.
69. Takeda, K., Igarashi, Y., Okazaki, K., Yoshii, E., and Yamaguchi, K. (1990) AN Intramolecular Diels-Alder Approach To The Synthesis of Chlorothricolide – synthesis of (±)-24-O-Methylchlorothricolide, *Journal of Organic Chemistry* **55**, 3431-3434.
70. Oikawa, H., and Tokiwano, T. (2004) Enzymatic catalysis of the Diels-Alder reaction in the biosynthesis of natural products, *Natural Product Reports* **21**, 321-352.
71. Wang, T., and Hoye, T. R. (2015) Diels-Alderase-free, bis-pericyclic, [4+2] dimerization in the biosynthesis of (±)-paracaseolide A, *Nat Chem* **7**, 641-645.
72. Oikawa, H., Katayama, K., Suzuki, Y., and Ichihara, A. (1995) Enzymatic-Activity Catalyzing Exo-Selective Diels-Alder Reaction in Solanapyrone Biosynthesis, *Journal of the Chemical Society-Chemical Communications*, 1321-1322.
73. Kasahara, K., Miyamoto, T., Fujimoto, T., Oguri, H., Tokiwano, T., Oikawa, H., Ebizuka, Y., and Fujii, I. (2010) Solanapyrone Synthase, a Possible Diels-Alderase and Iterative Type I Polyketide Synthase Encoded in a Biosynthetic Gene Cluster from *Alternaria solani*, *Chembiochem* **11**, 1245-1252.
74. Auclair, K., Sutherland, A., Kennedy, J., Witter, D. J., Van den Heever, J. P., Hutchinson, C. R., and Vederas, J. C. (2000) Lovastatin nonaketide synthase catalyzes an intramolecular Diels-Alder reaction of a substrate analogue, *Journal of the American Chemical Society* **122**, 11519-11520.
75. Ma, S. M., Li, J. W. H., Choi, J. W., Zhou, H., Lee, K. K. M., Moorthie, V. A., Xie, X., Kealey, J. T., Da Silva, N. A., Vederas, J. C., and Tang, Y. (2009) Complete Reconstitution of a Highly Reducing Iterative Polyketide Synthase, *Science* **326**, 589-592.
76. Oikawa, H., Yagi, K., Watanabe, K., Honma, M., and Ichihara, A. (1997) Biosynthesis of macrophomic acid: Plausible involvement of intermolecular Diels-Alder reaction, *Chemical Communications*, 97-98.
77. Watanabe, K., Mie, T., Ichihara, A., Oikawa, H., and Honma, M. (2000) Detailed reaction mechanism of macrophomate synthase - Extraordinary enzyme catalyzing five-step transformation from 2-pyrones to benzoates, *Journal of Biological Chemistry* **275**, 38393-38401.
78. Ose, T., Watanabe, K., Mie, T., Honma, M., Watanabe, H., Yao, M., Oikawa, H., and Tanaka, I. (2003) Insight into a natural Diels-Alder reaction from the structure of macrophomate synthase, *Nature* **422**, 185-189.
79. Guimaraes, C. R. W., Udier-Blagovic, M., and Jorgensen, W. L. (2005) Macrophomate synthase: QM/MM simulations address the Diels-Alder versus Michael-Aldol reaction mechanism, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 3577-3588.
80. Serafimov, J. M., Gillingham, D., Kuster, S., and Hilvert, D. (2008) The putative Diels-Alderase

- macrophomate synthase is an efficient aldolase, *Journal of the American Chemical Society* **130**, 7798-7799.
81. Kim, R.-R., Illarionov, B., Joshi, M., Cushman, M., Lee, C. Y., Eisenreich, W., Fischer, M., and Bacher, A. (2010) Mechanistic Insights on Riboflavin Synthase Inspired by Selective Binding of the 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazine Exomethylene Anion, *Journal of the American Chemical Society* **132**, 2983-2990.
 82. Kim, H. J., Rusczycky, M. W., Choi, S.-h., Liu, Y.-n., and Liu, H.-w. (2011) Enzyme-catalysed [4+2] cycloaddition is a key step in the biosynthesis of spinosyn A, *Nature* **473**, 109-112.
 83. Yates, P., and Eaton, P. (1960) Acceleration of the Diels-Alder Reaction by Aluminum Chloride, *Journal of the American Chemical Society* **82**, 4436-4437.
 84. Kim, H. J., Rusczycky, M. W., and Liu, H.-w. (2012) Current developments and challenges in the search for a naturally selected Diels-Alderase, *Current Opinion in Chemical Biology* **16**, 124-131.
 85. Gordeev, E. G., and Ananikov, V. P. (2015) Computational Study of a Model System of Enzyme-Mediated [4+2] Cycloaddition Reaction, *Plos One* **10**. e0119984.
 86. Omura, S., Ootoguro, K., Nishikiori, T., Oiwa, R., and Iwai, Y. (1981) Setamycin, A New Antibiotic, *Journal of Antibiotics* **34**, 1253-1256.
 87. Werner, G., Hagenmaier, H., Albert, K., Kohlshorn, H., and Drautz, H. (1983) The structure of the bafilomycins – a new group of macrolide antibiotics, *Tetrahedron Letters* **24**, 5193-5196.
 88. Furuchi, T., Aikawa, K., Arai, H., and Inoue, K. (1993) Bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type H(+)-ATPase, blocks lysosomal cholesterol trafficking in macrophages., *J Biol Chem* **268**, 27345-27348.
 89. Dröse, S., and Altendorf, K. (1997) Bafilomycins and concanamycins as inhibitors of V-ATPases and P-ATPases., *J Exp Biol* **200**, 1-8.
 90. Osteresch, C., Bender, T., Grond, S., von Zezschwitz, P., Kunze, B., Jansen, R., Huss, M., and Wiczorek, H. (2012) The Binding Site of the V-ATPase Inhibitor Apicularen Is in the Vicinity of Those for Bafilomycin and Archazolid, *Journal of Biological Chemistry* **287**, 31866-31876.
 91. Werner, G., Hagenmaier, H., Drautz, H., Baumgartner, A., and Zahner, H. (1984) Metabolic products of microorganisms bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics production, isolation, chemical-structure and biological-activity, *Journal of Antibiotics* **37**, 110-117.
 92. Ichikawa, N., Oguchi, A., Ikeda, H., Ishikawa, J., Kitani, S., Watanabe, Y., Nakamura, S., Katano, Y., Kishi, E., Sasagawa, M., Ankai, A., Fukui, S., Hashimoto, Y., Kamata, S., Ootoguro, M., Tanikawa, S., Nihira, T., Horinouchi, S., Ohnishi, Y., Hayakawa, M., Kuzuyama, T., Arisawa, A., Nomoto, F., Miura, H., Takahashi, Y., and Fujita, N. (2010) Genome Sequence of *Kitasatospora setae* NBRC 14216(T): An Evolutionary Snapshot of the Family Streptomycetaceae, *DNA Research* **17**, 393-406.
 93. Hwang, J. Y., Kim, H. S., Kim, S. H., Oh, H. R., and Nam, D. H. (2013) Organization and characterization of a biosynthetic gene cluster for bafilomycin from *Streptomyces griseus* DSM 2608, *Amb Express* **3**. 24
 94. Zhang, W., Fortman, J. L., Carlson, J. C., Yan, J., Liu, Y., Bai, F., Guan, W., Jia, J., Matainaho, T., Sherman,

- D. H., and Li, S. (2013) Characterization of the Bafilomycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces lohii*, *Chembiochem* **14**, 301-306.
95. 沼田淳. (2009) 修士論文 遺伝子情報を利用した放線菌二次代謝産物の生合成に関する研究.
96. Zhang, W. J., Bolla, M. L., Kahne, D., and Walsh, C. T. (2010) A Three Enzyme Pathway for 2-Amino-3-hydroxycyclopent-2-enone Formation and Incorporation in Natural Product Biosynthesis, *Journal of the American Chemical Society* **132**, 6402-6411.
97. Haydock, S. F., Aparicio, J. F., Molnar, I., Schwecke, T., Khaw, L. E., Konig, A., Marsden, A. F. A., Galloway, I. S., Staunton, J., and Leadlay, P. F. (1995) Divergent Sequence Motifs Correlated With The Substrate-Specificity Of (Methyl)malonyl-coa-acyl Carrier Protein Transacylase Domains In Modular Polyketide Syntheses, *FEBS Letters* **374**, 246-248.
98. Reeves, C. D., Murli, S., Ashley, G. W., Piagentini, M., Hutchinson, C. R., and McDaniel, R. (2001) Alteration of the substrate specificity of a modular polyketide synthase acyltransferase domain through site-specific mutations, *Biochemistry* **40**, 15464-15470.
99. Keatinge-Clay, A. T. (2007) A tylosin ketoreductase reveals how chirality is determined in polyketides, *Chemistry & Biology* **14**, 898-908.
100. Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D. V., Hutchinson, C. R., and McDaniel, R. (2003) A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases, *Biochemistry* **42**, 72-79.
101. Kwan, D. H., Sun, Y., Schulz, F., Hong, H., Popovic, B., Sim-Stark, J. C. C., Haydock, S. F., and Leadlay, P. F. (2008) Prediction and Manipulation of the Stereochemistry of Enoylreduction in Modular Polyketide Synthases, *Chemistry & Biology* **15**, 1231-1240.
102. Kim, H. J., White-Phillip, J. A., Ogasawara, Y., Shin, N., Isiorho, E. A., and Liu, H.-w. (2010) Biosynthesis of Spinosyn in *Saccharopolyspora spinosa*: Synthesis of Permethylated Rhamnose and Characterization of the Functions of SpnH, SpnI, and SpnK, *Journal of the American Chemical Society* **132**, 2901-+.
103. Bauer, N. J., Kreuzman, A. J., Dotzlar, J. E., and Yeh, W. K. (1988) Purification, characterization, and kinetic mechanism of S-adenosyl-L-methionine – macrocin O-methyltransferase from *Streptomyces fradiae*, *Journal of Biological Chemistry* **263**, 15619-15625.
104. Akey, D. L., Li, S., Konwerski, J. R., Confer, L. A., Bernard, S. M., Anzai, Y., Kato, F., Sherman, D. H., and Smith, J. L. (2011) A New Structural Form in the SAM/Metal-Dependent O-Methyltransferase Family: MycE from the Mycinamicin Biosynthetic Pathway, *Journal of Molecular Biology* **413**, 438-450.
105. Wohlert, S. E., Lomovskaya, N., Kulowski, K., Fonstein, L., Occi, J. L., Gewain, K. M., MacNeil, D. J., and Hutchinson, C. R. (2001) Insights about the biosynthesis of the avermectin deoxysugar L-oleandrose through heterologous expression of *Streptomyces avermitilis* deoxysugar genes in *Streptomyces lividans*, *Chemistry & Biology* **8**, 681-700.
106. Aguirrezabalaga, I., Olano, C., Allende, N., Rodriguez, L., Brana, A. F., Mendez, C., and Salas, J. A. (2000) Identification and expression of genes involved in biosynthesis of L-oleandrose and its intermediate

- L-olivose in the oleandomycin producer *Streptomyces antibioticus*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 1266-1275.
107. Rodriguez, L., Rodriguez, D., Olano, C., Brana, A. F., Mendez, C., and Salas, J. A. (2001) Functional analysis of oleY L-oleandrosyl 3-O-methyltransferase of the oleandomycin biosynthetic pathway in *Streptomyces antibioticus*, *Journal of Bacteriology* **183**, 5358-5363.
 108. Hashimoto, T., Hashimoto, J., Teruya, K., Hirano, T., Shin-ya, K., Ikeda, H., Liu, H.-w., Nishiyama, M., and Kuzuyama, T. (2015) Biosynthesis of Versipelostatin: Identification of an Enzyme-Catalyzed [4+2]-Cycloaddition Required for Macrocyclization of Spirotetronate-Containing Polyketides, *Journal of the American Chemical Society* **137**, 572-575.
 109. Nah, H. J., Woo, M. W., Choi, S. S., and Kim, E. S. (2015) Precise cloning and tandem integration of large polyketide biosynthetic gene cluster using *Streptomyces* artificial chromosome system, *Microbial Cell Factories* **14**. 140
 110. Yin, J., Hoffmann, M., Bian, X., Tu, Q., Yan, F., Xia, L., Ding, X., Stewart, A. F., Mueller, R., Fu, J., and Zhang, Y. (2015) Direct cloning and heterologous expression of the salinomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces albus* DSM41398 in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Scientific Reports* **5**. 15081
 111. Alexander, D. C., Rock, J., He, X., Brian, P., Miao, V., and Baltz, R. H. (2010) Development of a Genetic System for Combinatorial Biosynthesis of Lipopeptides in *Streptomyces fradiae* and Heterologous Expression of the A54145 Biosynthesis Gene Cluster, *Applied and Environmental Microbiology* **76**. 6877-6887
 112. Bernard, S. M., Akey, D. L., Tripathi, A., Park, S. R., Konwerski, J. R., Anzai, Y., Li, S., Kato, F., Sherman, D. H., and Smith, J. L. (2015) Structural Basis of Substrate Specificity and Regiochemistry in the MycF/TyIF Family of Sugar O-Methyltransferases, *Acs Chemical Biology* **10**, 1340-1351.
 113. Luzhetskyy, A., Vente, A., and Bechthold, A. (2005) Glycosyltransferases involved in the biosynthesis of biologically active natural products that contain oligosaccharides, *Molecular Biosystems* **1**, 117-126.
 114. Hamano, Y., Maruyama, C., and Kimoto, H. (2006) Construction of a Knockout Mutant of the Streptothricin-Resistance Gene in *Streptomyces albulus* by Electroporation, *Actinomycetologica* **20**, 35-41.
 115. Xiao, J., Zhang, Q., Zhu, Y., Li, S., Zhang, G., Zhang, H., Saurav, K., and Zhang, C. (2013) Characterization of the sugar-O-methyltransferase LobS1 in lobophorin biosynthesis, *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**, 9043-9053.
 116. Zhang, C. S., Albermann, C., Fu, X., and Thorson, J. S. (2006) The in vitro characterization of the iterative avermectin glycosyltransferase AveBI reveals reaction reversibility and sugar nucleotide flexibility, *Journal of the American Chemical Society* **128**, 16420-16421.
 117. Luzhetskyy, A., Fedoryshyn, M., Durr, C., Taguchi, T., Novikov, V., and Bechthold, A. (2005) Iteratively acting glycosyltransferases involved in the hexasaccharide biosynthesis of landomycin A, *Chemistry & Biology* **12**, 725-729.
 118. Terui, Y., Sakazaki, R., and Shoji, J. (1990) Structure of Agglomerins, *Journal of Antibiotics* **43**, 1245-1253.

119. Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A., and Noel, J. P. (2000) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase, *Biochemistry* **39**, 890-902.
120. Hess, B. A., Jr., and Smentek, L. (2012) Concerted, highly asynchronous, enzyme-catalyzed [4+2] cycloaddition in the biosynthesis of spinosyn A; computational evidence, *Organic & Biomolecular Chemistry* **10**, 7503-7509.
121. Tian, Z., Sun, P., Yan, Y., Wu, Z., Zheng, Q., Zhou, S., Zhang, H., Yu, F., Jia, X., Chen, D., Mandi, A., Kurtan, T., and Liu, W. (2015) An enzymatic [4+2] cyclization cascade creates the pentacyclic core of pyrroindomycins, *Nature Chemical Biology* **11**, 259-265.
122. Fage, C. D., Isiorho, E. A., Liu, Y. N., Wagner, D. T., Liu, H. W., and Keatinge-Clay, A. T. (2015) The structure of SpnF, a standalone enzyme that catalyzes [4+2] cycloaddition, *Nature Chemical Biology* **11**, 256-258.
123. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode, *Macromolecular Crystallography, Pt A* **276**, 307-326.
124. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **66**, 213-221.
125. Grosse-Kunstleve, R. W., and Adams, P. D. (2003) Substructure search procedures for macromolecular structures, *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **59**, 1966-1973.
126. Hamberg, M. (1988) Biosynthesis of 12-oxo-10,15(Z)-phytodienoic acid – Identification of an allene oxide cyclase, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **156**, 543-550.
127. Hofmann, E., Zerbe, P., and Schaller, F. (2006) The crystal structure of *Arabidopsis thaliana* allene oxide cyclase: Insights into the oxylipin cyclization reaction, *Plant Cell* **18**, 3201-3217.
128. Flower, D. R. (1996) The lipocalin protein family: Structure and function, *Biochemical Journal* **318**, 1-14.
129. Zhao, C., Coughlin, J. M., Ju, J., Zhu, D., Wendt-Pienkowski, E., Zhou, X., Wang, Z., Shen, B., and Deng, Z. (2010) Oxazolomycin Biosynthesis in *Streptomyces albus* JA3453 Featuring an "Acyltransferase-less" Type I Polyketide Synthase That Incorporates Two Distinct Extender Units, *Journal of Biological Chemistry* **285**, 20097-20108.
130. Wakimoto, T., Egami, Y., Nakashima, Y., Wakimoto, Y., Mori, T., Awakawa, T., Ito, T., Kenmoku, H., Asakawa, Y., Piel, J., and Abe, I. (2014) Calyculin biogenesis from a pyrophosphate protoxin produced by a sponge symbiont, *Nature Chemical Biology* **10**, 648-655.
131. Piel, J. (2002) A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14002-14007.

132. Dunn, M. F., Aguilar, V., Brzovic, P., Drewe, W. F., Houben, K. F., Leja, C. A., and Roy, M. (1990) The Tryptophan Synthase Bienzyme Complex Transfers Indole Between The Alpha-Sites And Beta-Sites Via A 25-30 A Long Tunnel, *Biochemistry* **29**, 8598-8607.
133. Thoden, J. B., Holden, H. M., Wesenberg, G., Raushel, F. M., and Rayment, I. (1997) Structure of carbamoyl phosphate synthetase: A journey of 96 angstrom from substrate to product, *Biochemistry* **36**, 6305-6316.
134. Bauler, P., Huber, G., Leyh, T., and McCammon, J. A. (2010) Channeling by Proximity: The Catalytic Advantages of Active Site Colocalization Using Brownian Dynamics, *Journal of Physical Chemistry Letters* **1**, 1332-1335.
135. Huang, X. Y., Holden, H. M., and Raushel, F. M. (2001) Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions, *Annual Review of Biochemistry* **70**, 149-180.
136. Schmelz, S., and Naismith, J. H. (2009) Adenylate-forming enzymes, *Current Opinion in Structural Biology* **19**, 666-671.
137. Schmelz, S., Kadi, N., McMahon, S. A., Song, L. J., Oves-Costales, D., Oke, M., Liu, H. T., Johnson, K. A., Carter, L. G., Botting, C. H., White, M. F., Challis, G. L., and Naismith, J. H. (2009) AcsD catalyzes enantioselective citrate desymmetrization in siderophore biosynthesis, *Nature Chemical Biology* **5**, 174-182.
138. Peltier-Pain, P., Marchillo, K., Zhou, M., Andes, D. R., and Thorson, J. S. (2012) Natural Product Disaccharide Engineering through Tandem Glycosyltransferase Catalysis Reversibility and Neoglycosylation, *Organic Letters* **14**, 5086-5089.
139. Wever, W. J., Bogart, J. W., Baccile, J. A., Chan, A. N., Schroeder, F. C., and Bowers, A. A. (2015) Chemoenzymatic Synthesis of Thiazolyl Peptide Natural Products Featuring an Enzyme-Catalyzed Formal [4+2] Cycloaddition, *Journal of the American Chemical Society* **137**, 3494-3497.
140. Bowers, A. A., Walsh, C. T., and Acker, M. G. (2010) Genetic Interception and Structural Characterization of Thiopeptide Cyclization Precursors from *Bacillus cereus*, *Journal of the American Chemical Society* **132**, 12182-12184.
141. Sato, M., Yagishita, F., Mino, T., Uchiyama, N., Patel, A., Chooi, Y.-H., Goda, Y., Xu, W., Noguchi, H., Yamamoto, T., Hotta, K., Houk, K. N., Tang, Y., and Watanabe, K. (2015) Involvement of Lipocalin-like CghA in Decalin-Forming Stereoselective Intramolecular [4+2] Cycloaddition, *Chembiochem* **16**, 2294-2298.
142. Luo, Y., Huang, H., Liang, J., Wang, M., Lu, L., Shao, Z., Cobb, R. E., and Zhao, H. (2013) Activation and characterization of a cryptic polycyclic tetramate macrolactam biosynthetic gene cluster, *Nature Communications* **4**, 2894
143. Tanaka, Y., Kanaya, I., Shiomi, K., Tanaka, H., and Omura, S. (1993) Phthoxazolin-A, A Specific Inhibitor Of Cellulose Biosynthesis From Microbial Origin: Isolation, Physicochemical Properties, and Structural Elucidation, *Journal of Antibiotics* **46**, 1214-1218.

謝辞

本研究を行うに当たり多くの方より多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました。ここに厚く御礼を申し上げます。

東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究室西山真教授には 6 年間にわたる研究室生活を通して研究は勿論、研究以外のことまで、終始真摯で厚いご指導ご鞭撻を賜りました。非常に高いレベルで研究に取り組む研究室の一員として、研究させていただいたことに心より感謝し、御礼申し上げます。同研究室葛山智久准教授には研究についてゼロから指導いただき、研究への取り組み方、心構えを授かりました。また国内、海外含めて多くの発表の機会を与えていただき貴重な経験を積むことができました。深く感謝し御礼申し上げます。同研究室富田武郎助教には研究生活全般にて細やかなご助言を頂くとともにタンパク質の結晶構造解析において多大なご指導ご鞭撻を賜りました。厚く御礼申し上げます。同研究室白石太郎助教には研究の方針や取り組み方、また研究以外の研究室生活についても数多くのご助言、ご支援を頂きました。心より感謝いたします。

東京大学生物生産工学研究センター微生物機能代謝工学研究室古園さおり特任准教授には研究室セミナーにおいて多くのご助言、ご指導を賜りました。心より御礼申し上げます。同研究室吉田彩子特任助教にはタンパク質の結晶構造解析についてご指導いただきました。また細胞機能工学研究室の先輩として、研究者としての心構えや、研究室生活についても多大なご指導を頂きました。厚く御礼申し上げます。

産業技術総合研究所創薬基盤研究部門の新家一男博士、橋本絢子博士、小曾根郁子博士、酒井紀子様にはドラフトシーケンスデータの解析、および BAC ライブラリーの作製とスクリーニングについて、ご指導いただきました。BAC、pKU503DJL68_PN1_P10-C12 についても快くご分与いただきました。また、同部門故・泉川美穂博士には大変お忙しい中化合物 **6** の構造決定を行っていただきました。厚く御礼申し上げます。

産業技術総合研究所創薬分子プロファイリングセンター広川貴次博士には VstJ の基質 **2** の分子動力学シミュレーション、および VstJ の構造予測と分子動力学シミュレーションを行っていただき、貴重なご助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

東京大学大学院農学生命科学研究科先端機器分析室の降旗一夫助教にはNMRの解析と測定法について多くのご指導ご鞭撻を賜りました。心より感謝し御礼申し上げます。

北里大学北里生命科学研究所の池田治生教授にはBACベクターpKU503Dを快くご分与いただきました。厚く御礼申し上げます。

テキサス大学薬学部 Hung-wen Liu 教授、Mark Walter Ruzszycky 博士、Ke-Yi Lin 博士には1か月と短い間でしたが、研究室に受け入れていただき、酵素動力学解析についてご指導いただくとともに、論文執筆にあたり多くの適切なお助言を頂きました。深く感謝し厚く御礼申し上げます。

理化学研究所環境資源科学研究センター天然物生合成ユニットの高橋俊二博士には、BfmJの活性について多くのお助言を頂きました。厚く御礼申し上げます。

OB、OG含む細胞機能工学研究室の室員のみなさまに大変お世話になりました。細胞機能工学研究室の一員として6年間研究に取り組めたことは自分にとって非常に幸運だったと感謝しています。特に東京大学大学院農学生命科学研究科微生物潜在機能探索寄付講座の尾崎太郎特任助教には、細胞機能工学研究室の先輩として、研究を始める際の取り組み方など、基本的なことからご指導いただき、大変お世話になりました。深く感謝し御礼申し上げます。

最後に、6年間の研究生生活を支えてくれた家族に深く感謝します。