

博士論文

海綿由来細胞毒性物質 Calyculin A の生合成に関する研究

江上 蓉子

略語

A	adenylation
AA	amino acid
Abs	absorbance
ACP	acyl-carrier protein
Ala	alanine
AMP	adenosine monophosphate
APH	aminoglycoside phosphotransferase
APS	ammonium peroxodisulfate
ARO	aromatase
Asn	asparagine
Asp	aspartic acid
AT	acyltransferase
ATP	adenosine triphosphate
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
<i>B. nentina</i>	<i>Bugula nentina</i>
bp	base pair
C	condensation
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CARD-FISH	catalyzed reporter deposition-fluorescence <i>in situ</i> hybridization
CDG	7-carboxy-7-deazaguanine
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cfu	colony forming unit
CMF-ASW	Ca ²⁺ and Mg ²⁺ free-artificial seawater
<i>C. mycofijiensis</i>	<i>Cacospongia mycofijiensis</i>
CoA	coenzyme A
COSY	correlation spectroscopy
CPT	chloramphenicol 3- <i>O</i> -phosphotransferase
CYC	cyclase
Cys	cysteine
DB	double bond
<i>D. calyx</i>	<i>Discodermia calyx</i>
<i>D. dissoluta</i>	<i>Discodermia dissoluta</i>
DEBS	6-deoxyerythronolide B
DH	dehydratase
DIC	differential interference contrast
<i>D. kiiensis</i>	<i>Discodermia kiiensis</i>
DMSO	dimethylsulfoxide
DNA	deoxyribonucleic acid
DNase	deoxyribonuclease
dNTPs	deoxynucleoside triphosphate mixture

ECH	enoyl-CoA hydrotase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
E. factor	Entotheonella factor
ER	enoylreductase
EtOH	ethanol
FAS	fatty acid synthase
FISH	fluorescence <i>in situ</i> hybridization
FDA	Food and Drug Administration
Gly	glycine
GTP	guanosine triphosphate
<i>H. okadaei</i>	<i>Halichondrin okadaei</i>
HC	heterocyclization
HCS	HMG-CoA synthase like domain
His	histidine
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMG	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence spectroscopy
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high-resolution mass spectroscopy
HWE	Horner-Wadsworth-Emmons
IC ₅₀	half maximal (50%) inhibitory concentration
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside
kb	kilobase pair
kDa	kilodalton
KR	ketoreductase
KS	β-ketoacylsynthase
KS ⁰	nonelongating ketosynthase
LC-MS	liquid chromatography - mass spectrometry
LMD	laser microdissection
Lys	lysine
Me	methyl
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
MMAE	monomethyl auristatin E
mRNA	messenger ribonucleic acid
MT	methyltransferase
MTT	3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
ND	not determined
NMR	nuclear magnetic resonance
NRP	nonribosomal peptide
NRPS	nonribosomal peptide synthetase

NVSCCs	N-type voltage-sensitive calcium channels
OABP	okadaic acid binding protein
OD	optical density
ODS	octa decyl silyl
ORF	open reading frame
Ox	oxidation
Oxz	oxazole
P450	cytochrome P450
PA	peak area
PCP	peptidyl-carrier protein
<i>P. clavata</i>	<i>Pseudoceratina clavata</i>
PCR	polymerase chain reaction
PKC	protein kinase C
PKS	polyketide synthase
pNPP	<i>p</i> -nitrophenylphosphate
PP1	protein phosphatase 1
PP2A	peotein phosphatase 2A
P-pant	4'-phosphopantetheinyl
ppm	parts per million
PPTase	phosphopantetheinyl transferase
preQ ⁰	7-cyano-7-deazaguanine
PRPS	post-ribosomal peptide synthetase
RiPPs	ribosomal peptide
RNA	ribonucleic acid
RNase	ribonuclease
rpm	rotation per minute
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SA-HRP	streptavidin-horseradish peroxidase
SB	single bond
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
Ser	serine
<i>S. tropica</i>	<i>Salinispora tropica</i>
<i>sup</i>	sponge ubiquitous polyketide
<i>T. swinhoei</i>	<i>Theonella swinhoei</i>
TE	thioesterase
TEMED	<i>N, N, N', N'</i> -tetramethylethylenediamine
Tris-HCl	tris (hydroxymethyl) aminomethane, hydrochloride
tRNA	transfer ribonucleic acid
Tyr	tyrosine
Val	valine

目次

序論

第1章 海洋天然物の可能性

第1節 天然有機化合物.....	1
第2節 海洋天然物.....	2
第3節 海綿動物と共生微生物.....	6
第4節 海洋天然物の医薬品開発における課題.....	8

第2章 Calyculin A

第1節 海綿 <i>Discodermia calyx</i> と calyculin A.....	10
第2節 Calyculin A の構造活性相関.....	14
第3節 Calyculin A の全合成.....	15
第4節 本研究の目的.....	17

本論

第1章 Calyculin A 生合成遺伝子の探索

第1節 序論.....	18
第2節 Calyculin A 生合成経路の推定.....	37
第3節 海綿 <i>Discodermia calyx</i> 由来 KS ドメインの解析.....	39
第4節 メタゲノムライブラリーのスクリーニング.....	42
第5節 <i>cal</i> 遺伝子の解析.....	46
第6節 <i>cal</i> 遺伝子のトランスクリプトーム解析.....	58
第7節 小括.....	59

第2章 Calyculin 生産菌の特定

第1節 序論.....	60
第2節 海綿 <i>Discodermia calyx</i> 共生微生物の解析.....	61
第3節 シングルセル解析による calyculin 生産菌の特定.....	65
第4節 小括.....	68

第3章 Calyculin 推定生合成修飾酵素の機能解析

第1節 序論.....	69
第2節 Calyculin A 生合成機構の推定.....	70
第3節 推定リン酸基転移酵素の機能解析.....	80
第4節 海綿 <i>Discodermia calyx</i> 抽出物の再精査.....	85
第5節 Phosphocalyculin A および C の単離と構造決定.....	87
第6節 小括.....	89

第 4 章 海綿 <i>Discodermia calyx</i> における phosphocalyculin A の意義の解明	
第 1 節 序論	90
第 2 節 Phosphocalyculin A の生物活性	90
第 3 節 Phosphocalyculin A から calyculin A への変換	92
第 4 節 海綿 <i>D. calyx</i> における activated chemical defense	96
第 5 節 小括	97
総括	99
実験項	103
Supplementary data	122
参考文献	161
謝辞	176

序論

第 1 章 海洋天然物の可能性

第 1 節 天然有機化合物

植物や微生物によって生産される天然有機化合物は、医薬品の開発において重要な役割を担ってきた。天然物の歴史は植物から始まった。現在でも解熱鎮痛剤として広く利用されているアセチルサリチル酸や消炎鎮痛剤サリチル酸メチルは、セイヨウシロヤナギ *Salix alba* の樹皮に含まれる salicin (Fig. 1a) から開発が進められ、1899 年に世界で初めて合成医薬品として世に出た¹⁾。1926 年に天然物として初めて臨床応用が認められた morphine (Fig. 1a) は、ケシ植物 *Papaver somniferum* より単離された二次代謝産物であり、今日まで医療現場において疼痛緩和に用いられてきた重要な化合物である¹⁾。その後、1928 年に A. Fleming がアオカビ *Penicillium notatum* の培養液に抗菌作用を示す penicillin (Fig. 1b) が含まれることを発見した²⁾。これをきっかけに糸状菌や放線菌などの微生物から様々な抗生物質が単離されるようになった。現在では抗生物質のみならず、免疫抑制剤やコレステロール合成阻害剤、抗がん剤など微生物を起源とする二次代謝産物が数多く臨床応用されている³⁾⁻⁶⁾ (Fig. 1b)。自然界において精緻に構築された分子構造は多様で、また、その生物活性も特異的であることから天然有機化合物は今後の医薬品開発においても引き続き不可欠な資源である。

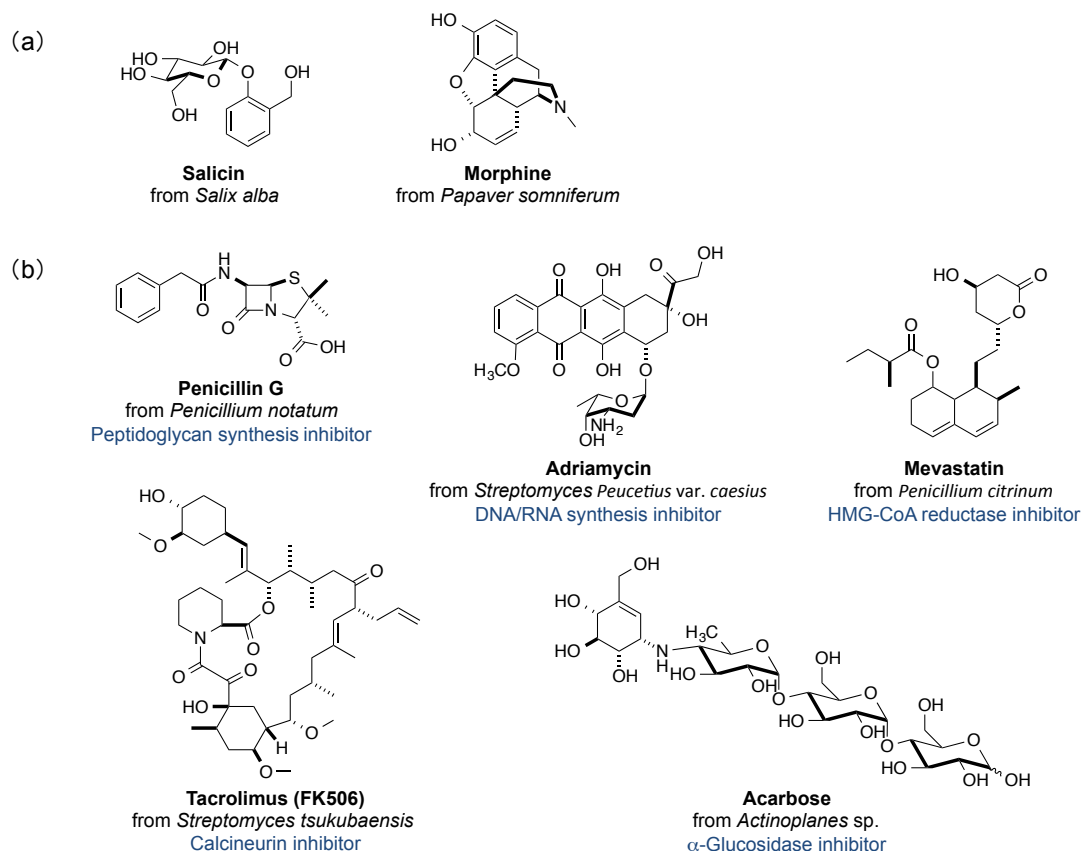


Fig. 1 天然有機化合物の例 (a) 植物由来生物活性物質¹⁾、(b) 微生物由来生物活性物質²⁾⁻⁶⁾

第 2 節 海洋天然物

地球の表面積の約 70%を占める海は生命誕生の源であり、人類はこれまでに多くの恩恵を被ってきた。その環境は陸上とは異なり特殊で、300,000 種以上の多様な生物種が生息されている⁷⁾。これまでに海洋生物からは様々な二次代謝産物が単離報告されており、その数は 18,000 以上にものぼる⁸⁾。その構造は多様で、陸上生物の二次代謝産物とは異なった構造を有する場合が多い。1981 年、K. L. Rinehart らによってカリブ海産ホヤから環状デプシペプチド didemnin B (Fig. 2) が単離された⁹⁾。Didemnin B は、抗がん活性や抗菌活性、免疫抑制作用を有し、抗がん剤として臨床開発へ進められた最初の海洋天然物である。現在、その類縁体である dehydrodidemnin B の臨床試験が進められている。また、2011 年には月本らによって千葉県館山で採取された海洋細菌 *Tistrella mobilis* から didemnin B が単離されている¹⁰⁾。1986 年、比嘉らによって沖縄産海綿 *Halichrona* sp. より単離された (+)-manzamine A (Fig. 2) は、 β -カルボリンアルカロイドの特徴的な骨格を有する¹¹⁾。その後、様々な海綿から多くの manzamine 類縁体が単離されており、抗腫瘍活性や抗菌活性などの多様な生物活性が報告されている。また、1996 年に村田らによって構造決定が達成された渦鞭毛藻 *Gambierdiscus toxicus* 由来の海産毒 maitotoxin (Fig. 2) は分子量 3422 を有し、天然物の中で最も高分子量のポリケタイド化合物である^{12), 13)}。梯子状ポリエーテルの特徴的な骨格を有し、カルシウムチャネルを活性化することで、強力な急性毒性を示す。1998 年には、D. J. Faulkner らによって海綿 *Halichrona* sp. (*Adocia* sp.) より adociasulfate-2 (AS-2) (Fig. 2) が単離された¹⁴⁾。AS-2 は、ステロイド骨格を有し、キネシンモータータンパク質を阻害する。

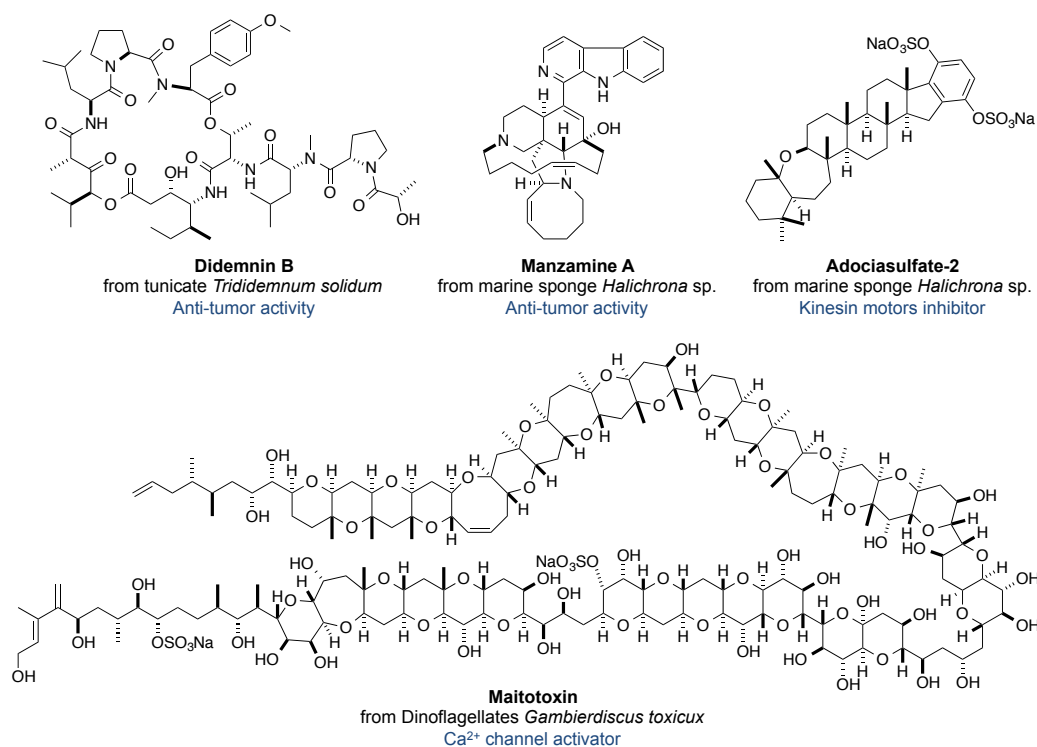


Fig. 2 多様な構造を有する海洋天然物^{9), 11)-14)}

このように海洋生物からは、ペプチドやポリケタイド、ステロイドなど多様な構造を有する化合物が単離されてきた。その生物活性は特異であることから、生化学試薬として利用されている化合物が多くある。また、抗がん剤などの医薬品リード化合物として期待される化合物も複数存在する^{15), 16)}。しかしながら、これまでに臨床応用に至った海洋天然物は数少ない。1969年に米国食品医薬品局 (FDA; Food and Drug Administration) によって抗がん剤としての臨床応用が承認された cytarabin (Ara-C) は、カリブ産海綿 *Tethya crypta* より単離された spongothymidine および spongouridine の構造がもととなって開発された¹⁷⁾⁻¹⁹⁾ (Fig. 3)。また、1976年には vidarabine (Ara-A) が抗ウイルス剤として承認された (Fig. 3)。これらはいずれも核酸と類似した骨格を有しており、DNA ポリメラーゼを阻害する。本事例は、海洋天然物の類縁化合物が医薬品として応用された初めての例である。

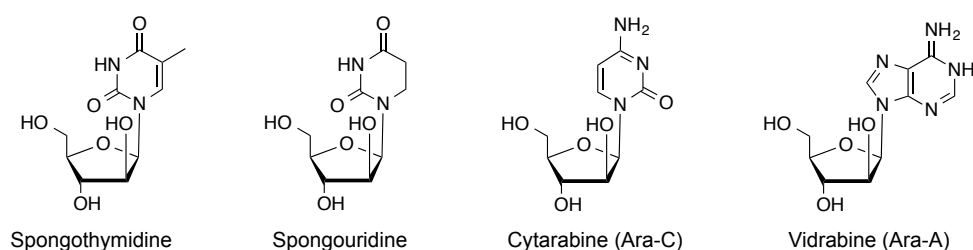


Fig. 3 Spongothymidine、spongouridine、cytarabinおよびvidarabineの構造¹⁷⁾⁻¹⁹⁾

その20年以上後の2004年、 ω -conotoxin (ziconotide) が慢性疼痛に対する適応で承認された (Fig. 4)。 ω -Conotoxin は、食魚性のイモ貝 *Conus magus* より単離された25アミノ酸残基からなるペプチドであり²⁰⁾、N型電位依存性 Ca^{2+} チャネル (NVSCCs; N-type voltage-sensitive calcium channels) を遮断することにより神経系のシグナル伝達を阻害する²¹⁾。 ω -Conotoxin は、NVSCCsの発見をもたらした化合物であり、基礎研究の分野においても大きな寄与を与えた。また、本化合物は天然より単離されたそのままの構造で臨床応用された初めての海洋天然物である。

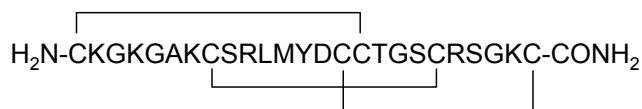


Fig. 4 ω -Conotoxinの構造²⁰⁾

2007 年には、ecteinascidin-743 が海洋天然物由来の抗がん剤として初めてヨーロッパで承認された (Fig. 5)。Ecteinascidin-743 はカリブ海に生息するホヤ *Ecteinascidia turbinata* より単離された細胞毒性物質であり²²⁾、その毒性発現はグアニンの 2 位窒素のアルキル化による DNA 修飾に起因すると考えられている²³⁾。現在、軟部組織肉腫治療薬として多くの国で応用されている。また、乳癌や前立腺癌など複数の疾患に対する臨床試験が進行中であり、今後、適応症の拡大が期待される^{24), 25)}。

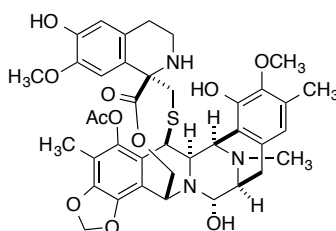


Fig. 5 Ecteinascidin-743の構造²²⁾

2010 年には、eribrin が転移性乳癌治療薬として FDA によって承認され、2011 年には日本でも手術不能または再発性乳癌の適応で承認された²⁶⁾。Eribrin は、1985 年に上村らによって海綿 *Halichondrin okadaei* より単離された細胞毒性物質 halichondrin B の部分構造を有する²⁷⁾ (Fig. 6)。チューブリン重合を阻害することで細胞分裂を阻害する。

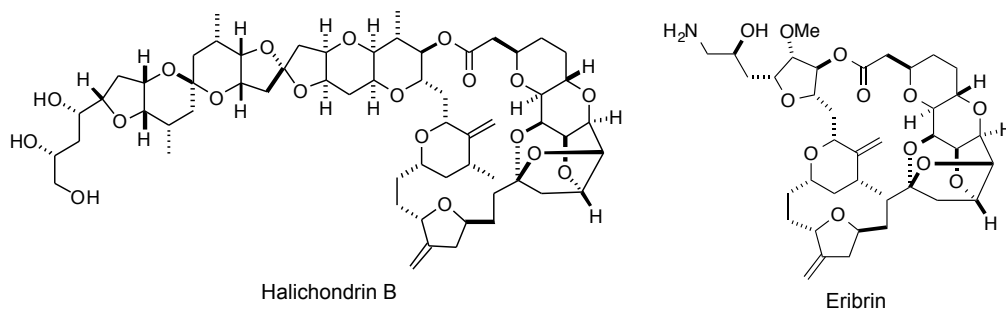


Fig. 6 Halichondrin B と eribrin の構造²⁷⁾

2011 年に FDA によってホジキンリンパ腫および未分化大細胞型リンパ腫の適応で承認された brentuximab vedotin は、dolastatin 10 のアナログである monomethyl auristatin E (MMAE) に抗 CD30 モノクローナル抗体が結合した分子標的治療薬である²⁸⁾ (Fig. 7)。Dolastatin 10 は、1987 年に B. Pettit らによってアメフラシ *Dolabella auricularia* より単離された細胞毒性物質である²⁹⁾。その後、2001 年に R. E. Moore らによって海洋シアノバクテリア *Symploca* sp. から同一化合物が単離されたことから、dolastatin 10 はアメフラシが食物から摂取したシアノバクテリアによって生産されることが示唆されている³⁰⁾。ビンカルカロイドと同様に微小管阻害作用を有し、抗がん剤として臨床開発が進められたが、高い毒性から臨床応用までには至らなかった。その後、抗体医薬と組み合わせることにより問題であった選択毒性を改善し、brentuximab vedotin の承認へ至った。

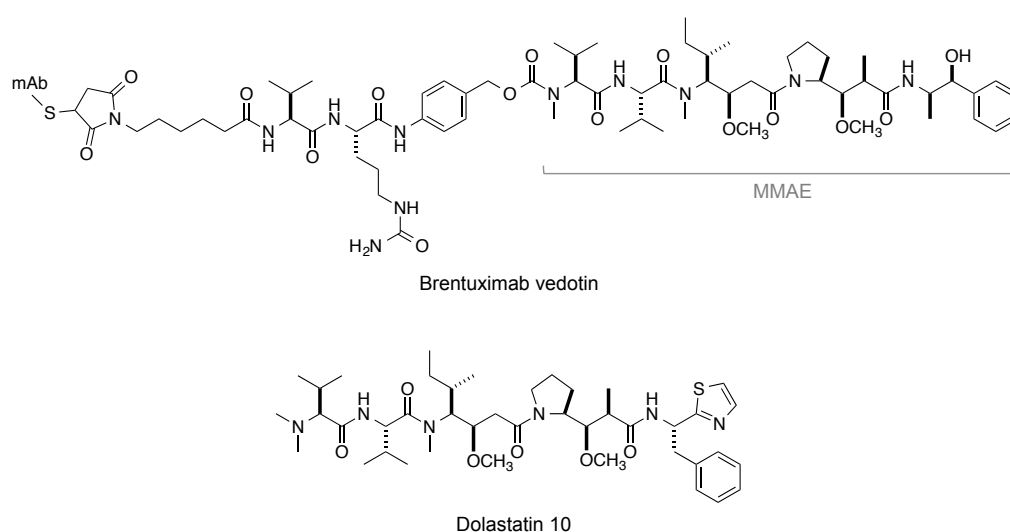


Fig. 7 Brentuximab vedotin と dolastatin 10²⁹⁾

現在、世界中で 9 種類の海洋天然物由来の化合物が臨床応用されており、また、15 種類の化合物が臨床試験の段階にある³¹⁾。その起源は、海綿動物やホヤなど海洋無脊椎動物を起源とする二次代謝産物が 8 割以上を占める (Fig. 8a)。一方、これらの化合物の 8 割以上が無脊椎動物に内在するバクテリアや藍藻、糸状菌などの微生物によって生産されると推測されている (Fig. 8b)。

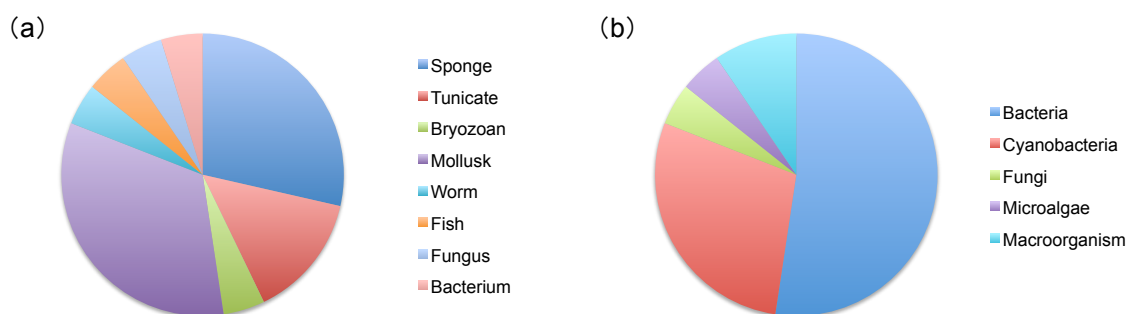


Fig. 8 臨床応用あるいは臨床試験されている海洋天然物³¹⁾

(a) 起源生物、(b) 特定または推測されている生産者

第3節 海綿動物と共生微生物

海綿動物門 Porifera の起源は今から約 6 億年前に溯り、系統学上最も原始的な多細胞動物として位置づけられる^{32), 33)}。世界中の海には 11,000 種以上の海綿動物が生息すると言われており、日本では約 750 種が知られている³⁴⁾。海綿動物は、神経系や消化器系などの高度に発達した器官を持たず、海水を濾過することで有機物を摂取して生きている。小孔 (ostium) から取り込まれた大量の海水は、体内に張り巡らされた水溝系を通り、出水孔 (osculum) から排出される³⁵⁾ (Fig. 9)。内部には鞭毛 (choanoderm) を有する襟細胞 (choanocyte) が存在し、小孔から出水孔への水の循環を調節している。このようにして一日に海綿 1 kg あたり約 24 m³ の海水を濾過する³⁶⁾。海綿動物には、濾過の過程で取り込んだ一過性の微生物とともに、内在性の微生物が共生しており、これらの多くが中膠 (mesohyl) に認められることが報告されている³⁷⁾。その細胞数は海綿 1 g あたり約 10⁸~10¹⁰ にのぼり、これは海水中に存在する微生物より 2~4 桁多い³⁸⁾。海綿動物によっては体積の 40%以上が共生微生物で占められるものもあり、その種類は多様である^{37), 39)}。

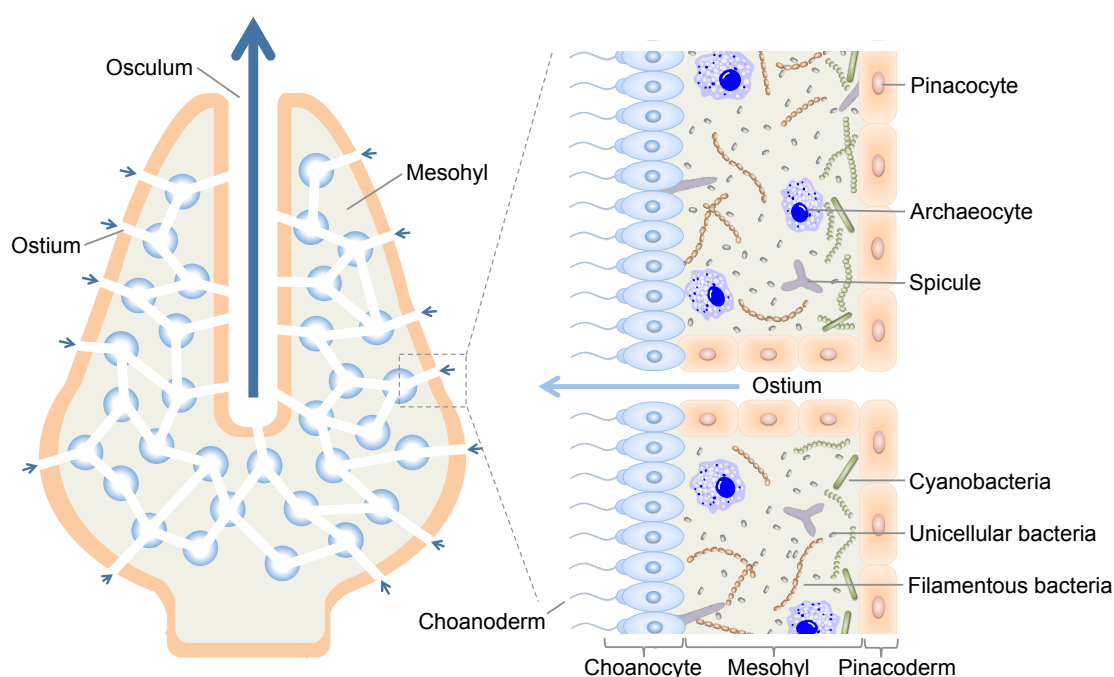


Fig. 9 海綿動物の構造³⁵⁾

固着性で岩などに付着して生活する海綿動物は、化学防御物質を保持することで外敵から身を守っていると考えられている。実際に、海綿動物からはこれまでに様々な生物活性物質が単離報告されている⁴⁰⁾。これらの中には、陸上微生物由来二次代謝産物と類似した部分構造を有するものが複数認められることから、海綿動物を起源とする生物活性物質の多くは、共生微生物によって生産が担われていることが長年疑われてきた。しかしながら、真の生産者を突き止めた研究例はほとんどない。一方で、海綿より単離された二次代謝産物の生物活性に目を向けてみると、アクチンやチューブリンの重合・脱重合阻害など細胞骨格系に作用する化合物が多く、抗ガン剤のリード化合物として有望視されるものが複数存在する^{27), 41)-44)} (Fig. 10)。また、その構造は陸上に生息する植物や微生物の二次代謝産物には見られない多様な構造を有するものが多く、海綿動物は医薬品開発において重要な天然資源である。

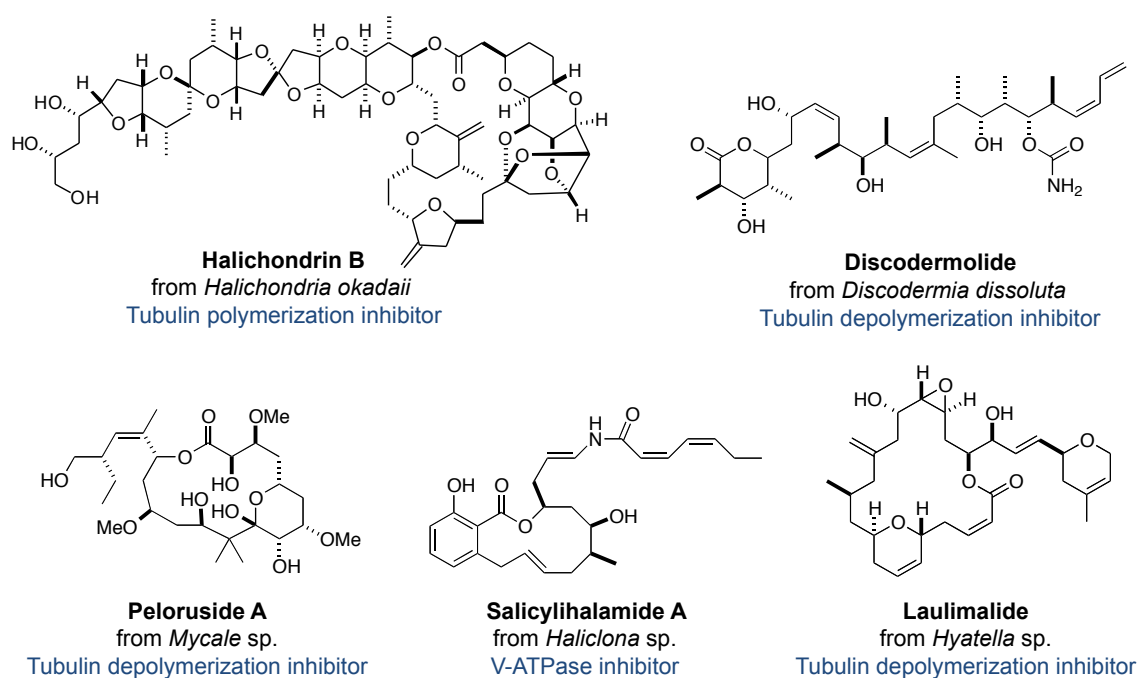


Fig. 10 海綿より単離された抗ガン剤のリード化合物^{27), 41)-44)}

第 4 節 海洋天然物の医薬品開発における課題

本章第 2 節で示したように、海綿動物を含めた海洋無脊椎動物を由来とする二次代謝産物の中には、今日の臨床現場で実際に医薬品として応用されている化合物がある (Fig. 3-7)。しかしながら、その数は、海洋天然物の単離報告例と比較するとわずかに一握りである。その大きな原因の 1 つとして、量的供給の問題があげられる。一般に、医薬品の臨床試験において最低数 kg の化合物が必要とされ、臨床応用される際には安定的に供給されなければならない。これまでに臨床応用あるいは臨床開発に至った海洋天然物は、mariculture、半合成あるいは全合成のいずれかの方法により供給されてきた^{45), 46)}。Mariculture による化合物供給の例として、bryostatin 1⁴⁷⁾ が挙げられる (Fig. 11)。Bryostatin 1 は、フサコケムシ *Bugula nentina* より単離された生物活性物質であり、プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化する⁴⁸⁾。現在、白血病やアルツハイマー型認知症などを様々な疾患を対象に臨床試験が行われている^{49), 50)}。Bryostatin 1 は、mariculture により *B. nentina* を培養後、単離・精製し、供給されている。しかしながら、培養条件の最適化が困難な上に、広大な敷地を必要とすることから、実際にこの方法で供給されている化合物はほとんどない。また、欧州やアメリカなど多くの国で抗がん剤として臨床応用されている ecteinascidin 743 は、半合成によって供給されている。培養可能な *Pseudomonas fluorescens* から発酵生産で得られる cyanosafracin B を原料として、その後 21 段階の工程を経て ecteinascidin 743 が合成されている⁵¹⁾ (Fig. 12)。さらに全合成による供給例として、2010 年に FDA によって抗がん剤として承認された eribrin (Fig. 6) が挙げられる。Eribirin は、19 の不

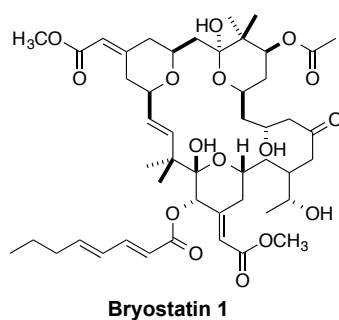


Fig. 11 Bryostatin 1 の構造⁴⁷⁾

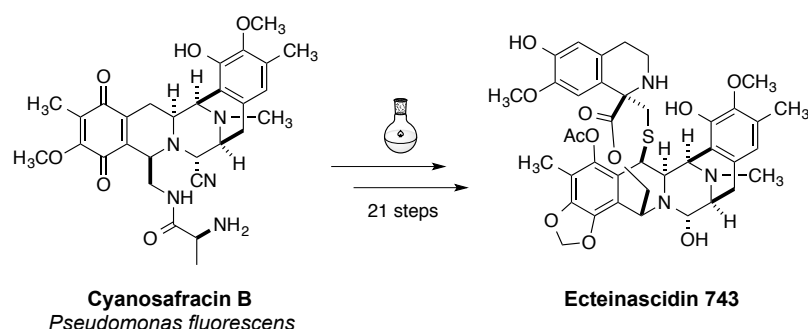


Fig. 12 半合成による ecteinascidin 743 の供給⁵¹⁾

斉中心を有し、構造が極めて複雑であるが、1992年に岸らが達成した全合成によって供給が可能となり、臨床応用に成功している^{52), 53)}。しかしながら、海洋天然物は多様で複雑な構造を有する場合が多く、必ずしも全合成による大量供給が容易であるとは言えない。また、天然からの化合物供給においても資源に限りがあり、確立された安定的な供給方法が存在しないのが現状である。このような問題を解決する上で、医薬品のリード化合物として有望な二次代謝産物の生産微生物の同定あるいは生合成遺伝子の取得は、全合成や半合成による既存の供給法に加えて、微生物発酵生産による安定的な化合物供給法の確立という点で新たな可能性を与える。しかしながら、海洋無脊椎動物に共生する微生物の99%以上は現在の技術では培養困難であり^{38), 54), 55)}、二次代謝産物の生産菌を同定した例はこれまでにほとんどない。また、海綿動物を構成する微生物叢は多様で、そこに含まれる遺伝子も複雑であることから、生合成遺伝子を取得した例も数少ないのが現状である。

第 2 章 Calyculin A

第 1 節 海綿 *Discodermia calyx* と calyculin A

チョコガタイシカイメン *Discodermia calyx*

相模湾に生息するチョコガタイシカイメン *Discodermia calyx* (Fig. 13) は、1884 年に L. Döderlein によって Lithistida 目 Theonellidae 科 *Discodermia* 属に属する海綿として同定された⁵⁶⁾。Lithistida 目⁵⁷⁾に属する海綿動物は「多様な生物活性物質の宝庫」とされ、これまでに数百種を超える二次代謝産物が単離報告されてきた^{58), 59)}。これらの中にはポリケタイドやペプチド、アルカロイド、ステロイドなどの複雑で多様な構造を有するものが多く、その生物活性も特異的であることから医薬品への応用が長年期待されてきた。

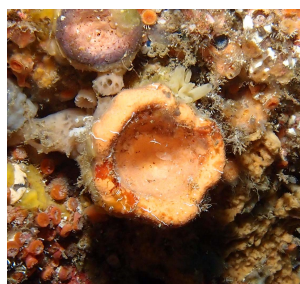
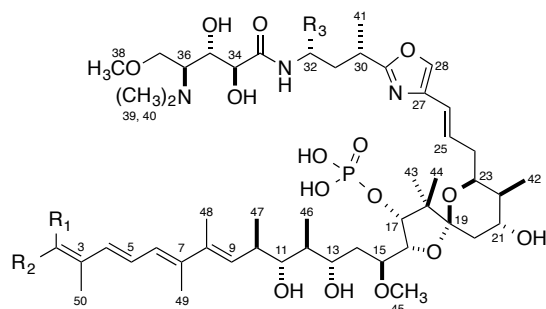


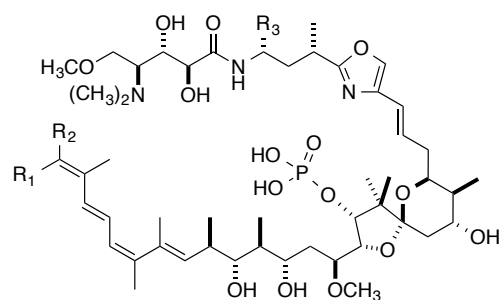
Fig. 13 チョコガタイシカイメン *Discodermia calyx*

Calyculin A の単離

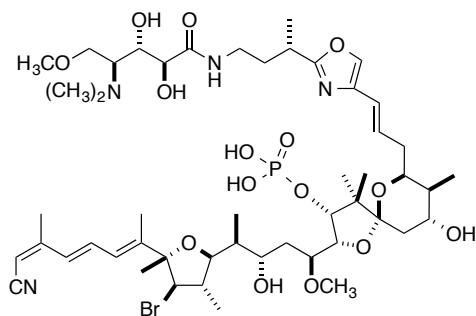
1986 年、伏谷らのグループによって *D. calyx* 由来二次代謝産物として calyculin A (Fig. 14) が初めて単離された⁶⁰⁾。Calyculin A は、ウニ卵割阻害作用および強力な細胞毒性を有し、海綿湿重量の 0.15% を占める主要な二次代謝産物として報告された。その構造は、分子量 1008、 $C_{51}H_{83}N_4O_{15}P$ であり、ニトリル、リン酸エステル、スピロアセタール環、テトラエン、オキサゾールと多様な官能基を含むポリケタイドとペプチドのハイブリッド化合物である。その後、*D. calyx* からは様々な calyculin 類縁体が単離された⁶¹⁾⁻⁶⁵⁾ (Fig. 14)。Calyculin A の幾何異性体として calyculin B, E, F が、また、32 位がメチル化された calyculin C とその幾何異性体である calyculin D, G, H が報告された。さらに、末端アミドの類縁体 calyculinamide A, B および F、Br 化された類縁体 calyculin J、脱リン酸化体である dephosphonocalyculin A および calyculin A のポリケタイド部分とペプチド部分である hemicalyculin A と allos-hemicalyculin など様々な類縁体が報告されている。



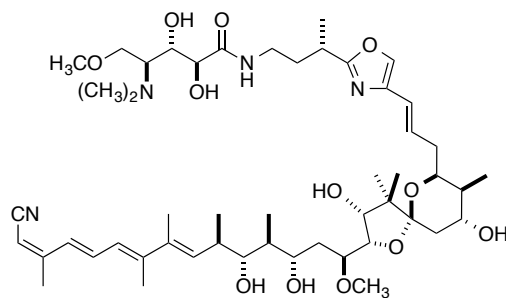
Calyculin A ($R_1=CN$, $R_2=H$, $R_3=H$)
 Calyculin B ($R_1=H$, $R_2=CN$, $R_3=H$)
 Calyculin C ($R_1=CN$, $R_2=H$, $R_3=CH_3$)
 Calyculin D ($R_1=H$, $R_2=CN$, $R_3=CH$)
 Calyculinamide A ($R_1=CONH_2$, $R_2=H$, $R_3=H$)
 Calyculinamide B ($R_1=H$, $R_2=CONH_2$, $R_3=H$)
 Des-*N*-methylcalyculin A ($R_1=CN$, $R_2=H$, $R_3=H$, C36=NHCH₃)



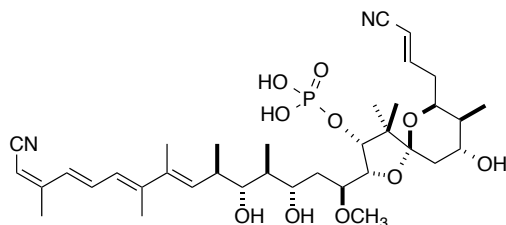
Calyculin E ($R_1=CN$, $R_2=H$, $R_3=H$)
 Calyculin F ($R_1=H$, $R_2=CN$, $R_3=H$)
 Calyculin G ($R_1=CN$, $R_2=H$, $R_3=CH_3$)
 Calyculin H ($R_1=H$, $R_2=CN$, $R_3=CH$)
 Calyculinamide F ($R_1=H$, $R_2=CONH_2$, $R_3=H$)



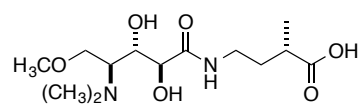
Calyculin J



Dephosphonocalyculin A



Hemicalyculin A



Allos-hemicalyculin A

Fig. 14 相模湾産 *D. calyx* より単離された calyculin 類縁体 ⁶⁰⁾⁻⁶⁵⁾

Calyculin 関連化合物

太平洋の様々な海域に生息する複数の海綿から calyculin 類縁体が単離されている (Fig. 15a)⁶⁶⁾⁻⁶⁹⁾。これらの海綿は系統学的に全く異なる目 (order) に属しており (Fig. 15b)、calyculin の骨格が海綿に重要であることが推測される。また、同一種であっても、生息する海域によって calyculin 関連化合物を含む海綿と含まない海綿が認められる。このことは、calyculin 関連化合物が海綿自身によって生産されるのではなく、それぞれの海綿に共生する共通あるいは類似した微生物が生産を担っている可能性を支持している。

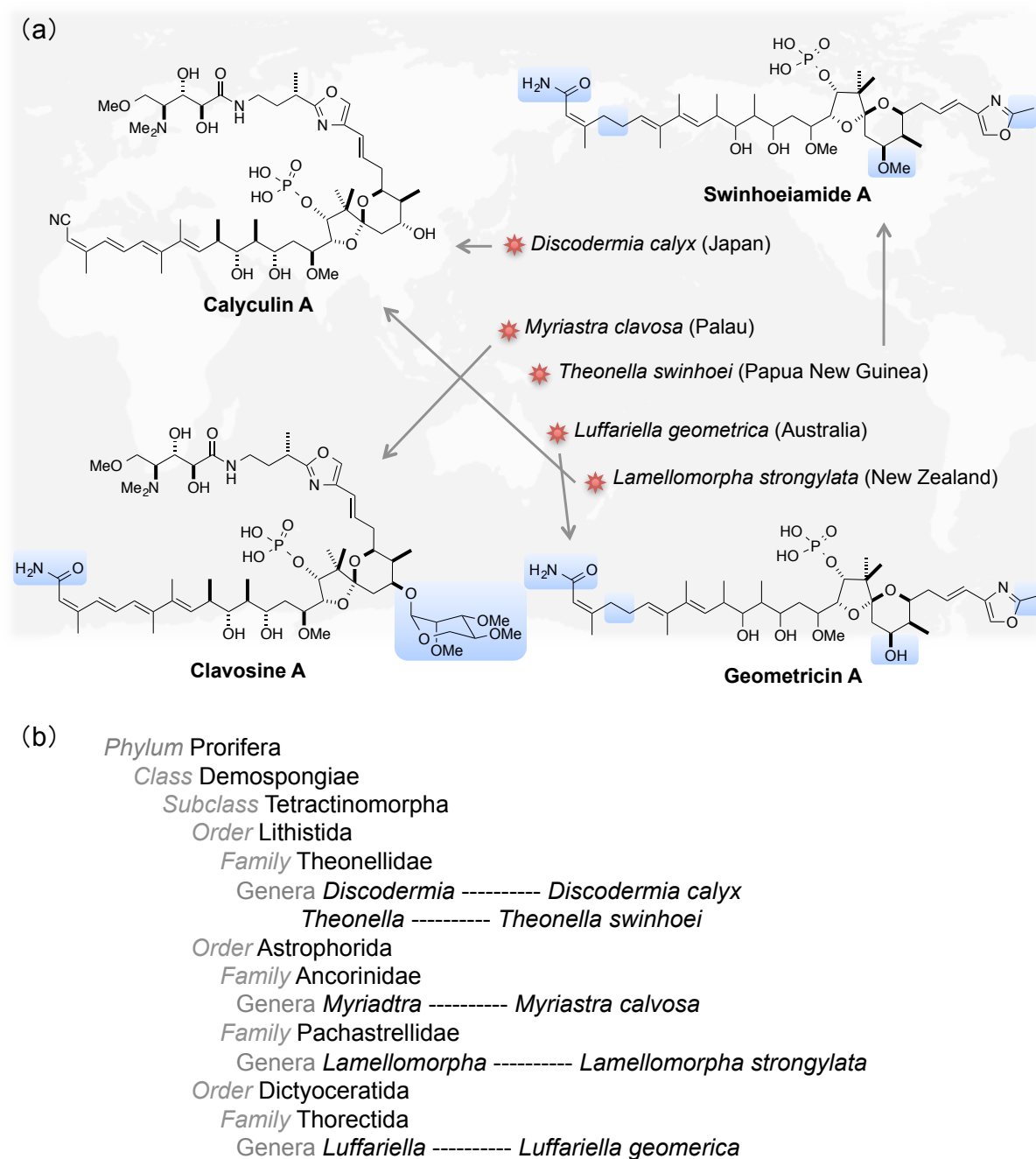


Fig. 15 Calyculin 関連化合物 (a) 構造式⁶⁶⁾⁻⁶⁹⁾、(b) 海綿の分類

Calyculin A の生物活性

1989 年、唐木らによって calyculin A はセリン・スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 と PP2A を強力に阻害することが示された⁷⁰⁾。PP1 および PP2A に対する IC₅₀ はそれぞれ 1.4 nM および 2.6 nM であり、海綿 *Halicondria okadaei* より単離された okadaic acid⁷¹⁾ (Fig. 16) と同等あるいはそれ以上の阻害活性を有する。また、1990 年には藤木、杉村らによって、calyculin A が発ガンプロモーターとしての活性を有することが示された⁷²⁾。これまでに、calyculin A と同様にタンパク質脱リン酸化酵素を阻害する天然物として、okadaic acid や microcystin-LR⁷³⁾、tautomycin^{74), 75)} など複数報告されている (Fig. 16)。これらは全て異なる動物や微生物から単離されており、構造上においてもほとんど類似性が認められない一方で、タンパク質脱リン酸化酵素を共通の標的とする現象は非常に興味深い。また、タンパク質のリン酸化・脱リン酸化は細胞周期やシグナル伝達などあらゆる生体内反応を制御していることから、現在これらの化合物は重要な生化学試薬として用いられている。さらに、okadaic acid は海綿 *H. okadaei* において化学防御物質としての役割を持つことが報告されており⁷⁶⁾、calyculin A も自然界において同様の役割を果たしていることが示唆される。

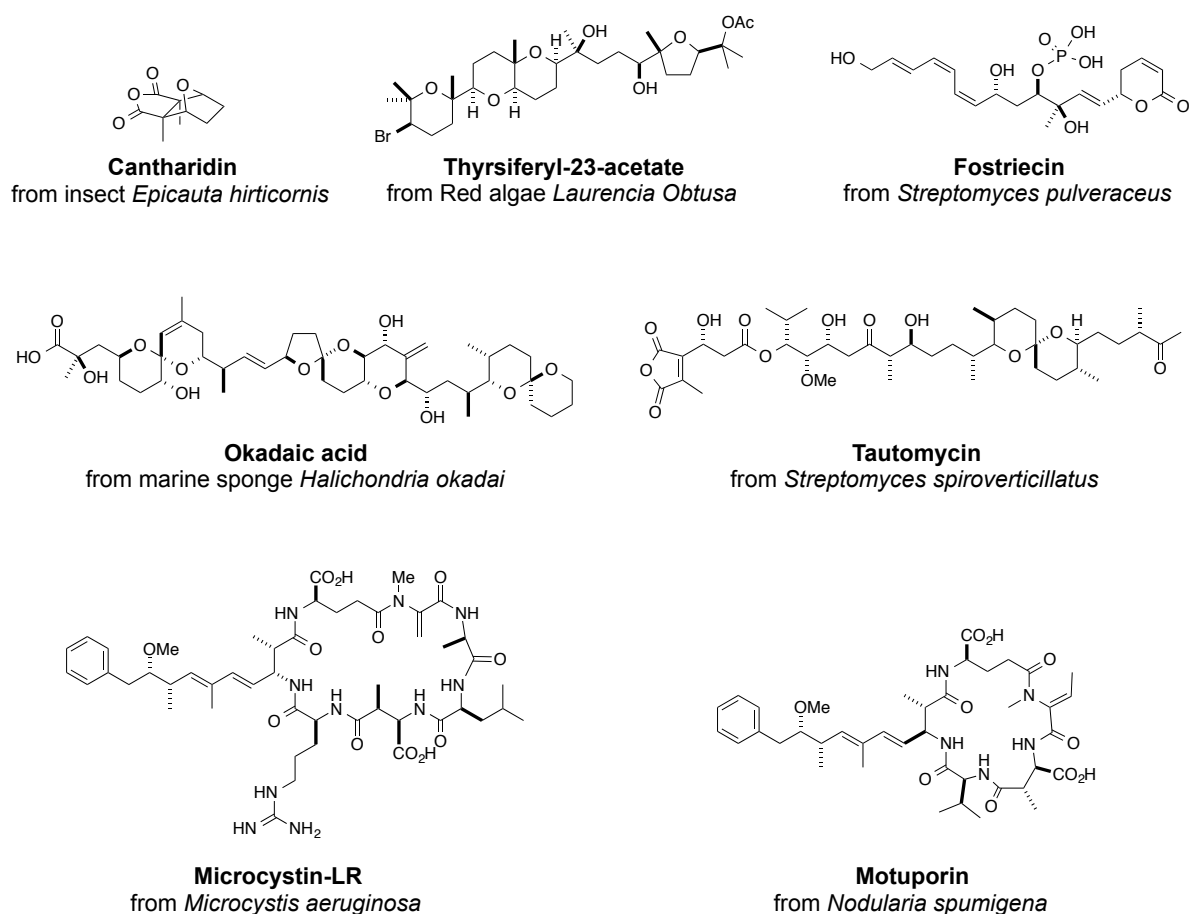


Fig. 16 タンパク質脱リン酸化酵素阻害活性を有する天然物^{71), 73)-75), 77)-81)}

第 2 節 Calyculin A の構造活性相関

複数のグループによってタンパク質脱リン酸化酵素阻害剤の構造活性相関に関する研究が遂行されてきた。1993 年、R. J. Quinn らによって okadaic acid、calyculin A および microcystin-LR の分子モデルによる比較が行われ、これらの化合物には酸性官能基と疎水性残基が共通して含まれ、類似した立体配座を取る可能性が示された⁸²⁾。2002 年には、脇本らによって calyculin A の構造活性相関に関する研究が行われ、酵素阻害活性には酸性官能基であるリン酸基、疎水性残基であるテトラエン構造および 13 位の水酸基が必須であることが報告された⁶⁴⁾ (Fig. 17)。また、calyculin A のペプチド部分は酵素阻害活性にはほとんど関与しない一方で、細胞毒性の発現には必須であるという興味深いデータが示された。その後、三木らによって X 線による calyculin A と PP1 サブユニットである PP1 γ との共結晶構造解析が遂行され、calyculin A のリン酸基が PP1 の活性中心のアミノ酸残基と相互作用し、さらにテトラエン部分が酵素の疎水性ポケットにはまり込むことことで酵素阻害活性を示すことが明らかにされた⁸³⁾。また、ペプチド部分は酵素との相互作用には関与しないことが示され、脇本らによって報告された構造活性相関を支持するデータが示された。一方で、酵素と結合していない状態の calyculin A において、36 位のジメチルアミノ基と 34 位の水酸基がリン酸基の酸素原子と水素結合を形成し、偽環状構造を取ることが報告されている⁶⁰⁾ (Fig. 18)。細胞毒性の発現において、この偽環状構造の形成により calyculin A の疎水性が増加し、細胞膜透過性が向上することが重要であると考えられている。

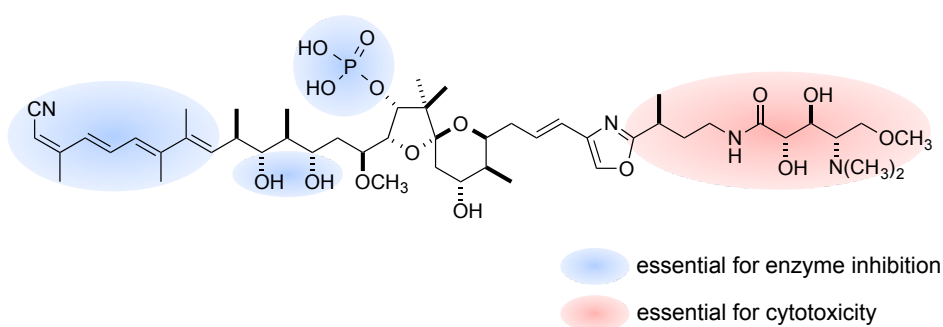


Fig. 17 Calyculin A の構造活性相関⁶⁴⁾

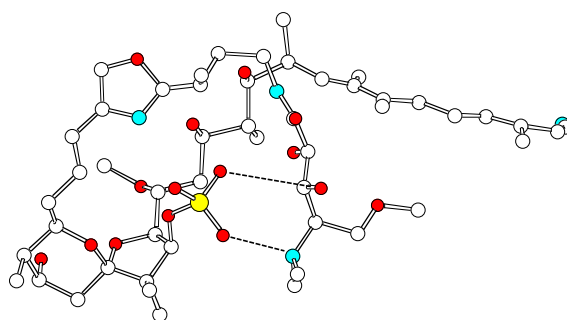


Fig. 18 Calyculin A の X 線構造解析⁶⁰⁾

第 3 節 Calyculin A の全合成

複数のグループによって calyculin A の全合成が報告されている⁸⁴⁾。1992 年、D. A. Evans らによって calyculin A の鏡像異性体である (+)-calyculin A の全合成が報告された⁸⁵⁾。1994 年には、正宗らによって天然型の calyculin A の全合成が達成された⁸⁶⁾。その後も塩入ら⁸⁷⁾や R. W. Armstrong ら⁸⁸⁾、A. B. Smith ら⁸⁹⁾、A. G. M. Barrett ら⁹⁰⁾などのグループによって calyculin A の合成研究は遂行されてきた。これまでに報告された calyculin A の合成ルートでは、テトラエン構造を含む C1-C8、スピロアセタール環を含む C9-C25 およびオキサゾールを含む C26-C37 の 3 つの断片から合成されている (Fig. 19)。

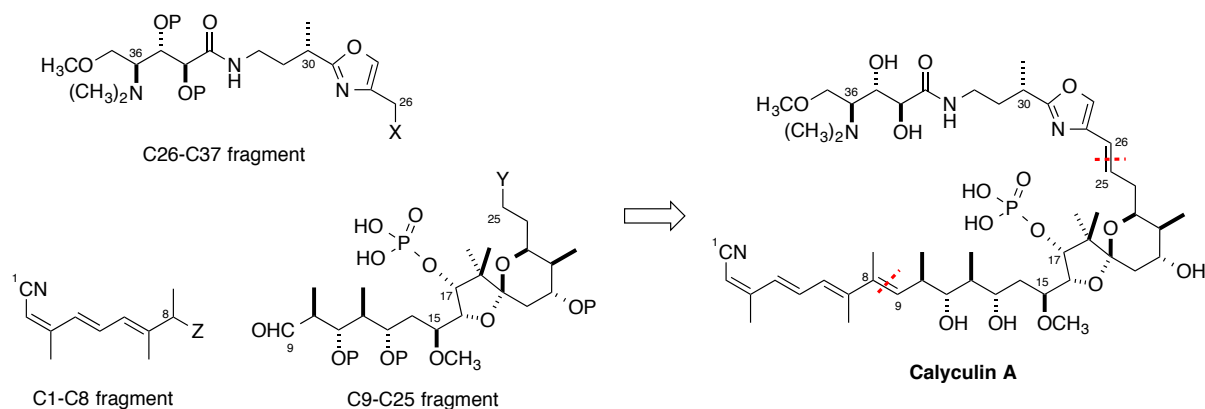


Fig. 19 Calyculin A 有機合成ルートの概要⁸⁴⁾⁻⁹⁰⁾

C1-C8 fragment は、Horner-Wadsworth-Emmons (HWE)、Peterson olefination、Stille coupling および根岸・鈴木 coupling による合成例が報告されている (Fig. 20)。1992 年の D. A. Evans らによって報告された (+)-calyculin A の合成例では、テトラエンとシアノ基の HWE 反応が試されているが、縮合の際の異性化制御が難しく、Stille coupling などの sp^2 - sp^2 coupling の有用性が示された⁸⁵⁾。このため、トリエンやジエン骨格をもちいたカップリング反応により合成された例が多い。

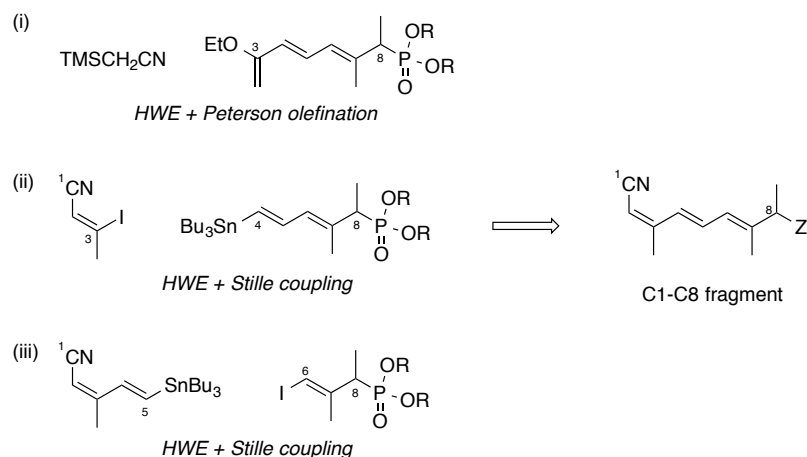


Fig. 20 C9-C25 fragment の合成例の概要⁸⁴⁾⁻⁹⁰⁾

C9-C25 fragment は、スピロアセタール環構造を有し、かつ、11 の不斉中心が認められることから、その立体選択的な合成は難しい。スピロアセタール環部分は大きく 2 つの合成ルートが報告されている。A. B. Smith らは dithianate の epoxide への付加反応によりスピロアセタール環を合成している⁸⁹⁾ (Fig. 21(i))。一方で、aldol 縮合による C19-C20 の縮合反応が複数のグループによって報告されている (Fig. 21(ii))。その後のスピロアセタール環化合物とプロピオン酸ユニットの縮合は、asymmetric crotylboration や asymmetric aldol、vinylcuprate addition による反応が報告されている。

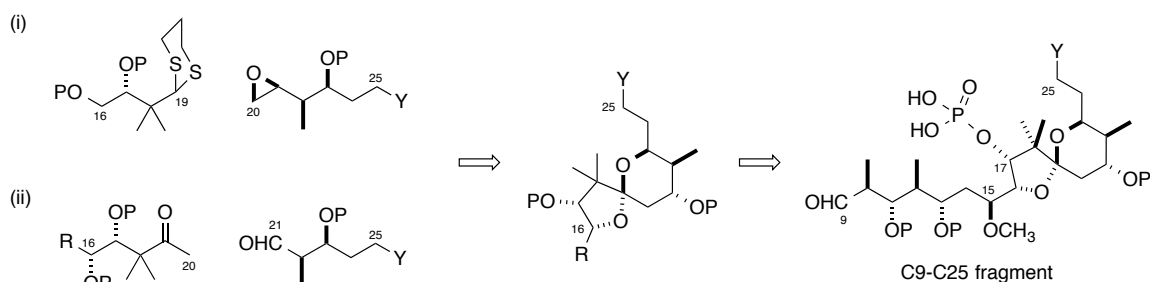


Fig. 21 C9-C25 fragment の合成例の概要⁸⁴⁾⁻⁹⁰⁾

C26-C37 fragment は、C26-C32 部分と C33-C37 部分の縮合によって合成されている例が多い (Fig. 22)。C26-C32 fragment は、特に C30 の不斉中心の立体制御が難しく、Evans' oxazolidone や L-pyrogutamic acid を原料に用いる例や、Sharpless epoxidation を用いた合成例が報告されている。また、C33-C37 fragment についても 3 つの不斉中心が認められ、かつ、反応性に富むアミノ基を含むことから、この部分の立体選択的な合成は容易ではない。Serine や D-gulonolactone、D-xylose を出発原料とした合成例が報告されている。

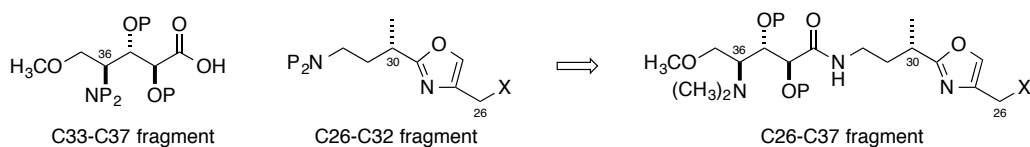


Fig. 22 C26-C37 fragment の合成例の概要⁸⁴⁾⁻⁹⁰⁾

第 4 節 本研究の目的

ここまで示してきたように、海綿動物からはこれまでに多様な構造を有する二次代謝産物が多く単離報告されてきた。その生物活性も特異的なものが多く、医薬品のリード化合物として有望視されるものが複数存在する。しかしながら、その供給法に問題があることから今日までに臨床応用に進んだ例は未だ数少ない。一方で、多くの海綿二次代謝産物の真の生産者は海綿に共生する難培養性微生物であることが長年示唆されてきたが、明確なデータによって示された報告はほとんどない。海綿二次代謝産物の生産を担う微生物の同定および生合成機構の解明は、その有効利用・安定供給を目指す上で鍵となる。

本研究では、スピロアセタール環やニトリル、リン酸エステルなどの特徴的な官能基を有する海綿二次代謝産物 *calyculin A* の生合成遺伝子を取得し、この多様な構造がどのように構築されるのか、その生合成機構の解明を目指した。さらに、取得した遺伝子をコードする共生微生物を探索することによって *calyculin A* 生産菌の同定を目指した。また、生合成酵素の機能解析を行い、海綿と微生物の共生意義についての考察を試みた。

本論

第 1 章 Calyculin A 生合成遺伝子の探索

第 1 節 序論

ポリケタイド

ポリケタイドは、アセチル-CoA やマロニル-CoA などの単純な構造であるアシル-CoA が組合わされて生合成される化合物の総称であり、植物や糸状菌、バクテリアなどの二次代謝産物に広く分布する。これまでに多くのポリケタイド化合物が天然から単離されており、医薬品開発や生化学分野において重要な役割を担ってきた。この中には抗ガン剤や抗生物質、免疫抑制剤、コレステロール降下剤などが含まれ、今日の医療現場において臨床応用されている低分子医薬品のおよそ 20% がポリケタイドに由来する⁹¹⁾。ポリケタイド合成酵素 (PKS; polyketide synthase) は、アシル-CoA を伸長基質として脱炭酸を伴う Claisen 縮合により β -ポリケトメチレン鎖を伸長し、その反応様式は脂肪酸合成酵素 (FAS; fatty acid synthase) に類似する⁹²⁾。脂肪酸合成酵素は、 β -ketoacylsynthase (KS)、acyltransferase (AT)、dehydratase (DH)、enoylreductase (ER)、ketoreductase (KR)、acyl-carrier protein (ACP) および thioesterase (TE) の 7 つのドメインから構成される多機能型酵素であり、1 回の伸長反応において、これらの酵素が 1 回ずつ作用することで伸長された β -ケトメチレン鎖が完全に還元され飽和型となる。この反応が繰り返し触媒されることで飽和脂肪酸が生合成される (Fig. 23a)。一方、ポリケタイド合成酵素では、伸長反応に必須である KS、AT および ACP は各段階で作用するものの、その後の還元反応を担う DH、ER および KR については任意に働く (Fig. 23b)。このため、非還元型の骨格が生み出され、結果的にポリケタイド化合物の構造多様性が創出される。ポリケタイド合成酵素は、I 型、II 型および III 型の 3 つに分類される。以下、各々のポリケタイド合成酵素について特徴を述べる。

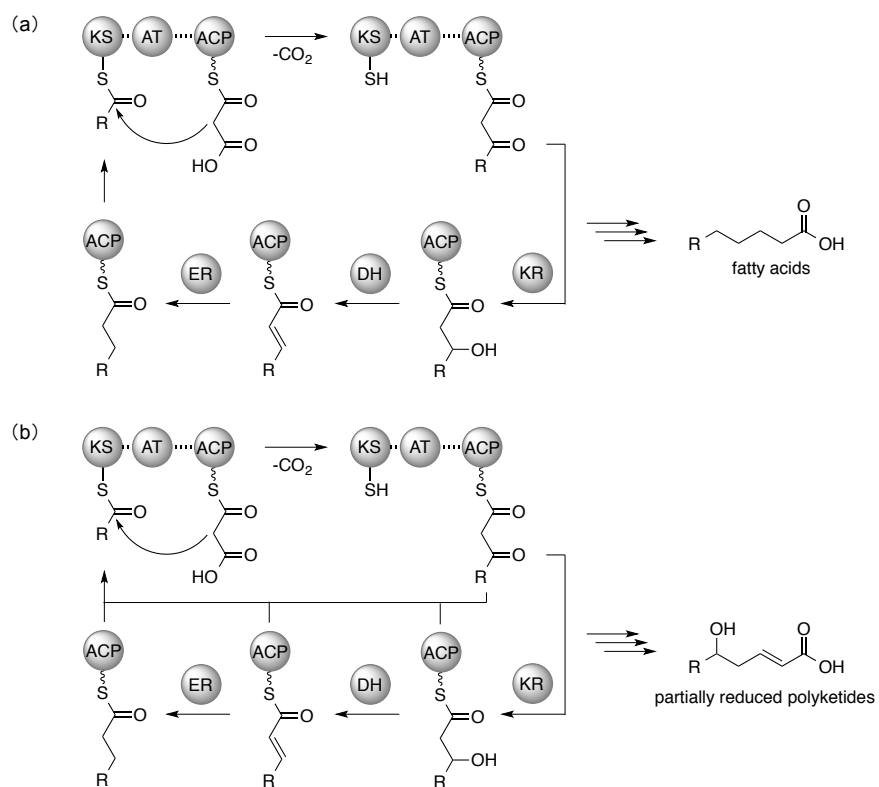


Fig. 23 (a) 脂肪酸合成酵素、(b) ポリケタイド合成酵素 ⁹²⁾

I 型 PKS

I 型 PKS は、複数の触媒ドメインが 1 つのペプチド上に連なったポリケタイド合成酵素であり、主に微生物や糸状菌に分布する。1 つのモジュールは、伸長や修飾反応を担う複数のドメインから構成される (Fig. 23b)。I 型 PKS は、モジュール型 (non-iterative type) と繰り返し型 (iterative type) に分類される。

I 型 PKS (モジュール型)

モジュール型 PKS の代表例として、erythromycin の前駆体である 6-deoxyerythronolide B の生合成酵素 DEBS があげられる^{93), 94)} (Fig. 24)。DEBS は、1990 年に I 型 PKS の初めて例として報告され、今日まで精力的に研究が進められてきた。モジュール型 PKS は、1 つのモジュールによって 1 回の伸長および還元反応が触媒される。各モジュールは、KS、AT および ACP の 3 つのドメインから構成される。この基本単位に、KR や DH、ER などの還元や修飾反応を担うドメインが入ることにより、ポリケタイドの構造多様性が創出される。

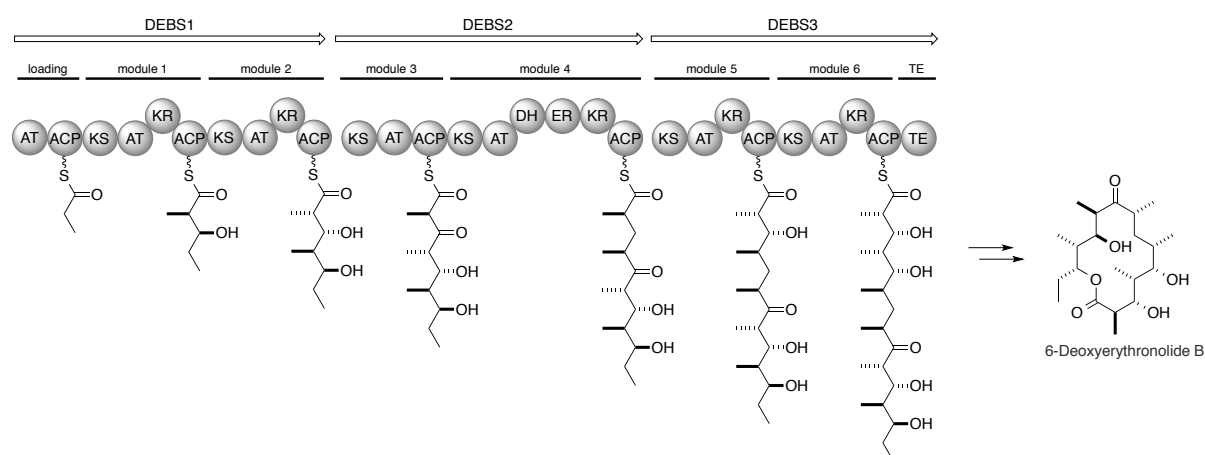


Fig. 24 6-Deoxyerythronolide B 生合成酵素 (DEBS)^{93), 94)}

ACP は、80-100 アミノ酸からなる比較的分子量が小さいタンパク質である。Phosphopantetheinyl transferase (PPTase) により coenzyme A の 4'-phosphopantetheinyl (P-pant) 部分が ACP 上の Ser 残基の水酸基に転移されることで、ACP は apo 体から holo 体へと変換される⁹⁵⁾ (Fig. 25)。PKS における伸長や修飾反応は活性化された ACP 上で行われ、反応の足場として機能する。

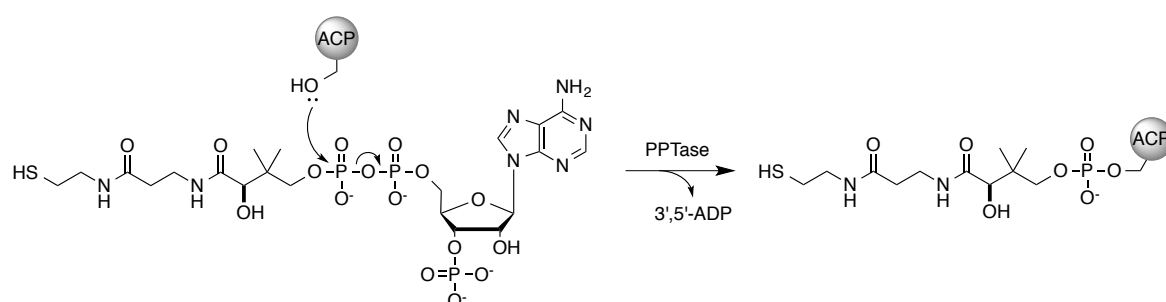


Fig. 25 PPTase による ACP の活性化⁹⁵⁾

AT ドメインは、分子量約 50 kDa であり、マロニル-CoA やメチルマロニル-CoA などの伸長基質を厳密に選択し、ACP 上へローディングする (Fig. 26a)。保存モチーフである GHSxG の Ser 残基の水酸基が、空間的に近い His 残基により活性化され、アシル-CoA のカルボニル基を求核攻撃することで伸長基質が AT ドメインと結合する⁹⁶⁾ (Fig. 26b)。生じたオキシアニオン中間体が、holo 型 ACP のチオールから求核攻撃を受け、伸長基質が ACP へローディングされる。

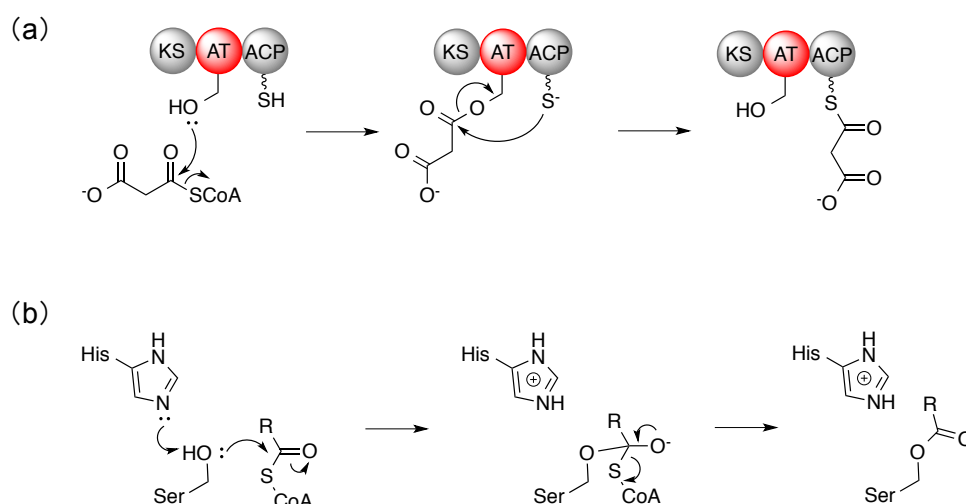


Fig. 26 AT ドメインの触媒反応^{96), 97)}

(a) AT ドメインによる伸長基質の転移反応、(b) AT ドメインの触媒機構

KS ドメインは、分子量が約 45 kDa であり、脱炭酸を伴う Claisen 反応による C-C 結合の縮合反応を触媒する (Fig. 27a)。Cys-His-His の活性残基が保存されており、1) 生合成中間体の転移、2) 伸長基質の脱炭酸、3) 生合成中間体と伸長基質の縮合の 3 段階で反応が進行する⁹⁸⁾。まず、Cys 残基のチオールが前のモジュールの ACP 上の生合成中間体を求核攻撃することで KS ドメイン上への転移が起こる。その後、2 つの His 残基によって伸長基質が脱炭酸し、生じたアニオンが生合成中間体を求核攻撃することで縮合反応が達成される (Fig. 27b)。

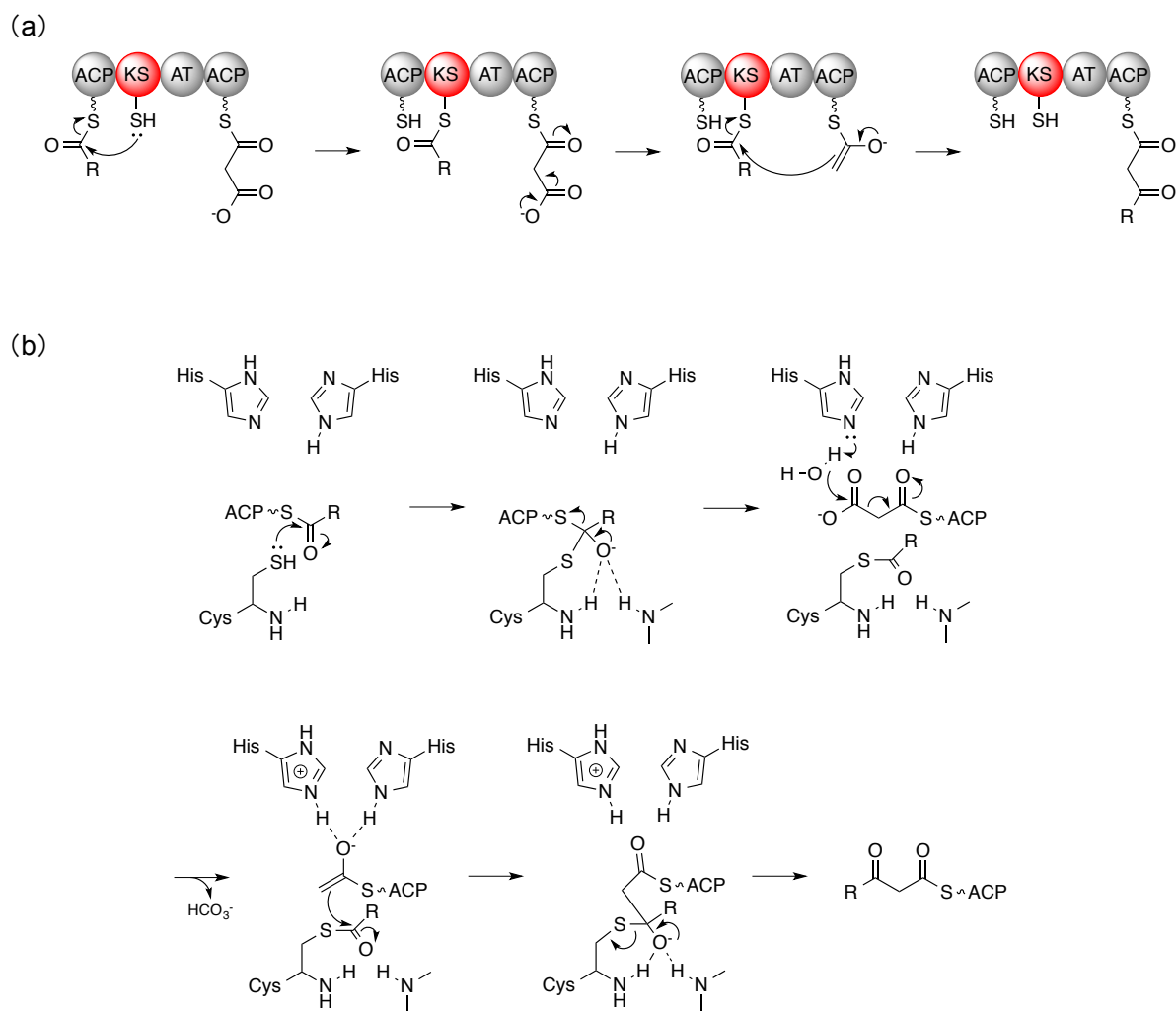


Fig. 27 KS ドメインの触媒反応⁹⁶⁾⁻⁹⁸⁾

(a) KS ドメインによる伸長基質の縮合反応、(b) KS ドメインの触媒機構

KR ドメインは、分子量約 45 kDa であり、NADPH を補因子として β -ケトン構造を立体選択的に還元する (Fig. 28a)。保存モチーフである YxxxN の Tyr 残基とその上流に位置する Ser 残基によって、生合成中間体の β -ケトカルボニル基が活性化され、NADPH のヒドリドが求核攻撃することで反応が進行する (Fig. 28b)。反応後の Tyr 残基に生じたオキシアニオンは空間的に近い Lys 残基によって安定化される⁹⁹⁾。この還元反応における立体選択性は、活性残基の Tyr から約 57 残基 N 末端側に位置する LDD モチーフ、特に Asp 残基の有無に依存する。還元反応後の水酸基の立体化学は、Asp が存在しなければ A-type (L-体)、Asp を保持すれば B-type (D-体) と制御される¹⁰⁰⁾ (Fig. 28a)。

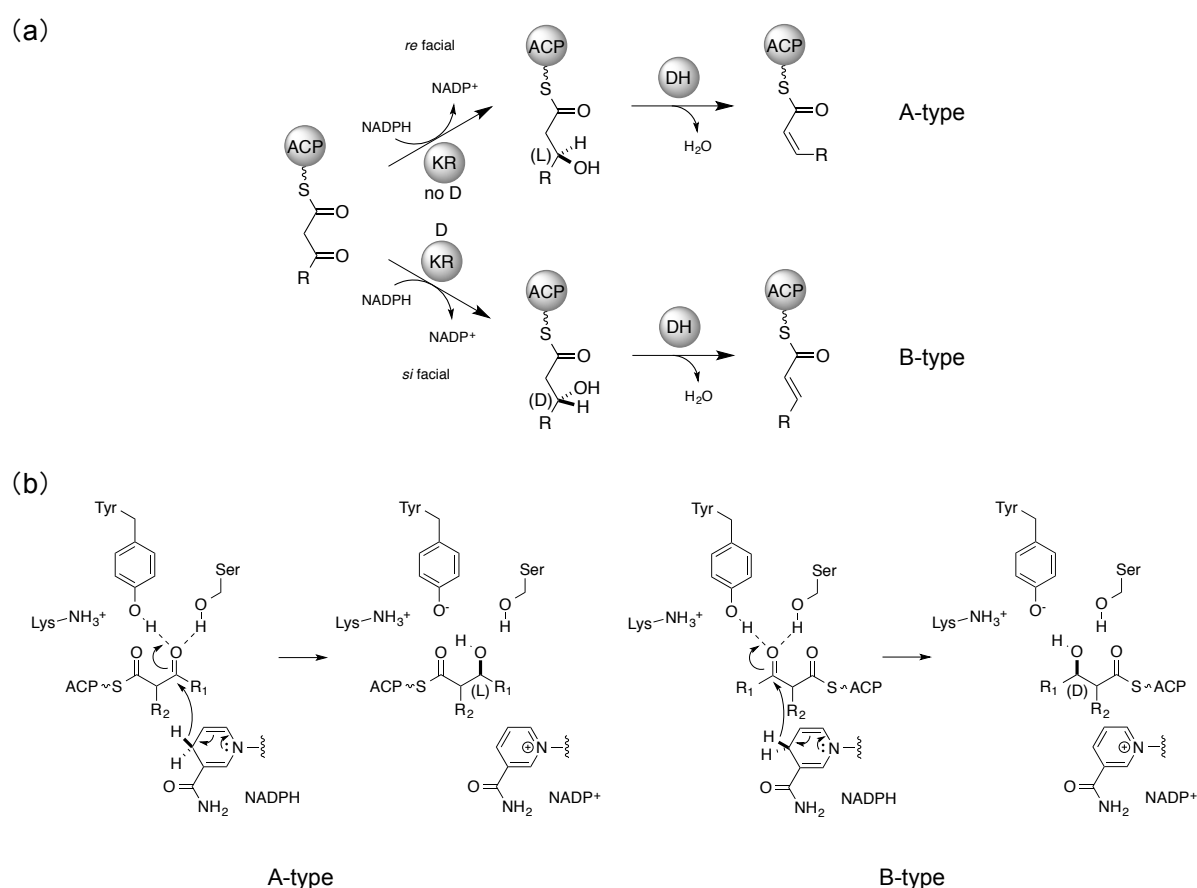


Fig. 28 KR ドメインの触媒反応^{96), 97), 99), 100)}

(a) KR ドメインによる還元反応と立体選択性、(b) KR ドメインの触媒機構

DH ドメインは、分子量約 33 kDa であり、 β -位水酸基の脱水反応を触媒する。反応は、保存モチーフである HxxxGxxxxP の His 残基によって生合成中間体の α -位プロトンの引き抜きが起こり、これによって活性化された β -位の水酸基が DxxxxH/Q の Asp 残基からプロトンを奪うことで脱水反応が進行し、 α, β -位に二重結合が形成する¹⁰¹⁾ (Fig. 29)。この脱水反応は *syn* 脱離で進行するため、反応前の基質の水酸基の立体化学が D-体である場合は *trans* 体が、また、L-体である場合は *cis* 体が反応産物として生じる。つまり、二重結合の幾何異性はそのモジュールに存在する KR ドメインの立体選択性に依存する (Fig. 28a)。

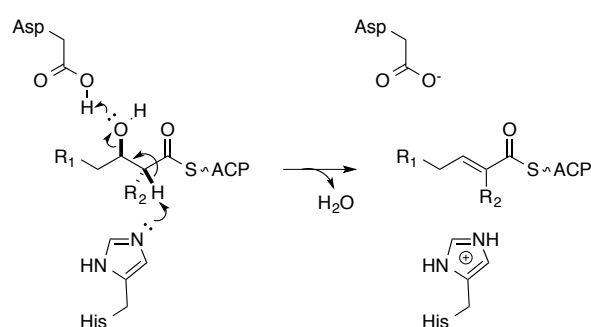


Fig. 29 DH ドメインの推定反応機構^{96), 97), 101)}

ER ドメインは、分子量約 35 kDa であり、NADPH を補因子として *trans* 体の α , β -不飽和結合を還元する (Fig. 30a)。NADPH 結合部位の HxAxxGVGxA モチーフと活性残基 Tyr が保存されている。NADPH のヒドリドが生合成中間体の β -位の炭素を求核攻撃し、生じたエノレート中間体が活性残基 Tyr のプロトンを引き抜くことで反応が進行する¹⁰²⁾ (Fig. 30b)。また、反応基質が α -位に置換基を持つ場合の立体制御は活性残基である Tyr の有無に依存する (Fig. 30a)。活性残基 Tyr が保存されている場合、プロトンが *re* 面から供与され、L-体の反応生成物が生じる。一方で、Tyr 残基が Val に置換されている場合、空間的に Tyr 残基の逆側に位置する Lys 残基がプロトン供与体として働く。その際、プロトンの供与は *si* 面から起こり、D-体の生成物が生じる¹⁰³⁾。

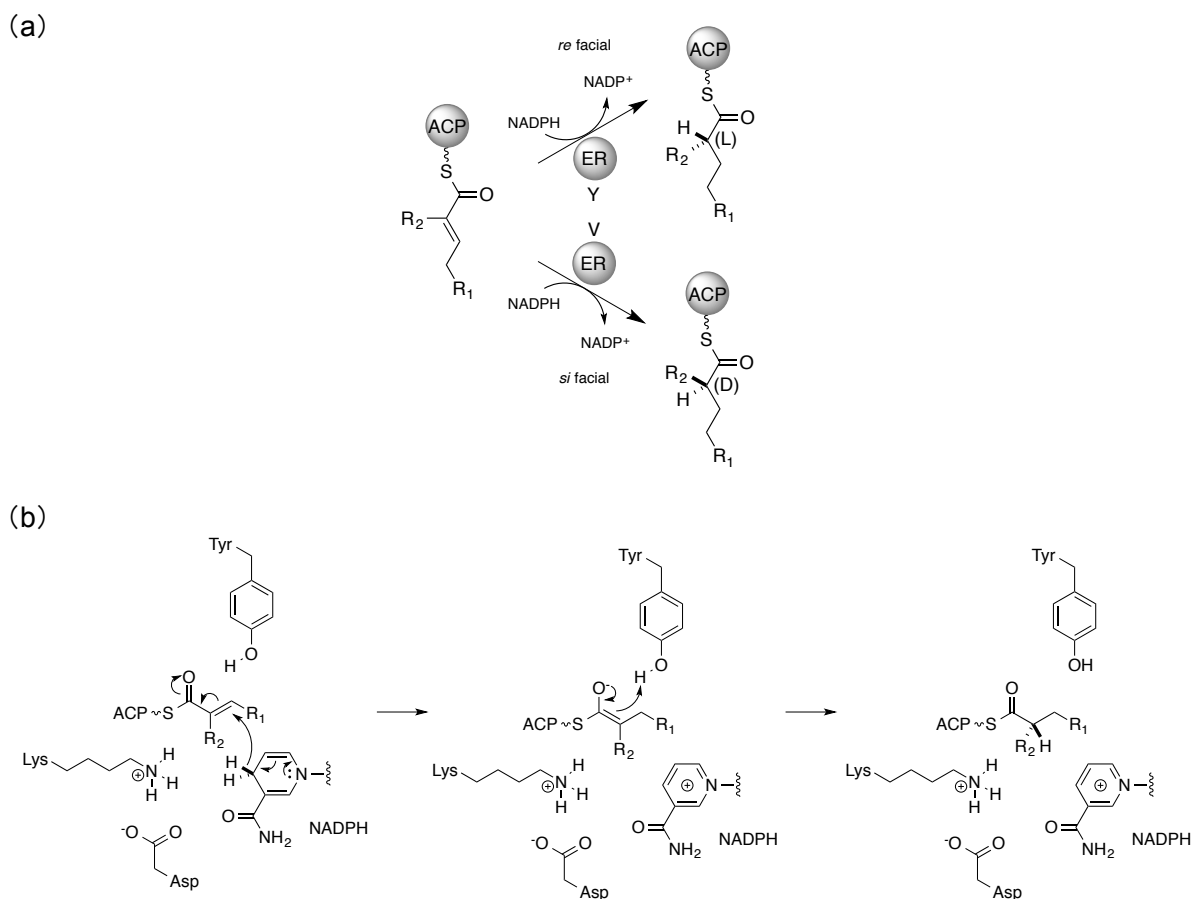


Fig. 30 ER ドメインの触媒反応^{96), 97), 102), 103)}

(a) ER ドメインによる還元反応と立体選択性、(b) ER ドメインの推定反応機構

TE ドメインは、分子量約 30 kDa であり、PKS において生成した中間体の環化によるマクロラクトンの形成あるいは PKS 産物の加水分解による生合成酵素からの切り離しを触媒する。TE ドメインによる反応は保存モチーフである GxSxG に含まれる Ser 残基によって進行する。His 残基によって活性化された Ser 残基の水酸基が生合成中間体のチオエステル結合を求核攻撃することでエステル結合を形成する。その後、ポリケタイド生合成中間体に含まれるアルコールからの求核攻撃が起こり、環化と酵素からの脱離が同時に起こると推測されている¹⁰⁴⁾ (Fig. 31)。また、環化が起こらない場合は、水分子からの求核攻撃によって加水分解され、酵素からの脱離が進行する。

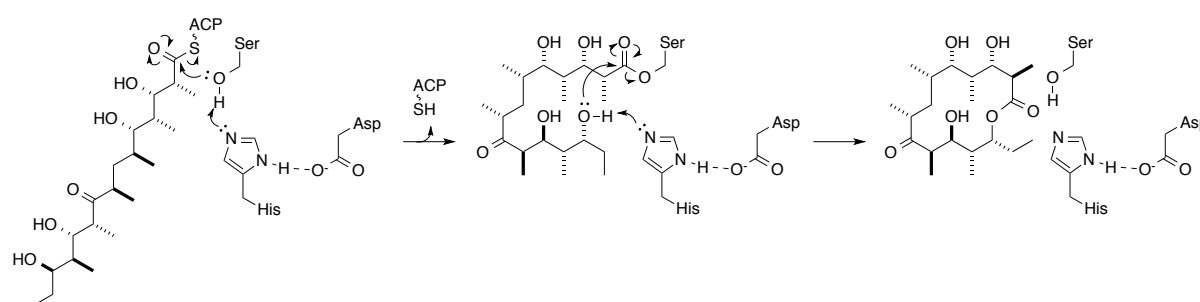


Fig. 31 TE ドメインの推定反応機構^{96), 97), 104)}

これらの各触媒ドメインがどのように相互作用してポリケタイド鎖の伸長や還元反応が繰り返し進められるのか、その様式が構造解析を基盤とした研究により明らかにされつつある。長年、巨大なポリペプチド鎖からなるモジュール型 PKS の動的な構造解析は困難とされてきたが、2014 年、G. Skiniotis らのグループによって放線菌 *Streptomyces venezuelae* 由来の pikromycin 生合成酵素の完全長 PKS モジュールの低温電子顕微鏡による構造解析が報告された^{105), 106)}。各ドメインは、反応の足場となる ACP を取り囲むようにホモダイマー構造をとっている。ACP に結合した生合成中間体はそれぞれのドメインの触媒部位へアクセス可能な位置にあり、大規模なコンフォメーションの再構成を伴いながら各触媒ドメインと順次相互作用し、 β -ポリケトメチレン鎖の伸長と還元反応が起こることが示された。

cis-AT 型 PKS と *trans*-AT 型 PKS

2002 年、モジュール型の I 型 PKS に属する *pederin* の生合成遺伝子クラスター *ped* が報告された¹⁰⁷⁾。*ped* 遺伝子には全てのモジュールに AT ドメインが含まれず、その代わりにクラスターの外に単独で 2 つの AT ドメインが認められ、異常な I 型 PKS として報告された。従来のタイプの PKS と区別するために、各モジュールに AT ドメインが必ず含まれるタイプを *cis*-AT 型 PKS、AT ドメインが含まれないタイプを *trans*-AT 型 PKS あるいは AT-less PKS と定義された (Fig. 32)。その後、*trans*-AT 型の二次代謝産物生合成遺伝子が次々と報告されるようになり、*cis*-AT 型と *trans*-AT 型の相違点が少しずつ明らかとなってきた。

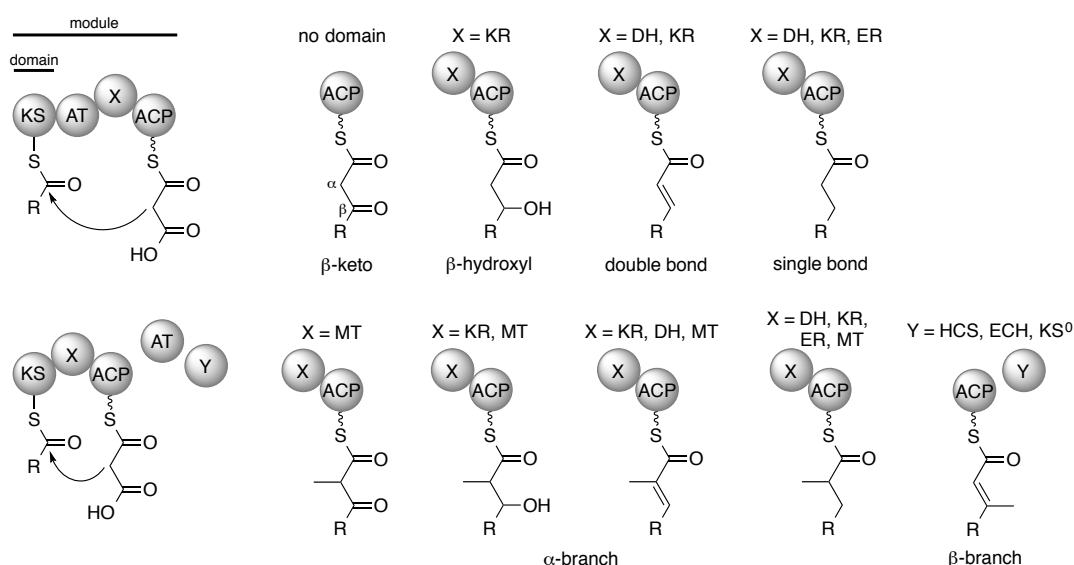


Fig. 32 I 型 PKS *cis*-AT 型と *trans*-AT 型

α -位のメチル化

cis-AT 型 PKS において、 α -位のメチル基の有無は伸長基質がマロニル-CoA か、あるいはメチルマロニル-CoA かによって決まり、これは AT ドメインの基質特異性に依存する。各モジュールに存在する AT ドメインの基質特異性は高く、伸長基質が厳密に選別される⁹⁶⁾。一方で、クラスターの外側に少数 (通常 1~2 つ) の AT ドメインが存在する *trans*-AT 型 PKS においては、ほとんどの場合において伸長基質がマロニル-CoA であり、 α -位のメチル基はモジュール内に存在する methyltransferase (MT) の触媒によって挿入される。なお、 α -位にエチル基が挿入される場合などにおいてはエチルマロニル-CoA を選択的に転移する AT ドメインがクラスターの外に存在する例も報告されている¹⁰⁸⁾。

β -位のメチル化

β -位のメチル基は、“ β -branch cassette”と呼ばれる HCS、2 つの ECH、KS⁰、ACP の複数のドメインによって触媒される (Fig. 33)。活性残基を失った KS ドメイン (KS⁰) によってマロニル-CoA が脱炭酸され、生じたアセチル-CoA が 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG) synthase のホモロ

グ酵素である HCS (HMG-CoA synthase like domain) によって生合成中間体の β 位に付加される。その後、enoyl-CoA hydratase (ECH) によって脱水および脱炭酸が起こり、 β -位のメチル化が達成される^{109), 110)}。これまでに β -branch を有する二次代謝産物の生合成遺伝子が数十種類報告されているが、そのほとんどが *trans*-AT 型 PKS に属する。

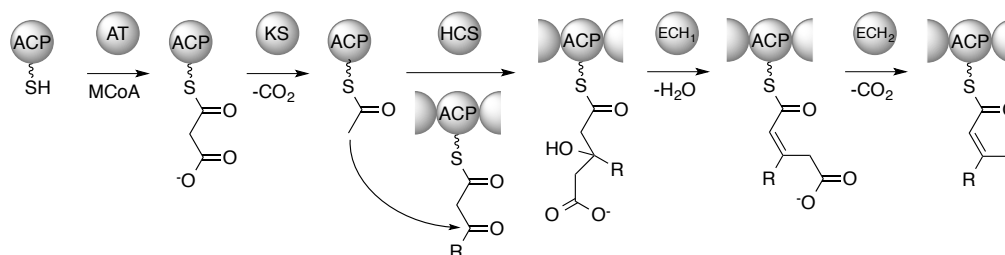


Fig. 33 β -branch の生合成機構

不飽和結合の β, γ -シフト

DH*ドメインにより α, β -位の不飽和結合が β, γ -位へシフトすることが報告されている (Fig. 34a)^{111), 112)}。 β, γ -シフトに関与する DH*ドメインは、脱水反応を触媒する通常の DH において保存されている HxxxGxxxxP モチーフの His 残基のみが保存されている。さらに、通常の DH ドメインにおいて、プロトン供与体として働く活性モチーフ DxxxQ/H の Asp が、Asn 残基へ置換されており、DH*ドメインは脱水素酵素としての活性を持たない。生合成中間体の γ 位のプロトンの引き抜きと Hxxxxxxxxx モチーフの His 残基からプロトンの供与が起こり、 α, β -位の不飽和結合が β, γ -位へシフトすると推測されている (Fig. 34b)。現在までに報告されている β, γ -シフトが認められる I 型 PKS は全て *trans*-AT 型である。

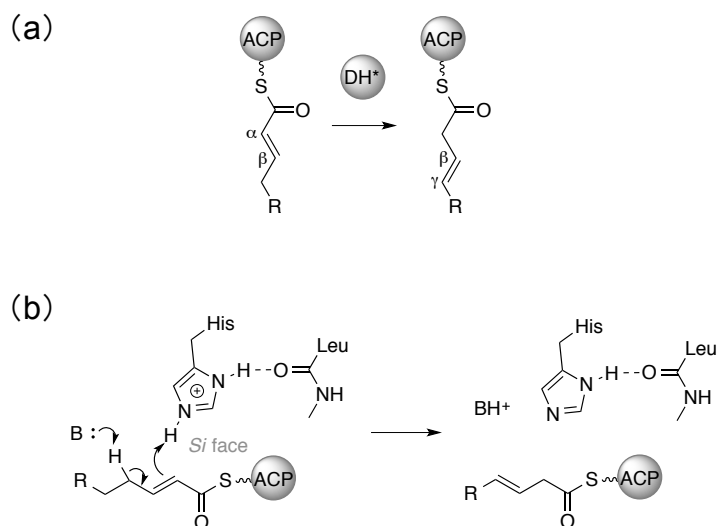


Fig. 34 DH*ドメインによる α, β -位不飽和結合の β, γ -シフト^{111), 112)}

(a) DH*ドメインによる β, γ -シフト、(b) DH*ドメインの推定反応機構

KS ドメインの配列相同性

2009 年、J. Piel らによって配列情報を基にした *cis*-AT 型 PKS と *trans*-AT 型 PKS の KS ドメインの解析が遂行された。それぞれの KS ドメインのアミノ酸配列の系統樹解析により、*cis*-AT 型は生産される化合物毎に、つまり生産菌毎に配列相同性を示す一方で、*trans*-AT 型は伸長される基質の構造に依存して配列相同性を示すことが報告された¹¹³⁾。このことは、*cis*-AT 型 PKS 由来のポリケタイドは宿主内で少しずつ試行錯誤を繰り返すことで二次代謝産物が生産されるように進化してきたのに対し、*trans*-AT 型 PKS 由来の化合物は水平伝播によって進化してきたことを示唆する報告でもある。また、*trans*-AT 型 PKS においては KS ドメインのアミノ酸配列から生合成中間体の部分構造が予測可能であることを示しており、本研究ではこの特徴を基盤として生合成遺伝子の探索を進めた。

その他

その他の相違点として、*trans*-AT 型 PKS ではモジュール内に ER ドメインが存在することは稀で、AT ドメインと同様にクラスターの外から機能する場合が多い。また、特定のモジュールが複数回繰り返して機能する例や、活性残基が保存されているにも関わらず生合成過程でモジュールやドメインがスキップされる例も報告されている。このように、*cis*-AT 型 PKS はコードされたドメインに規則正しく従うのに対し、*trans*-AT 型 PKS は不規則で配列情報のみからは予測できない反応が所々で起こることが特徴である。そのため、*cis*-AT 型 PKS は遺伝子情報から PKS 産物の構造を予想するゲノムマイニングが比較的容易であるのに対し、*trans*-AT 型 PKS においては遺伝子情報から最終産物の詳細な構造を推測することは難しい場合が多い。

I 型 PKS（繰り返し型）

繰り返し型の I 型 PKS は主に糸状菌やバクテリアに分布する。このタイプに分類される PKS として、糸状菌 *Aspergillus terreus* より単離された HMG-CoA reductase 阻害剤である lovastatin の生合成酵素があげられる¹¹⁴⁾ (Fig. 35)。繰り返し型の I 型 PKS は、伸長反応に必要な AT、KS、ACP の 3つのドメインに加えて、 β -ケトカルボニル基の修飾反応を担う KR、DH、ER および MT ドメインから構成され、これらの触媒ドメインが繰り返し働くことでポリケタイド鎖の伸長と β -ケトカルボニル基の還元反応が起こる。芳香族やエンジン構造を有する化合物の多くがこの繰り返し型 I 型 PKS によって生合成される⁹²⁾。

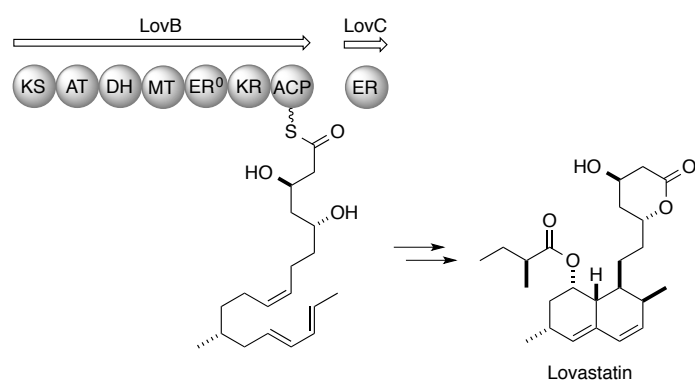


Fig. 35 I 型 PKS（繰り返し型）による lovastatin の生合成¹¹⁴⁾

II 型 PKS

II 型 PKS は主に放線菌などの微生物に分布し、2つの KS ドメイン (KS_{α} 、 KS_{β}) と ACP の複合体で構成される (Fig. 36)。この基本ドメインが繰り返し働くことで、ポリケタイド鎖が伸長される。これに加えて、KR ドメインや環化ドメイン (CYC; cyclase)、芳香化ドメイン (ARO; aromatase) が作用することで骨格が構築する。II 型 PKS は、doxorubicin¹¹⁵⁾ に代表されるように、主に芳香族ポリケタイドの生合成に関与する⁹²⁾。

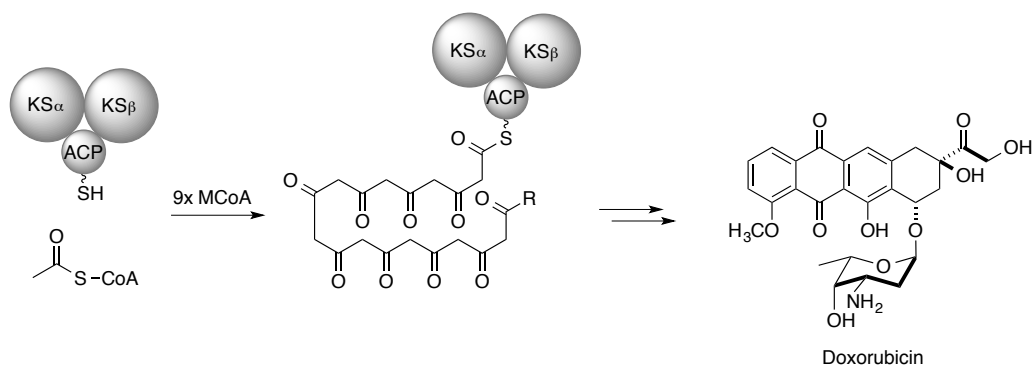


Fig. 36 II 型 PKS による doxorubicin の生合成¹¹⁵⁾

III 型 PKS

III 型 PKS は主に植物に広く分布するポリケタイド合成酵素であり、近年、バクテリアや糸状菌にも見出されている⁹²⁾。III 型 PKS の代表例として、カルコンやスチルベン生合成酵素が挙げられる¹¹⁶⁾ (Fig. 37)。I 型や II 型 PKS とは異なり、1 つの KS ドメインでアシル-CoA の転移、伸長、環化の一連の反応が触媒される。環化様式の違いにより構造多様性が創出される。また、様々な開始基質を受け入れるのも III 型 PKS の特徴である。

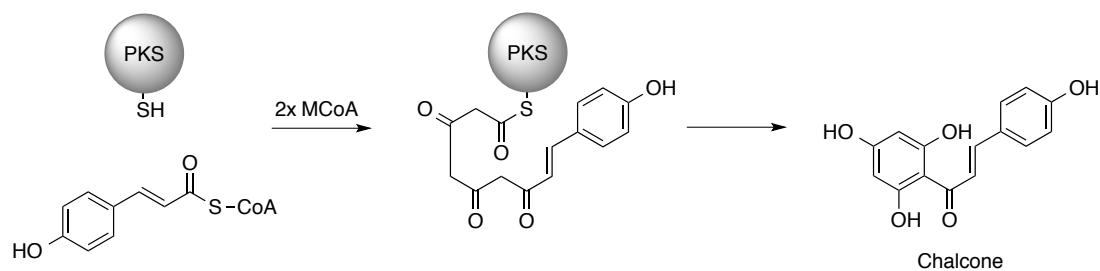


Fig. 37 III 型 PKS による chalcone の生合成¹¹⁶⁾

ペプチド

これまでに、糸状菌やバクテリアなど様々な生物種から生物活性を有するペプチドが単離されてきた。その構造に着目すると、20 種類の天然型アミノ酸から構成されるペプチドはわずか数%であり、大部分が非天然型のアミノ酸を含む¹¹⁷⁾。ポリケタイドと同様に、天然より単離されたペプチド化合物には、抗生物質や免疫抑制剤など医薬品として臨床応用されている化合物が複数存在する (Fig. 38)。また、海綿動物を含む海洋生物からも多くのペプチド化合物が単離されてきた⁴⁰⁾。これらは生合成の観点からリボソーム型ペプチド合成酵素 (PRPS; post-ribosomal peptide synthetase) によって生合成される ribosomal peptide (RiPPs) と非リボソーム型ペプチド合成酵素 (NRPS; nonribosomal peptide synthetase) によって生合成される nonribosomal peptide (NRP) に分類される。

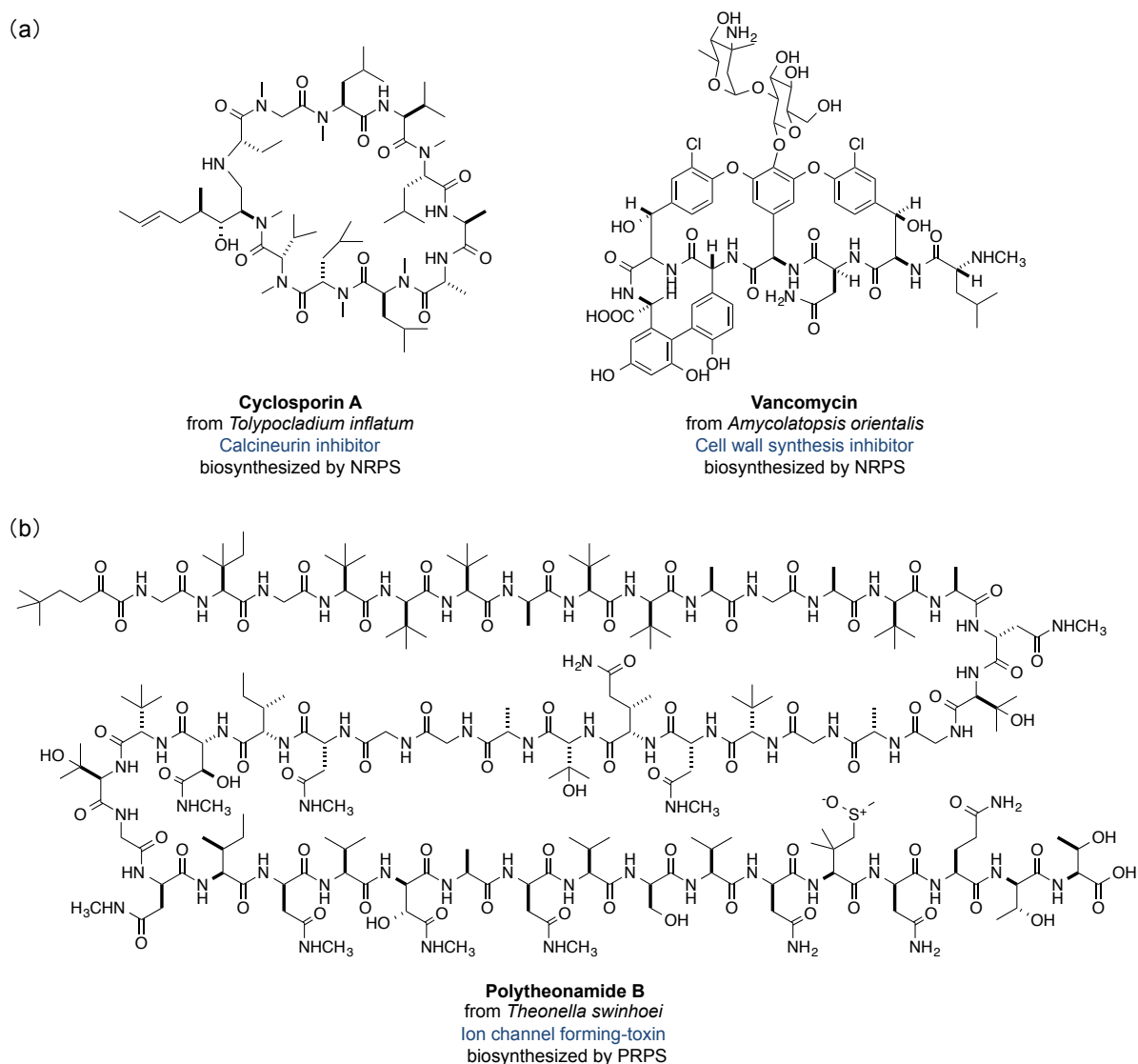


Fig. 38 天然物由来ペプチド化合物

(a) 臨床応用されているペプチドの例^{118), 119)} (NRPS 由来)、(b) 海綿由来ペプチドの例 (PRPS 由来)¹²⁰⁾

リボソーム型ペプチド合成酵素 (PRPS)

PRPS によって生合成されるペプチド RiPPs は、植物や糸状菌、放線菌、バクテリアなどから見られている。これまでに報告された RiPPs の代表例として、ランチオニンを含む lantipeptide、thiopeptide、D-体のアミノ酸を含む proteusin、アゾリンやアゾールを含む化合物などが挙げられる¹²¹⁾。これらは 20 種類の天然型アミノ酸が基本骨格となり伸長された後に、酸化や環化、メチル化などの修飾を受けるため、多様な構造を有する。1928 年に、RiPPs として nisin が初めて報告され¹²²⁾、1988 年にその生合成遺伝子が同定された¹²³⁾。また、八丈島産海綿 *Theonella swinhoei* より単離された polytheonamides は、48 アミノ酸からなる巨大なペプチドで、2012 年にその生合成遺伝子が報告された¹²⁴⁾。近年のゲノムシーケンス技術の発展により、多くの RiPPs 生合成遺伝子が報告されており、その特徴が少しずつ明らかにされてきた。

PiPPs の骨格は、一次代謝におけるタンパク質生合成と同様のメカニズムによって構築される。伸長基質となるアミノ酸は aminoacyl-tRNA synthetase によってアデニル化された後に、tRNA の 3'-末端の CCA 配列に付加され、aminoacyl-tRNA を生じる。その後、mRNA のコドンと相補的な aminoacyl-tRNA のアンチコドンが塩基対を形成し、順次ペプチド結合が形成される (Fig. 39a)。多くの場合、RiPP の骨格となる core peptide を含む 20~110 残基からなる precursor peptide が最初に生合成される (Fig. 39b)。その後、N 末端の leader peptide を認識して翻訳後修飾が起こり、modified precursor peptide が生じる。複数のペプチドは C 末端に recognition peptide を有しており、この部位が認識されてペプチド鎖の環化などが起こる。最終的に、leader peptide などの骨格に余分な配列が切断され、成熟した RiPP が生じる¹²¹⁾。

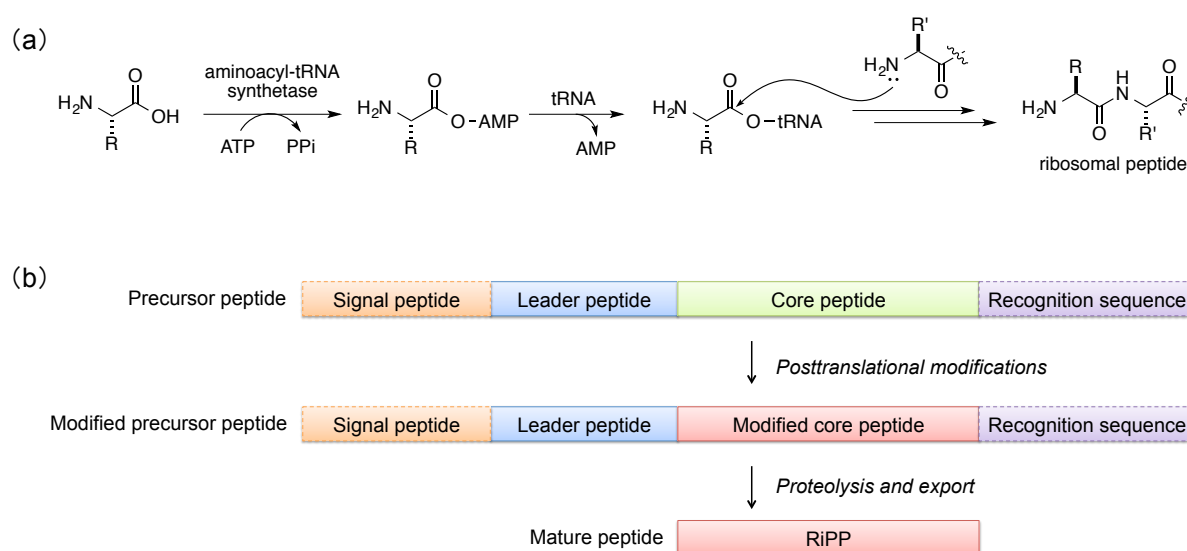
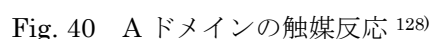


Fig. 39 リボソーム型ペプチド合成酵素¹²¹⁾

(a) PRPS による RiPPs の生合成機構、(b) PRPS の概要

NRPS は、モジュール型のペプチド合成酵素で、adenylation (A) ドメイン、condensation (C) ドメインおよび peptidyl-carrier protein (PCP) の 3 つのドメインによってアミノ酸が伸長される¹²⁵⁾。NRPS による生合成機構は、モジュール型 PKS によるポリケタイドの生合成機構と類似する。

A ドメインは、分子量約 50 kDa のタンパク質であり、伸長基質となるアミノ酸をアデニル化した後に PCP ヘローディングする。A ドメインの基質特異性は高く、伸長されるアミノ酸は基質の結合に関与する 10 個のアミノ酸残基から推測可能である (NRPS コード)¹²⁶⁾。A ドメインに受け入れられたアミノ酸は、カルボン酸部分がアデニル化されて aminoacyl-AMP を生じ、その後、PCP ドメインの phosphopantetheinyl 基ヘローディングされる^{127), 128)} (Fig. 40)。



34

海綿由来二次代謝産物の生合成研究

2000 年以降、分子生物学を中心とした科学技術の発展により、二次代謝産物の生合成研究は大きく進んできている。特に、次世代シーケンサーの開発により全ゲノム解析が比較的安価に行われるようになり、これに伴って二次代謝産物の生合成遺伝子も入手しやすくなってきた。実際に、その報告数はここ 10 年間で急激に上昇している。一方で、海綿より単離された二次代謝産物の生合成遺伝子の単離例は未だ少ないのが現状である¹²⁹⁾。これまでに報告された成功例は、J. Piel らによる *Theonella swinhoei* 由来の onnamide¹³⁰⁾ および polytheonamide¹²⁴⁾ を含む二次代謝産物、*Psammocinia aff. bulbosa* 由来の psymberin¹³¹⁾ のみである。一方で、かつて抗ガン剤候補化合物として臨床試験まで進んだ *Discodermia dissoluta* 由来の discodermolide 生合成遺伝子の取得が失敗に終わった報告もされており¹³²⁾、海綿由来二次代謝産物の生合成遺伝子の同定は一筋縄ではいかないことを示している。その要因の一つとして、海綿動物に共生するバクテリアの存在が挙げられる。序論第 1 章でも述べたように、海綿動物には多様で膨大な量のバクテリアが共生していることが過去の研究から明らかにされている。海綿を起源とする二次代謝産物の多くはこれらの共生微生物によって生産されることが長年示唆されてきたが、現在の技術ではこれらの微生物を実験室下で培養することが困難であることから、生産菌を海綿から単離することができない。このため、二次代謝産物の生合成遺伝子の取得は共生微生物を含む海綿全体のメタゲノムからの探索に限られる。しかしながら、多種多様で複雑な微生物叢を構成する海綿メタゲノムから、目的の生合成遺伝子を同定することは極めて難しいのが現状である。本研究では calyculin A の構造に着目し、遺伝子の配列情報と生合成中間体の部分構造の相関に基づいた手法により、共生微生物を含む海綿メタゲノム DNA から本化合物の生合成遺伝子の探索を行った。

メタゲノム法

地球上に生息する微生物は、約 10^6 種類に上ると推測されているが、その 99%以上が培養困難であり、今日までに同定されている微生物はほんの 5000 種にも満たない^{133), 134)}。このような難培養性微生物には、動物や糸状菌などに共生する微生物も含まれ、新規天然化合物の探索において重要な資源の一つとして注目されている。実験室下で培養困難な微生物資源を有効利用する方法の一つとして、メタゲノム法が挙げられる。この方法は、土壌や海水などの環境中に生息する微生物や共生微生物から培養工程を踏まずに直接 DNA を抽出し、大腸菌などの異種宿主へ形質転換してライブラリーを構築する。構築したライブラリーを ‘Function-based analysis’ あるいは ‘Sequence-based analysis’ によってスクリーニングすることで、難培養性微生物の遺伝子にアプローチできる方法である (Fig. 42)^{135), 136)}。‘Function-based analysis’ は、抗菌活性や色素判定などにより、挿入した遺伝子の表現型をベースに選別する方法である。実際に、この方法を応用することにより terragine 類¹³⁷⁾ や porphyrin 類¹³⁸⁾ が単離されている。また、‘Sequence-based analysis’ は遺伝子やタンパク質の配列相同性を基に縮重プライマーを設計し、生合成遺伝子などを配列ベースで探索する方法である。この方法は、主に共生微生物に由来する I 型 PKS¹³⁹⁾ や新規 II 型 PKS¹⁴⁰⁾ の探索に用いられてきた。本研究では、‘Sequence-based analysis’ を用いたメタゲノム法により、calyculin 生合成遺伝子の探索を行った。

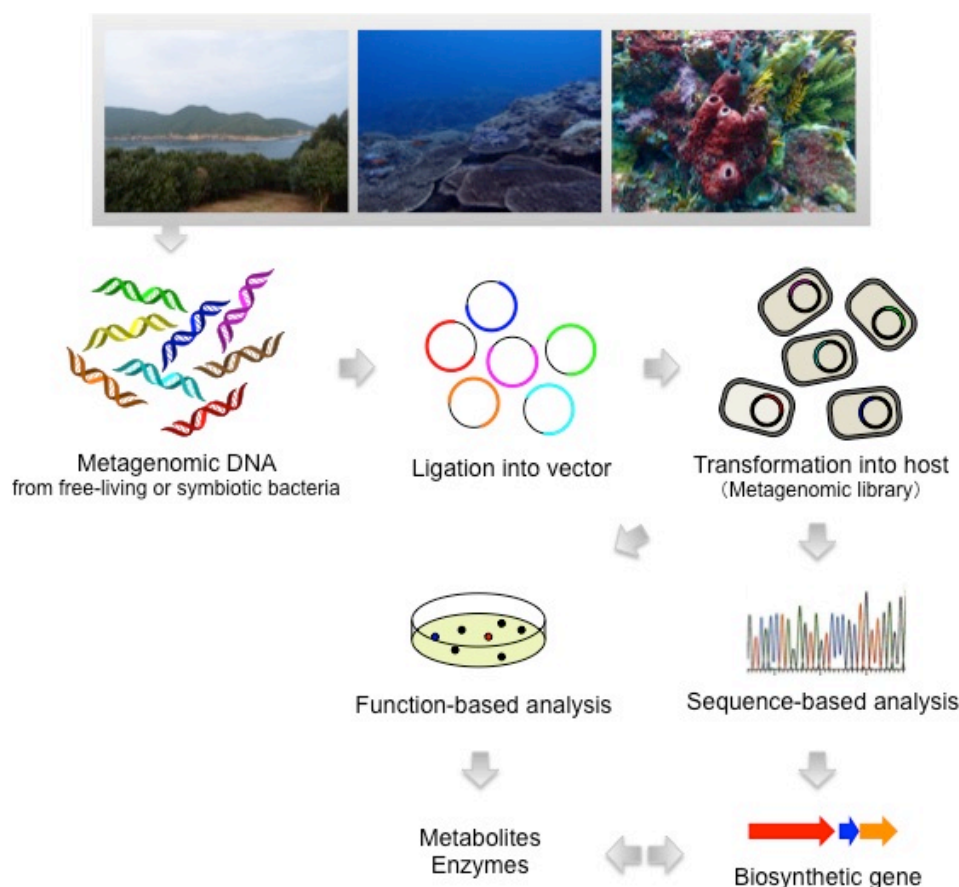


Fig. 42 メタゲノム法の概要

第 2 節 Calyculin A 生合成経路の推定

Calyculin A の構造は、ペプチド部分とポリケタイド部分から構成されることから (Fig. 43)、NRPS と PKS のハイブリッド経路によって生合成されると予想した。そこで calyculin A の生合成経路を推測した (Fig. 44)。Calyculin A は、アミド結合の様式からペプチド部分より生合成されと考えられた。ペプチド部分は NRPS と PKS がモザイク状に連なった機構で生合成されると予想した。まず、開始基質である Ser のアミノ基と水酸基がメチル化されトリメチルセリンが形成した後、PKS によって 1 分子のマロニル-CoA が伸長する。同様に Gly と 1 分子のマロニル-CoA が伸長する。さらに Ser が伸長された後に、環化および酸化されることでオキサゾリンを経てオキサゾールが形成され、calyculin A のペプチド部分が生合成されると推測した。その後、PKS によりポリケタイド部分が構築される。既に報告されている I 型 PKS の生合成機構に従って calyculin A の生合成経路を予想した結果、ポリケタイド部分の生合成経路において 2 つの疑問が生じた。まず、ポリケタイド部分の炭素数について疑問であった。PKS の基本的な伸長基質はマロニル-CoA であり、C2 単位で炭素鎖が伸長する。しかながら、オキサゾールが形成された後の calyculin A の骨格構築に必要な炭素鎖は C25 であり、奇数である。つまり、calyculin A のポリケタイド部分が生合成される過程で、減炭あるいは C1 ユニットの炭素原子の伸長がなされなければならないが、その機構については不明であった。また、calyculin A の生合成修飾機構について疑問が生じた。Calyculin A の構造に特徴的な 5,6-スピロアセタール環やニトリルがどのように生合成されるのか、その詳細な機構は不明であった。一方で、calyculin A はテトラエン部分に β -branch の特徴的な部分構造を有する (Fig. 43)。本章第 1 節でも述べたように、 β -branch は HCS ドメインを含む複数の修飾酵素 (β -branch cassette) によって導入される。この β -branch 構造を有する化合物の 9 割以上が *trans*-AT 型 PKS 由来であったことから、calyculin A も *trans*-AT 型 PKS によって生合成されると予想した。さらに、*trans*-AT 型 PKS の KS ドメインはアミノ酸の一次配列から生合成中間体の部分構造が推測可能である。この特徴を利用して KS ドメインの配列を足がかりに calyculin A の生合成遺伝子の探索に着手した。

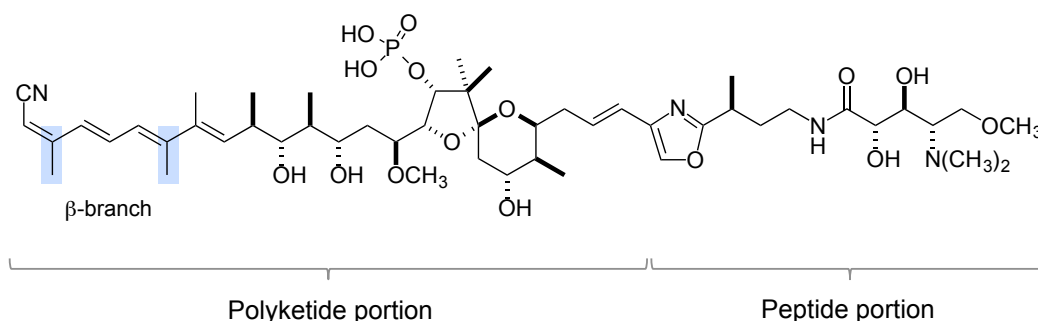


Fig. 43 Calyculin A の構造

第 3 節 海綿 *Discodermia calyx* 由来 KS ドメインの解析

D. calyx メタゲノム DNA の抽出

海綿 *D. calyx* より共生微生物を含むメタゲノム DNA を抽出した。複数種類の市販のゲノム DNA 抽出キット、また、その他様々な抽出方法を試したが、高純度のメタゲノム DNA を得ることができなかった。そこで、2005 年に報告されている *D. calyx* と同属の海綿 *D. dissoluta* のゲノム DNA 抽出方法¹³²⁾を参考に、フェノール-クロロホルム法により抽出した。その結果、高純度の *D. calyx* メタゲノム DNA を得ることに成功した。取得した DNA は、次項の KS ドメインの解析に用いた。なお、抽出したメタゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動に供した結果、主要な DNA が 40 kb 付近にあることを確認したことから (Fig. 45)、本章第 4 節においても、ここで取得した *D. calyx* メタゲノム DNA を用いてフォスミドライブラリーの構築を行った。

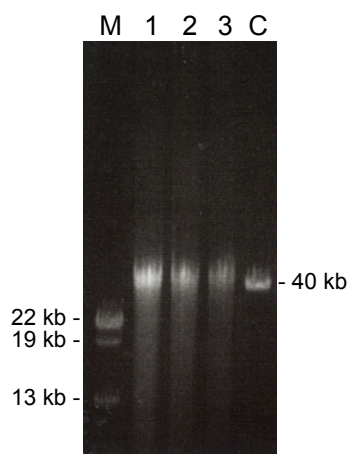


Fig. 45 フェノール-クロロホルム法を用いた海綿 *D. calyx* メタゲノム DNA の抽出

M; DNA marker、1-3; *D. calyx*メタゲノムDNA (applied volume; (1) 20 μ L、(2) 10 μ L、(3) 5 μ L)、C; control DNA (40 kb)

D. calyx メタゲノム DNA 由来 KS ドメインの解析

Calyculin A は PKS-NRPS ハイブリッド経路によって生合成されると予想されたことから、海綿 *D. calyx* に含まれる I 型 PKS を解析した。I 型 PKS の KS ドメインには、活性残基を含む DPQQ および HGTGT のアミノ酸レベルで保存された領域が認められる。そこで、これらの保存領域に特異的なプライマーを用い、*D. calyx* メタゲノム DNA を鋳型として PCR を行った¹⁴¹⁾⁻¹⁴⁴⁾。その結果、目的の遺伝子断片のサイズに相当する約 700 bp 付近に PCR 産物を得た (Fig. 46)。得られた PCR 産物を pT7 Blue vector へ導入し、58 種類のクローンについてプラスミド DNA を抽出後、シーケンス解析および NCBI protein BLAST による相同性解析を行った。その結果、解析した配列は *trans*-AT 型 KS (DCKS1-8)、*cis*-AT 型 KS (DCKS9-14)、*sup* (sponge ubiquitous polyketide) (DCKS15-19) および機能未知タンパク質の 4 種類に分類可能であった (Table 1)。さらに、8 種類の *trans*-AT 型 KS (DCKS1-8) について詳細に行ったところ、4 つの clade に分類可能であった¹⁴⁵⁾ (Table 2)。これらはいずれも calyculin A に認められる部分構造であり、calyculin A 生合成遺伝子の一部である可能性が示唆された。

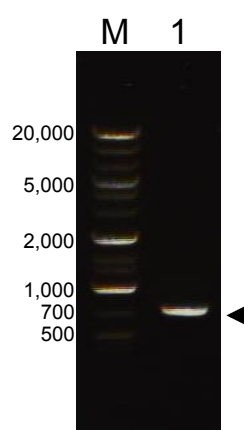
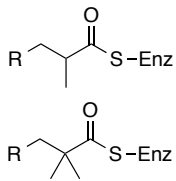
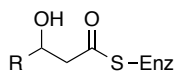
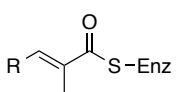
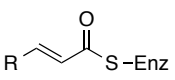


Fig. 46 海綿 *D. calyx* メタゲノム DNA の KS ドメイン遺伝子断片の増幅
M; DNA marker、1; PCR 産物

Table 1 海綿 *D. calyx* 由来 KS ドメインの分類

	No	Sequence similarity		Product	Identity/ Similarity	Accession code	Type
		Protein	Organism				
DCKS1	2	MInC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Macrolactin	62/75	ZP_10042662.1	<i>trans</i> -AT
DCKS2	11	VirF	<i>Streptomyces virginiae</i>	Virginiamycin	62/75	BAF50722.1	<i>trans</i> -AT
DCKS3	6	DszA	<i>Sorangium cellulosum</i>	Disorazol	62/76	AAY32964.1	<i>trans</i> -AT
DCKS4	3	RhiB	<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	Rhizoxin	69/81	CAL69889.1	<i>trans</i> -AT
DCKS5	2	DfnJ	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Difficidin	65/78	YP_001421789.1	<i>trans</i> -AT
DCKS6	3	RhiD	<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	Rhizoxin	70/81	CCJ27871.1	<i>trans</i> -AT
DCKS7	2	PsyD	Uncultured bacterium psy1	Psymberin	61/69	ADA82585.1	<i>trans</i> -AT
DCKS8	2	MInC	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Macrolactin	58/75	YP_007186189.1	<i>trans</i> -AT
DCKS9	5	DEBS	<i>Fischerella</i> sp.	6-deoxyerythronolide-B	66/80	ZP_08985492.1	<i>cis</i> -AT
DCKS10	2	JamM	<i>Lyngbya majuscula</i>	Jamaicamide	59/75	AAS98784.1	<i>cis</i> -AT
DCKS11	1	DEBS	<i>Stanieria cyanosphaera</i>	6-deoxyerythronolide-B	58/75	AFZ35459.1	<i>cis</i> -AT
DCKS12	2	McyG	<i>Anabaena</i> sp. 90	Microcystin	63/74	YP_006995587.1	<i>cis</i> -AT
DCKS13	1	DEBS	<i>Fischerella</i> sp.	6-deoxyerythronolide-B	65/76	ZP_08988402.1	<i>cis</i> -AT
DCKS14	2	DEBS	<i>Clostridium papyrosolvans</i>	6-deoxyerythronolide-B	75/84	ZP_08192096.1	<i>cis</i> -AT
DCKS15	1	Ketosynthase	Uncultured bacterium of <i>T. swinhoei</i>	Unknown	95/97	ABK01347.1	<i>sup</i>
DCKS16	1	Ketosynthase	Uncultured bacterium of <i>T. swinhoei</i>	Unknown	62/67	ABK01341.1	<i>sup</i>
DCKS17	1	Ketosynthase	Uncultured bacterium of <i>P. clavata</i>	Unknown	97/99	ABB73277.1	<i>sup</i>
DCKS18	1	PKS	Uncultured bacterium of <i>D. dissoluta</i>	Unknown	88/95	AAW84199.1	<i>sup</i>
DCKS19	1	Ketosynthase	Uncultured bacterium of <i>C. mycofijiensis</i>	Unknown	97/99	ABK01326.1	<i>sup</i>

Table 2 海綿 *D. calyx* 由来 *trans*-AT 型 PKS に属する KS ドメインの clade

	DCKS 2, 6, 7	DCKS 3	DCKS 4	DCKS 1, 5, 8
Substrate structures				
	α -Me	β -OH	α -Me, DB	DB
α -Me; methyl group at α -position, β -OH; hydroxyl group at β -position, DB; double bond				

第4節 メタゲノムライブラリーのスクリーニング

D. calyx メタゲノムライブラリーのスクリーニング

第3節において、*D. calyx* メタゲノム DNA には calyculin A の部分構造と一致する clade の *trans*-AT 型 KS が含まれることが判明し、calyculin PKS の一部である可能性が支持された。そこで、これらの配列を含む遺伝子を取得するため、*D. calyx* メタゲノム DNA より fosmid ライブラリー（平均挿入長; 35 kb、ライブラリーサイズ; 2.5×10^5 cfu）を構築した。さらに、DCKS4、5 および 8 に特異的なプライマーをそれぞれ設計し、構築した *D. calyx* メタゲノムライブラリーより PCR スクリーニングを行った（Fig. 47）。スクリーニングには、膨大な候補の中から効率的に目的のクローンを選別できる 3D-gel 法¹⁴⁶⁾を用いた。取得した陽性クローンについて挿入配列の末端シーケンスを解析した結果、いずれも PKS あるいは NRPS と高い配列相同性を示すことが判明した。そこで、各クローンの末端配列に対して新たにプライマーを設計し、同様の方法にてスクリーニングを繰り返した。その結果、最終的に 12 クローンの fosmid pDCYE1-12 を得た。さらに、PCR 法を用いた解析によって、DCKS4-8 が同一遺伝子上にコードされていることを明らかにした。

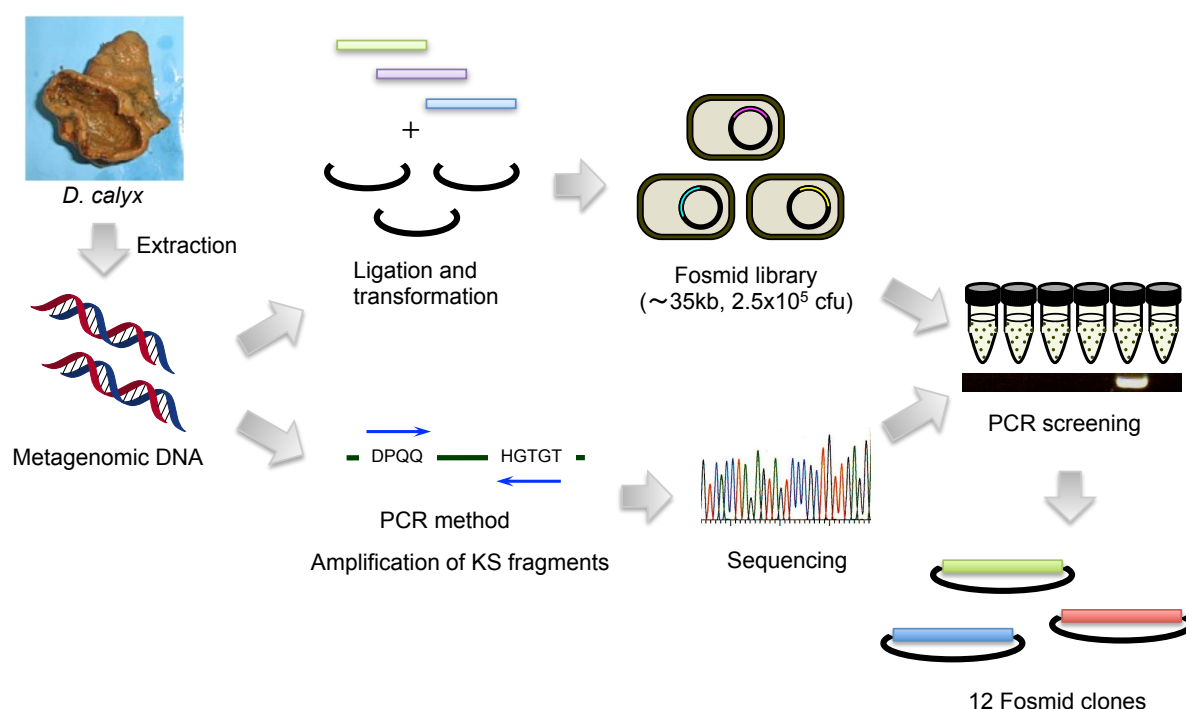


Fig. 47 海綿 *D. calyx* メタゲノムライブラリーからのスクリーニングの概要

HCS ドメインの探索

スクリーニングによって取得した pDCYE1-12 について、 β -branch の生合成に関与する修飾酵素をコードする遺伝子の有無を検討した。本章序論で述べたように、I 型 PKS の β -branch は β -branch cassette と呼ばれる HCS、2 つの ECH、KS⁰ および ACP によって生合成される (Fig. 33)。そこで、 β -branch cassette の 1 つである HCS ドメインに特異的な縮重プライマーを用いた PCR を行うこととした。これまでに報告されている β -branch を有するポリケタイドの生合成遺伝子クラスターから“HCS”とアノテーションされている ORF を NCBI データベースより抽出し、アライメントした (Fig. 48)。アミノ酸レベルでよく保存されている領域 CS(T)ESGID と FSYGSGC を見出し、この配列に特異的な縮重プライマー HCSF および HCSR を設計した。スクリーニングで取得したフォスミド pDCYE1-12 を鋳型 DNA として PCR を行った結果、pDCYE1 から約 700 bp の遺伝子断片が増幅されることを確認した (Fig. 49a)。そこで、PCR 産物を pT7 Blue vector へ TA クローニング後、シーケンス解析および NCBI protein BLAST による相同性解析を行った。その結果、pDCYE1 より増幅した遺伝子断片は、myxovirescin の 12 位の β -branch の生合成に関与する TaC (HCS) と最も高い配列相同性を示した¹⁴⁷⁾ (Fig. 50)。以上の結果より、pDCYE1 には HCS ドメインをコードする遺伝子配列が含まれることが判明した。

A ドメインの探索

フォスミド pDCYE1-12 について、NRPS をコードする遺伝子の有無を検討するため、A ドメインに特異的な縮重プライマーを用いた PCR を行った。プライマーは、2005 年に A. Ayuso-Sacido らによって報告された A3F/A7R¹⁴⁸⁾ を用いた。その結果、pDCYE2 を鋳型とした場合、目的の大きさである約 700 bp 付近に遺伝子断片の増幅を確認した (Fig. 49b)。増幅した遺伝子断片を HCS ドメインの場合と同様に TA クローニング後、そのシーケンスを解析した。その結果、pDCYE2 には少なくとも 2 種類の A ドメインが含まれることが明らかとなった (Fig. 50)。これらの A ドメインの基質結合に関与する 10 個のアミノ酸残基 NRPS コードを解析した結果、それぞれ Gly および Ser をアデニル化する A_{Gly} および A_{Ser} であることが強く示唆された。特に、A_{Ser} については rhizoxin¹⁴⁹⁾ のオキサゾール形成を担う A ドメインと最も高い配列相同性を示したことから、オキサゾールの生合成に関与することが期待された。

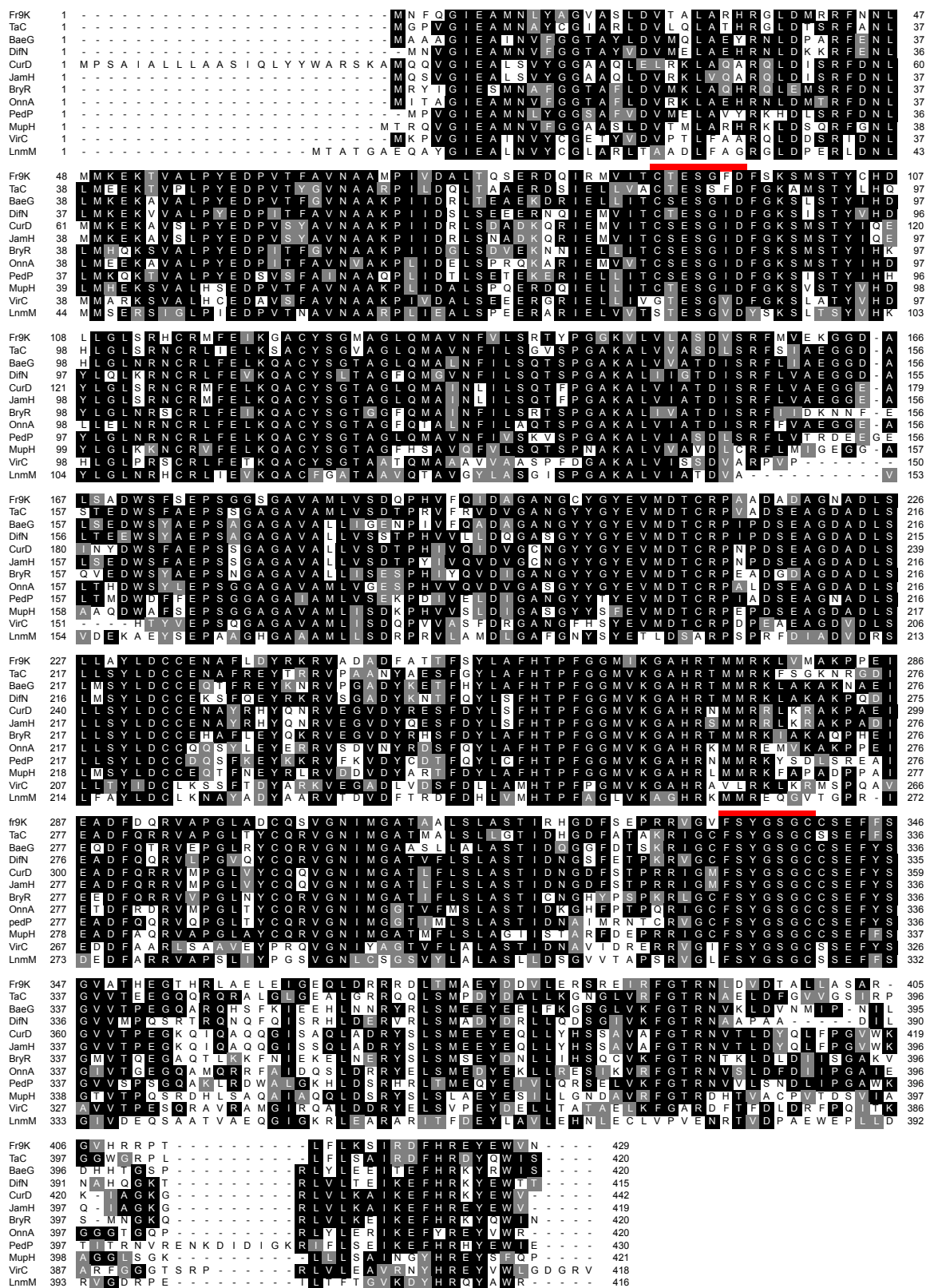


Fig. 48 β -branch 合成に關与する HCS ドメインのアライメント

Bae; bacillaene, Bry; bryostatin, Cur; curacin, Dif; difficidin, Fr9; FR901464, Jam; jamaicamide, Lnm; leinamycin, Mup; mupirocin, Onn; onnamide, Ped; pederin, Ta; myxovirescin, Vir; virginiamycin, ■; プライマーHCSF/HCSR設計領域

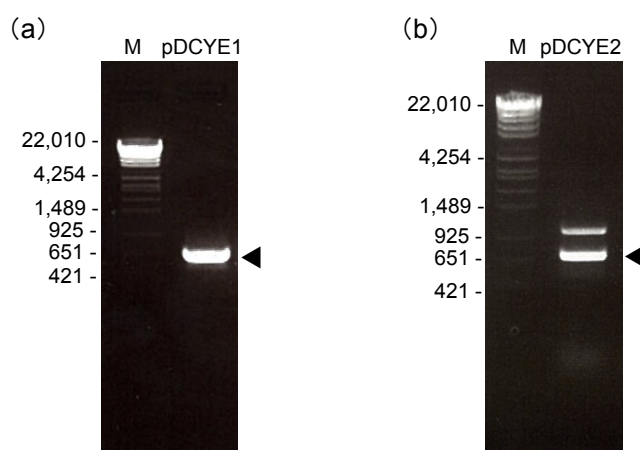


Fig. 49 HCS および A ドメイン遺伝子断片の増幅

(a) HCS ドメイン縮重 PCR (目的の遺伝子断片; 約 700 bp)、(b) A ドメイン縮重 PCR (目的の遺伝子断片; 約 700 bp)、M; DNA marker

(a)

	Homology protein	Organism	Product	Identities	Similarities
Cal HCS	TaC	<i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2	Myxovirescin	72%	85%
Cal A _{Gly}	Ta-1	<i>Paenibacillus polymyxa</i> SC2	Myxovirescin	61%	79%
Cal A _{Ser}	RhiB	<i>Burkholderia rhizoxinica</i>	Rhizoxin	65%	75%

(b)

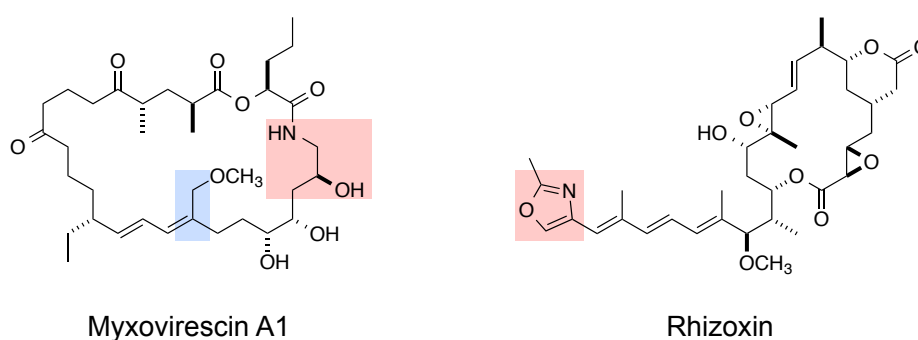


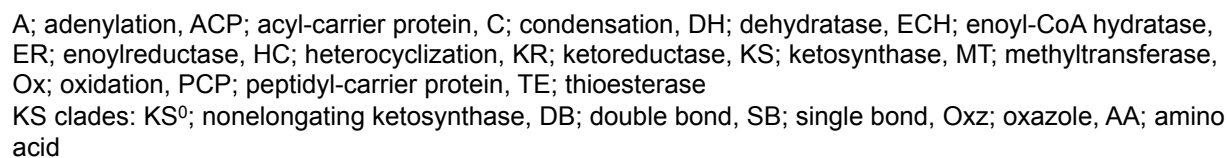
Fig. 50 フォスミド pDCYE1 および 2 に含まれる HCS ドメインと A ドメインの相同性解析

(a) NCBI データベースによる相同性解析、(b) Myxovirescin および rhizoxin の構造 (■; TaC が生合成に関与すると推測されるメチル基、■; Ta-1 および RhiB が生合成に関与する部分構造) ^{147), 149)}

第 5 節 *cal* 遺伝子の解析

pDCYE1-12 のシーケンス解析

第 4 節において、フォスミド DNA pDCYE1-12 には、 β -branch の生合成に関与する HCS ドメインおよび Gly、Ser のアデニル化を担う A ドメインがコードされていることを明らかにした。これらはすべて calyculin A に認められる部分構造であることから、pDCYE1-12 に calyculin A の生合成酵素がコードされている可能性が支持された。そこで、次世代シーケンサー Genome Analyzer II (Illumina) により pDCYE1-12 の DNA 配列を解析した。その結果、100 bp の塩基配列を 27,220,593 リード得た。*de novo* アッセンブリーの結果、約 217 kb のコンティグを取得した。多数のギャップや不確定な塩基が認められたため、Ion PGM™ (Life Technologies) によりシーケンスの再解析を行った。その結果、200 bp の塩基配列を 453,503 リード得た。取得したデータを Genome Analyzer II による解析で得られた 217 kb の配列に対して reference アッセンブリーを行ったところ、26 カ所の不確定塩基が残った。これらの不確定塩基をキャピラリーシーケンサーにて決定し、最終的に 217,478 bp の核酸配列を取得した。得られた遺伝子配列について、NCBI protein BLAST および PKS-NRPS analysis により解析した結果、pDCYE1-12 には全長約 150 kb におよぶ PKS-NRPS をコードする *calA-calI* および生合成過程における修飾反応に関与すると考えられる複数の ORF *calJ-calY* がコードされていることを明らかにした (Fig. 51, Table 3)。



(a) *cal* 遺伝子、(b) calyculin A 推定生合成経路

Table 3 *cal* 遺伝子の推定 ORF

ORF	Protein size (aa)	Proposed function	Sequence similarity		Identity/Similarity (%)	Accession code
			Protein	Origin		
<i>calY</i>	787	AT	Malonyl CoA-acyl carrier protein transacylase	<i>Oceanibaculum indicum</i> P24	54/71	ZP_11129640.1
<i>calX</i>	82	ACP	Acyl carrier protein	<i>Sorangium cellulosum</i> So ce56	57/79	YP_001613822.1
<i>calW</i>	409	KS ⁹	Beta-ketoacyl synthase	<i>Pelosinus fermentans</i> JBW45	65/81	ZP_15538843.1
<i>calV</i>	132	Hypothetical protein	Hypothetical protein ACP_1149	<i>Acidobacterium capsulatum</i> ATCC 51196	39/63	YP_002754252.1
<i>calU</i>	706	ABC transporter	ABC-type multidrug transport system, ATPase and permease component	<i>Pleurocapsa</i> sp. PCC 7327	44/66	YP_007079509.1
<i>calT</i>	424	HMG-CoA synthase like activity	3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase	<i>Leptolyngbya</i> sp. PCC 7375	70/80	ZP_18905080.1
<i>calS</i>	268	Enoyl-CoA hydratase	Enoyl-CoA hydratase/isomerase	<i>Clostridium papyrosolvens</i> DSM 2782	61/73	ZP_08192880.1
<i>calR</i>	249	Enoyl-CoA hydratase	PKS enoyl-CoA hydratase, pks-like protein	<i>Paenibacillus polymyxa</i> E681	63/77	YP_003871374.1
<i>calQ</i>	381	Putative phosphotransferase	Aminoglycoside phosphotransferase	<i>Klebsiella pneumoniae</i> DSM 44963	30/41	ZP_06974247.1
<i>calP</i>	231	Putative phosphotransferase	Chloramphenicol 3-O phosphotransferase	Uncultured bacterium AOCe2a2	31/52	ACS83703.1
<i>calO</i>	269	Glyoxalase	Glyoxalase/ bleomycin resistance protein/dioxygenase	<i>Rhizobium</i> sp. PDO1-076	38/51	ZP_13490391.1
<i>calN</i>	423	Hypothetical protein	Hypothetical protein BTH_II1215	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	28/47	YP_439411.1
<i>calM</i>	232	Putative phosphotransferase	Chloramphenicol phosphotransferase family protein	<i>Mesorhizobium amorphae</i> CCNWGS0123	31/47	ZP_09089298.1
<i>calL</i>	384	Protein phosphatase	Phosphoprotein phosphatase	<i>Burkholderia cenocepacia</i> H111	40/52	YP_002485801.1
<i>calK</i>	397	Transposase	Transposase IS4 family protein	<i>Nitrosomonas</i> sp. Is79A3	48/64	YP_004693916.1
<i>calJ</i>	563	Hypothetical protein	Unknown protein	Bacterium symbiont of <i>Theonella</i> <i>swinhoelipTSMAC1</i>	78/85	AFS60661.1
<i>calA</i>	3784		PKS/NRPS (A, MT, PCP, MT, KS ⁹ , ACP, KS, KR, ACP)			
<i>calB</i>	6683		PKS/NRPS (KS ⁹ , ACP, C, A, PCP, KS, DH, KR, MT, ACP, ACP, ER, KS, ACP, KS ⁹ , ACP, HC, HC)			
<i>calC</i>	4626		PKS/NRPS (A, PCP, Ox, Ox, KS ⁹ , ACP, KS, DH, KR, ACP, KS, KR, ACP)			
<i>calD</i>	375	Oxygenase	Flavin-dependent oxygenase	<i>Nostoc</i> sp. Peltigera membranacea cyanobiont [†]	68/83	ADA69238.1
<i>calE</i>	7932		PKS (KS ⁹ , DH, ACP, KS, ACP, KS, KR, MT, ACP, KS, KR, ACP, KS ⁹ , ACP, KS, MT, ACP, ACP, KS, KR, ACP)			
<i>calF</i>	5858		PKS (KS ⁹ , ACP, KS, KR, ACP, KS ⁹ , MT, ACP, KS, KR, MT, ACP, KS, KR)			
<i>calG</i>	5808		PKS (MT, ACP, KS, DH, KR, MT, ACP, KS, ACP, ACP, KS, DH, KR, ACP, KS)			
<i>calH</i>	4808		PKS/NRPS (ECH, ECH, ACP, ACP, KS, ACP, C, A, PCP, KS, DH, KR, ACP, KS ⁹)			
<i>calI</i>	2674		PKS/NRPS (DH, ACP, KS, ACP, C, A, PCP, TE)			

ペプチド部分の生合成

calA-calI にコードされている PKS-NRPS は 34 モジュールから構成され、約 130 kb におよんでいた (Fig. 51b)。上流部分に位置する *calA-calC* には NRPS と PKS のモジュールが交互に並んでコードされていた。NRPS コードより、本遺伝子クラスターの上流に存在する 3 つの A ドメイン CalA1、CalA2 および CalA3 の推定基質はそれぞれ Ser、Gly および Ser であった (Fig. 52)。まず、*calA* の最初の A ドメインにより Ser がローディングされた後、連続する 2 つの MT ドメインによって Ser のアミノ基と水酸基がメチル化され、calyculin A に特徴的なトリメチルセリンの部分構造の形成が支持された。その後、2 つの PKS モジュールが存在するが、モジュール 2 の KS ドメインには伸長反応に必須である 3 つの活性残基 Cys-His-His が保存されていないため、このドメインは機能しないと推測された (Fig. S1)。モジュール 3 においてマロニル-CoA が 1 分子付加され C2 ユニットが伸長すると考えられる。*calB* の上流には再度活性残基を失った KS ドメイン (KS⁰) を含むモジュールがコードされており、その後、2 つ目の NRPS モジュールが存在する。CalA2 の NRPS コードは 10 アミノ酸残基のうち 9 残基が Gly の NRPS コードと一致していたが、1 残基については通常 Leu または Met の部分が Thr に置換されていた。天然から C32 位がメチル化された類縁体 calyculin C が単離されていることを考慮すると、CalA2 の基質特異性は厳密ではなく、Gly と Ala をアデニル化する可能性が考えられる。なお、海綿における calyculin A と calyculin C の存在比は約 9:1 であることから、CalA2 の Gly および Ala に対する基質特異性も同等と推測される。さらに下流には PKS が存在する。まず、モジュール 6 で α -メチルオレフィン中間体が生成した後に、モジュール 7 の ER ドメインによってオレフィン部分が還元され飽和型の α -メチル構造が形成されると予想された。ER ドメインの配列を解析した結果、活性残基である Tyr が保存されていたことから、還元反応生成物は calyculin A と同じ L-体の立体化学を有することが支持された (Fig. 30、Fig. 53)。また、*trans*-AT 型 PKS において ER ドメインはモジュール外から働く場合が多く、このようにモジュール内に含まれる例は珍しい。その後、モジュール 8 には NRPS がコードされていた。Ser をアデニル化すると推測可能な CalA3 の上流と下流には、環化酵素 HC (heterocyclization) ドメインおよび酸化酵素 Ox (oxidation) ドメインがそれぞれ認められ、伸長した Ser はオキサゾリンを経由してオキサゾールへ変換されると推測された。ここまでの *cal* 遺伝子の配列情報から予測される構造は、calyculin A のペプチド部分の構造と非常に良い一致を示した。

	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517
Ser consensus	D	V	W	H	L	S	L	I	D	K
Cal A1	D	V	W	H	I	S	L	I	D	K
Cal A3	D	V	W	H	L	S	L	V	D	K
Cal A5	D	V	W	H	I	S	L	I	D	K
Gly consensus	D	I	L	Q	L	G	L/M	I	W	K
Cal A2	D	M	L	Q	I	G	T	V	W	K
Ala consensus	D	L	L	F	G	I	A	V	L	K
BaeN	D	V	S	N	M	A	I	I	Y	K
Cal A4	D	V	S	N	M	A	I	I	Y	K

Fig. 52 *cal* 遺伝子にコードされる A ドメインの NRPS コード

>CalB_ER

GDIDDLSLAASPLPELGKNEVRIAVCAFSLNFADLLCVRGLY■PNMPPYPF
TPGDEAAGIVLAVGDAVTRFQVGDAVVCMTPGCHTELLTCPEGQVYAKSA
NLSFEEACSLPIVTLTMLHAFRKADLQPGERILIQTAAGGVGLAAVQLAQ
HAGAEIYATAGSQAKLDYLRDLGVPHLINYRESDFEALLRLTGEGVDV
VINTLSGDSIQKGLNCLRQGGRYIEIAMAALKSTRSVDISVLNRNQTFFS
IDLGLLGSEQPERIRRAWEDMSHLLLEQGVIRPTVSKVFPFEAFRDAYSRL
DHRDNIGKVVV

■; Conserved tyrosine correlated with (2S)-methyl brach
■; NADPH binding site

Fig. 53 ER ドメインのアミノ酸配列

ポリケタイド部分の生合成

Ox ドメインによるポリケタイド鎖の減炭

3つの NRPS モジュールの下流には 90 kb におよぶ巨大な PKS モジュールが認められた。オキサゾールが形成した後の生合成中間体が calyculin A となるには、残り 25 の炭素原子の伸長が必要であった。しかしながら、PKS による炭素鎖の伸長は通常 C2 単位で起こることから、奇数の炭素鎖がどのように伸長されるのか疑問であった。一方で、*calC* の下流には 1.2 kb から成る flavin 依存性 monooxygenase (Ox) と配列相同性を有する *calD* が認められた (Fig. 51b)。このように PKS の中に Ox ドメインが含まれる例は過去に数例報告されており、FR901464 生合成遺伝子にコードされる Ox ドメイン (FR9H-Ox) については機能解析がなされている¹⁵⁰⁾。FR901464 の生合成過程において、FR9H-Ox は β -ヒドロキシチオカルボニル基を Baeyer-Villiger 酸化し、エステル結合を導入する (Fig. 54)。

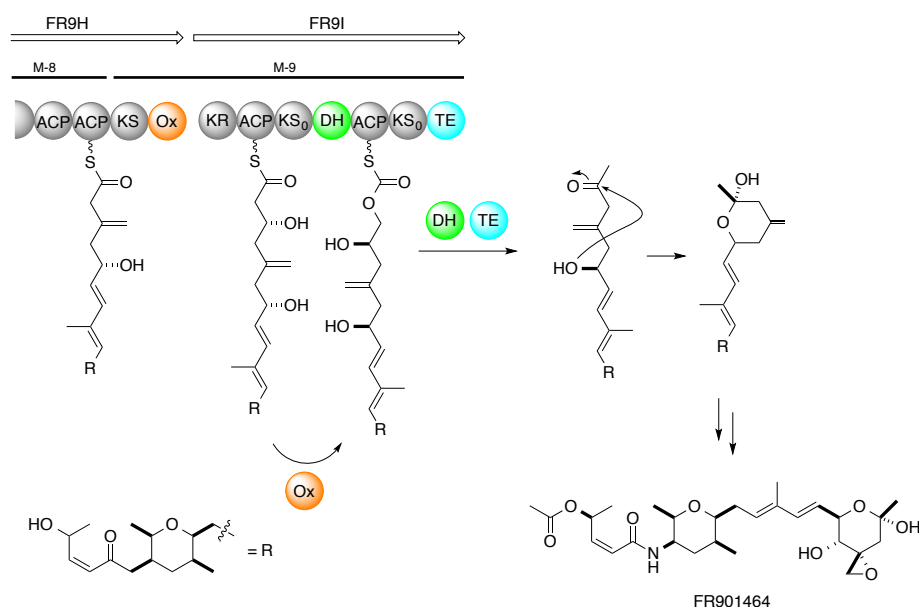


Fig. 54 FR901464 生合成における Baeyer-Villiger 酸化機構¹⁵⁰⁾

同様に CalD も Baeyer-Villiger 酸化を触媒すると考えた場合、減炭反応に関与する可能性が示唆された (Fig. 55)。cal 遺伝子の配列情報から、オキサゾールが生成後、モジュール 11 および 12 においてマロニル-CoA の伸長が 2 回起こると考えられた。その後、CalD によって生合成中間体の α -位が水酸化され、 α , β -ジオールが生じる。さらにモジュール 13 の DH ドメインによって脱水反応が起こり、エノール中間体が生じる。ケト・エノール平衡により生成した α -ケトチオエステル構造が再度 CalD により Baeyer-Villiger 酸化され、混合酸無水物中間体の生成が推測される。一方で、配列情報から予想されるモジュール 15 の KS ドメイン (KS12) は single bond を基質として受け入れることが支持された。これを考慮すると、Baeyer-Villiger 酸化によって生じた混合酸無水物はモジュール 14 の clade が不明な KS11 の Ser 残基から求核攻撃を受け、脱炭酸を伴った減炭が起こった後に、生合成中間体はモジュール 15 へ転移する可能性が示唆された。

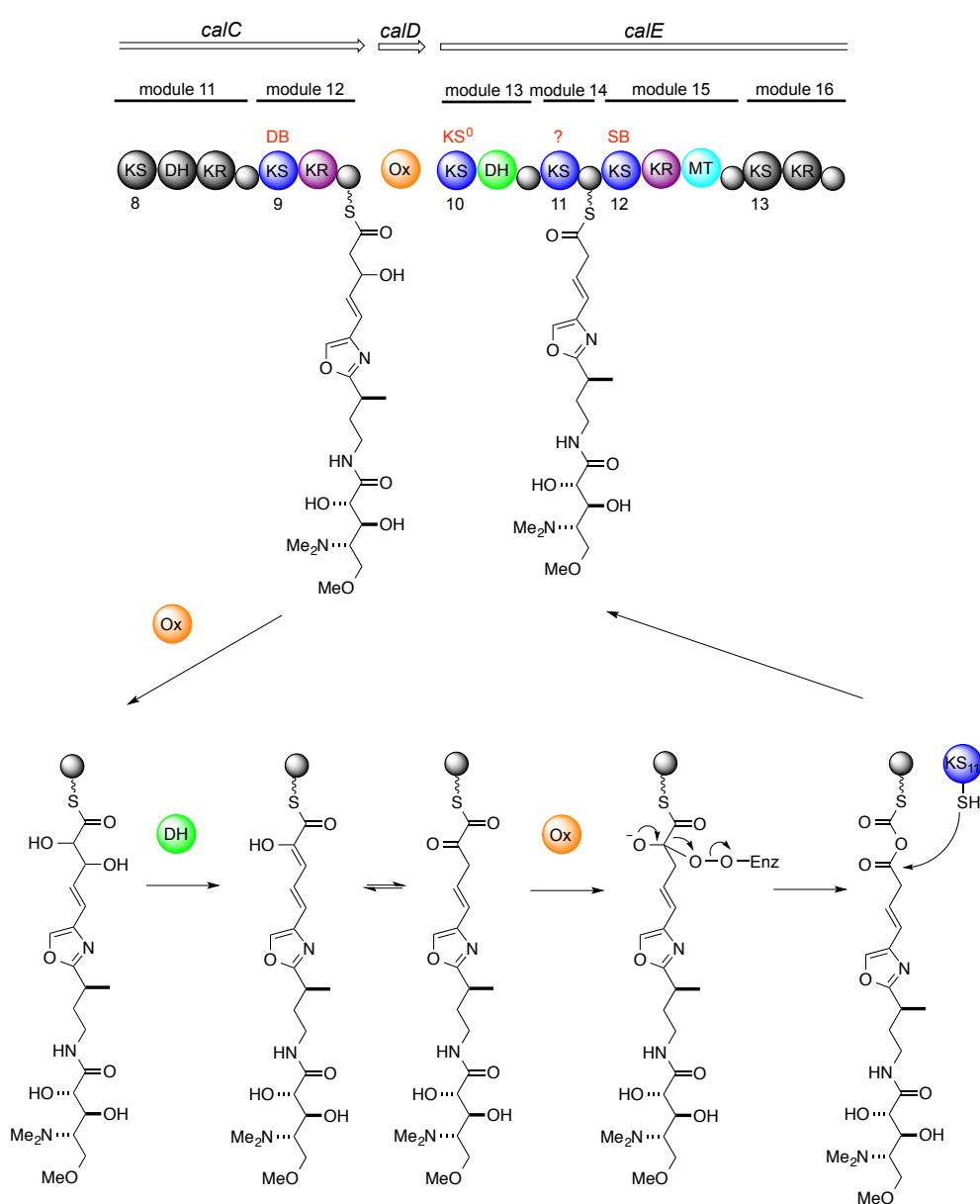


Fig. 55 Ox ドメインによる推定ポリケタイド鎖減炭機構

KR ドメインによって生じる水酸基の立体化学

cal 遺伝子には 13 の KR ドメインが認められ、NADPH の結合に関与する GGxGxxG モチーフおよび活性残基である Tyr はすべて保存されていた (Fig. 56)。このことから、コードされている KR ドメインはすべて β -ケトカルボニル基の還元反応を担うことが支持された。また、本章第 1 節で示したように PKS 産物の水酸基の立体化学およびオレフィンの幾何異性は KR ドメインによって制御される (Fig. 28)。特に 95 番目の Asp の有無が立体選択性に大きく関わると考えられている¹⁰⁰⁾。Table 4 に示すように、*cal* 遺伝子に認められた KR ドメインの配列から推測される立体選択性は、calyculin A の 17 位を除く全ての水酸基およびオレフィンの立体化学と完全に一致した。一方、17 位の水酸基はリン酸エステル結合部位であり、また、スピロアセタール環を構成する部分でもあることから、これらの修飾反応が互いに関与している可能性が示唆される。

3-34 region													NADPH binding site																			
													G G x G x x G																			
Cal_KR1	F	S	I	T	A	D	G	V	Y	V	I	S	G	G	T	S	G	I	G	L	E	I	A	R	Y	L	V	S	R	G	A	R
Cal_KR2	S	R	Y	R	H	G	G	V	Y	V	V	I	G	G	A	G	G	I	G	E	A	W	S	R	S	L	I	E	T	Y	Q	A
Cal_KR3	L	P	W	K	D	G	G	I	Y	L	I	T	G	G	A	G	G	L	G	R	L	L	V	R	E	I	A	N	H	C	E	H
Cal_KR4	P	V	F	R	S	G	A	T	Y	L	L	T	G	G	F	G	P	V	G	E	L	L	C	R	E	L	A	Q	R	-	Y	R
Cal_KR5	S	G	L	R	E	Q	G	V	Y	V	I	A	G	G	S	G	T	V	G	R	A	I	T	R	C	L	L	R	D	H	H	A
Cal_KR6	S	V	W	K	H	G	G	V	Y	L	L	T	G	G	M	G	G	L	G	S	I	C	A	R	E	I	A	A	R	T	H	G
Cal_KR7	T	H	F	K	R	H	G	T	Y	L	I	A	G	A	T	G	Y	I	G	E	Q	F	C	R	E	L	A	S	R	-	Y	Q
Cal_KR8	S	P	W	K	N	K	G	T	Y	L	I	T	G	G	L	G	A	L	G	L	I	F	A	R	E	I	A	A	T	T	T	G
Cal_KR9	T	G	L	R	Q	N	G	V	Y	V	I	V	G	G	S	G	T	V	G	R	I	V	T	E	H	L	M	R	V	Y	Q	A
Cal_KR10	S	G	L	K	Q	G	G	V	Y	V	I	L	G	G	S	G	V	V	G	Q	I	M	T	R	Y	L	I	R	E	Y	A	A
Cal_KR11	T	R	Y	R	K	G	G	V	Y	V	V	I	G	G	A	G	G	I	G	E	V	W	S	R	Y	V	I	E	Q	H	G	A
Cal_KR12	C	P	W	Q	D	R	G	V	Y	L	I	T	G	G	L	G	G	L	G	L	V	F	A	R	D	I	A	E	R	T	E	G
Cal_KR13	I	P	W	K	N	N	G	V	W	L	I	T	G	G	A	G	G	L	G	M	I	F	A	E	D	I	A	R	K	S	D	H

72-103 region													Conserved motif																				
													G V x H x A																				
Cal_KR1	I	R	R	E	S	G	P	-	-	-	-	I	K	G	V	V	H	S	A	G	V	Y	S	D	I	K	N	S	A	F	V	T	
Cal_KR2	I	R	Q	H	H	P	C	-	-	-	-	I	H	G	L	V	H	A	A	L	V	L	D	D	G	-	-	-	S	L	A	N	
Cal_KR3	I	V	R	N	H	G	N	-	-	-	-	L	H	G	I	I	H	A	A	G	V	L	D	D	D	-	-	-	F	I	I	R	
Cal_KR4	V	R	R	E	V	G	P	-	-	-	-	I	H	G	V	I	H	L	A	R	L	V	E	D	G	-	-	-	P	I	L	S	
Cal_KR5	I	R	A	Q	H	P	V	-	-	-	-	I	H	G	A	I	F	S	G	I	V	F	S	L	N	N	-	-	A	V	A	T	
Cal_KR6	I	R	K	A	F	G	R	-	-	-	-	L	D	G	I	L	H	T	A	G	L	I	Q	G	D	-	-	-	F	I	I	G	
Cal_KR7	I	K	Q	Q	V	G	T	-	-	-	-	I	D	G	V	A	N	L	T	R	T	H	E	N	R	-	-	-	M	I	A	M	
Cal_KR8	L	R	N	E	V	S	G	A	A	K	S	L	N	G	I	L	H	C	A	G	L	I	R	D	S	-	-	-	F	I	L	K	
Cal_KR9	I	K	Q	A	Y	A	T	-	-	-	-	I	H	G	A	I	F	A	G	L	V	F	H	L	E	N	-	-	A	V	D	K	
Cal_KR10	I	R	E	R	Y	E	T	-	-	-	-	I	N	G	A	I	F	S	G	L	V	F	D	H	L	E	N	-	-	S	V	A	Q
Cal_KR11	I	R	Q	R	H	P	R	-	-	-	-	I	H	G	V	I	H	S	A	I	V	L	L	D	K	-	-	-	S	L	A	R	
Cal_KR12	I	Q	T	A	F	G	G	-	-	-	-	L	N	G	I	L	H	S	A	G	V	H	R	D	N	-	-	-	F	I	I	N	
Cal_KR13	I	G	R	E	Q	G	T	-	-	-	-	L	D	G	V	L	H	C	A	G	I	V	K	D	S	-	-	-	F	I	L	K	

136-167 region													Active site																			
													Y x x x N																			
Cal_KR1	T	S	F	I	P	L	L	A	R	G	I	S	D	Y	A	M	A	N	A	F	L	D	F	F	S	A	W	Q	H	H	H	Q
Cal_KR2	T	S	F	D	R	A	A	G	Q	-	-	S	N	Y	A	A	G	C	T	F	E	D	A	F	A	H	Q	L	S	Q	T	W
Cal_KR3	S	G	V	F	G	N	V	A	Q	-	-	A	D	Y	A	A	A	N	G	F	L	D	A	V	A	T	A	H	-	-	-	-
Cal_KR4	M	G	A	F	G	I	R	G	S	-	-	A	D	Y	G	Y	S	A	A	F	Q	N	A	F	A	A	W	R	R	-	Q	M
Cal_KR5	Q	N	F	A	F	S	G	A	A	T	L	S	A	Y	A	T	G	I	T	F	S	D	T	F	V	A	S	L	Q	D	S	A
Cal_KR6	A	G	A	M	G	T	P	G	L	-	-	A	D	Y	A	A	A	N	A	F	M	D	A	Y	A	E	S	R	-	-	-	-
Cal_KR7	L	G	S	F	G	I	S	G	S	-	-	S	D	Y	A	Y	A	T	A	F	Q	N	A	F	A	R	Y	R	N	-	K	L
Cal_KR8	A	G	A	F	G	N	T	G	Q	-	-	A	D	Y	A	A	A	N	G	F	M	D	A	C	A	A	R	-	-	-	-	-
Cal_KR9	Q	A	F	S	F	L	S	S	G	D	S	A	G	Y	A	T	G	I	T	L	A	D	T	L	V	A	A	L	Q	D	K	A
Cal_KR10	Q	T	F	S	F	L	S	A	R	D	S	C	G	Y	A	T	G	I	S	F	A	D	T	F	V	R	S	I	E	D	-	A
Cal_KR11	Q	S	F	T	R	G	A	G	Q	-	-	S	N	Y	A	A	G	C	T	F	K	D	A	F	A	H	G	L	A	T	S	W
Cal_KR12	A	G	A	A	G	S	L	G	Q	-	-	A	D	Y	A	A	A	N	G	F	M	D	A	Y	A	A	Q	R	N	E	C	L
Cal_KR13	V	G	A	L	G	S	P	G	Q	-	-	A	D	Y	A	A	A	N	A	F	M	N	A	F	A	E	E	R	Q	-	-	-

Fig. 56 KR ドメインのアライメント

Table 4 KR ドメインの立体選択性

	Module	Asp95	Predicted product	Partial structure of calyculin A
KR1	3	+	β -D-OH	β -D-OH (C35)
KR2 (+DH+ER)	6	+	β -D-OH to single bond	single bond (C31)
KR3 (+DH)	11	+	β -D-OH to <i>trans</i> -orefin	<i>trans</i> -orefin (C26)
KR4	12	+	β -D-OH	unknown
KR5	15	-	β -L-OH	β -L-OH (C23)
KR6	16	-	β -L-OH	β -L-OH (C21)
KR7	19	-	β -L-OH	β -D-OH (C17, phosphate)
KR8	21	+	β -D-OH	β -D-OH (C15)
KR9	23	-	β -L-OH	β -L-OH (C13)
KR10	24	-	β -L-OH	β -L-OH (C11)
KR11 (+DH)	25	+	β -D-OH to <i>trans</i> -orefin	<i>trans</i> -orefin (C9)
KR12 (+DH)	27	+	β -D-OH to <i>trans</i> -orefin	<i>trans</i> -orefin (C5)
KR13 (+DH)	31	+	β -D-OH to <i>trans</i> -orefin	unknown

メチル基の導入

trans-AT 型 PKS において、多くの場合、 α -位のメチル化は各モジュール内の MT ドメインによって触媒される。*cal* 遺伝子には 9 つの MT ドメインがコードされており、これらは calyculin A のメチル基の位置と完全に一致した (Fig. 51b)。また、 β -位のメチル化は HCS と 2 つの ECH、KS⁰ および ACP で構成される β -branch cassette と呼ばれる複数の触媒酵素の複合反応により達成される。PKS-NRPS の上流には CalR (ECH)、CalS (ECH)、CalT (HCS)、CalW (KS⁰) および CalX (ACP) が認められ、これらの酵素によって β -位のメチル化反応が起こることが推測可能であった。また、過去に報告されている I 型 PKS において β -branch 形成に関与するモジュールには 2 つ ACP が連続して存在する。これらは通常の ACP には認められないアミノ酸残基 Trp と Tyr を保持おり、それぞれ ACP の構造維持と HCS との相互作用に関与することが報告されている¹⁵¹⁾。Calyculin A の 7 位および 3 位のメチル化が起こると考えられるモジュール 26 と 28 には 2 つの連続する ACP が存在し、これらすべてにおいて β -branch cassette 特有の Tyr 残基が保存されていることから、HCS のホモログである CalT と相互作用することが示唆された (Fig. 57)。また、モジュール 26 は KS と ACP のみで構成されており、上流に認められた CalR、CalS、CalT、CalW が 7 位のメチル化を触媒する可能性が示唆される。一方で、モジュール 28 には 2 つの ECH が存在しており、CalT および CalW との複合反応により 3 位のメチル化が進行すると考えられる。

10	CalIX	V D H T R E I L P E L G I M D Y P F Q R A D S L K D L G A N S L D R S E I L M M T L E A I N L K M P A V E F H G P E N I G E L T D	60	70
	CalA_PCP1	M L E I W E D L L G I M D I S L E D - - G F L E A G G N S V L S I S L I E R I N K T F G C S L T T T L F K Y P S I K E L S A		
	CalA_PCP2	L K G I S D L L M V G I D D L D P I S P F N E F G F D S V L S I S F A N R L N K E Y D L D L K P M V L F F E N P T I Q S F T T		
	CalA_PCP3	V Y R A L L D V L K I - - D G I D E H E S F A N Y G L D S I S A M V F S T R L E K R L D M E I P P H W L I D F P T I Q T L S E		
	CalB_PCP1	L I S A L A M A L R L P P E K I N C D K H L Q D Y G I D S L M G T D L I R G L E K A F S C K V Y G R D L L A H P S I N A L S A		
	CalB_PCP2	V L E I W K S V L S I D A I S T T D - - G F F E V G G D S I T A V R I V N Q I N Q Q C D L L L P T T E V F R H A S V Q A M A Q		
	CalB_PCP3	I R E S L A E A L A M A P S Q I H D R S F A A L G V D S I T A V R I V N Q I N Q Q C D L L L P T T E V F R H A S V Q A M A Q		
	CalB_PCP4	I R E S L G L S L H M P E E Q I R D D R P F S E Y G V D S I A V Q L V N R I N Q Q G F L L L Q T T V L F D Y N S V N D L T T		
	CalB_PCP5	L R E W I A D R L Q Q P A G R I S T S H R F F E L G L D S V Q L T E L A R E L Q K H T G D - F P A T L L F E H I T I A D L A S		
	CalB_PCP6	L K Q M I G E I L G I E P A Q L P T R K P L S D L G F S S L C A L S L K S M L E Q E F N R E I P L V G I D V Y A T L E Q L T V		
	CalC_PCP1	L A L F G E A L N V P - - D L T V S D D L F D V G A T S F T M V R M V E Q V D E H F G I S V P I D M F L D Q P T V A A I A E		
	CalC_PCP2	L K T L I A Q V S E I P I S R L N E R A T F D T Y G L T S A M I T K L T A L E K D L G E - C S K T M F F E Y Q S I Q D L A D		
	CalC_PCP3	F K S L L C D T L R L P T H R I R A E E P L E R Y G I D S I M V M Q M T N Q L E T V F G S - L S K T L F F E Y Q T L A E L T E		
	CalC_PCP4	I R A T L A E I L E I - - D D I D E N Q P F P D Y G L D S I S G M R L T V S L E K K L A R E I D A Q W L I D F P T V K S L S Q		
	CalE_PCP1	L R R R I A D F L K C E L E E V P L D E S L E P L G L D S I A V N E L T D Q L G R K L N I E I P A T T M F E Y T N I N D V A T		
	CalE_PCP2	L R R I F A Q L L E V S V D D I D L D E S V S E F G F D S L K I T S L S E A I N A R F G L H T H P P D I F E F A T P G E L A A		
	CalE_PCP3	I L D S L S Q T I K I E P D E I E R D V A F S D Y G I D S I L G V G F V N R I G D T L G V S L N T A I L F D Y V N T T E L T S		
	CalE_PCP4	L I R L F A E V T R L A E T R I N P H E P L E T Y G I D S L V V T W I N R S L E K A L G P - V S K T M F E Y F Q T L D A L A Q		
	CalE_PCP5	L A Q M F S R I L G L A T A E I E E I G S F Q E M G I N S V N A L E L L E A I N T R F H L L E P T S L V F D C P T L E A L A V		
	CalE_PCP6	I A N L S A A L E L A T S R I D E E S F A D Y G V D S I T G S N L I N K I N R A L A I D L N T T T L F D Y N S V N Q L A E		
	CalE_PCP7	I V G E L A E A L G L A P R I D H D E S F A D Y G V D S I T G S N L I N K I N R A L A I D L N T T T L F D Y N S V N Q L A E		
	CalE_PCP8	V R S T F S E V M R V - - A E V D P K T D F S S Y G L D S V G A M Q F A T R L Q K R L K E I E P Q W L I D H P T I D S F S A		
	CalF_PCP1	L R H L L A P Q L K I E A G E L N L D M P F E Q W G F D S I L V L R L A E T L H R D H G F A V E A A H F F E T T P R S L A A		
	CalF_PCP2	L C Q L L G S T I G L D A E D I D A Q E P L E S Y G I D S V L I M Q L T D A L E A V F G A - L S K T L F Y Q Y L N L A D L A D		
	CalF_PCP3	L I T I F S R V L G F E K R E I E E N D N F E D L G I S S I N A V E L L E A I N T A F D L Y L P T S I V F E C N D L D S L S E		
	CalF_PCP4	I R Q S L S Q S L N L P T G D I D G R I P F S D Y G I D S I L G V S F I N Q A N E S L D I S M N T T I L F D Q T T V D D L T D		
	CalG_PCP1	I R E A L A H S L K I D - E A V E T D I P F S D Y G I D S I L G V R F V D Q I N E G L G L S L N T A I L F D Y T T V D R L A G		
	CalG_PCP2	I K R I V A S T L R M S S R Q L D T A Q P F I E M G L D S I L V V H L T N A M R K H F D N - I T S T L F F E V Q T I D A L V D		
	CalG_PCP3	L T A S L A D A L F M Q V D D I S L D K P F I E M G L D S I I G V E W I Q T I N A T Y E L S L P A T R L D S P N I R E L A D		
	CalG_PCP4	V R D M L A E A L F M Q P G E V D I D T P F I A M G L D S I I G V E W I Q T I N A T Y E L S L P A T R I Y D F P T I C E F A A		
	CalG_PCP5	F R Q L S S V L K I P V E R I L G D E P F E N Y G I D S I I V V K L S T G L E E V F G P - I S K T I F F E Y G N L K E I T A		
	CalH_PCP1	L R T S L A E E L G M E R D M V D E T I P L T E L G L D S I T G V T W I R R I N R H Y G L D I A T A R L Y D F S N L N A F A R		
	CalH_PCP2	L R T M L A E E L G M E P E R V E D H A P L T E L G L D S I T G V T W I R R I N R H Y D M D I S A A K I Y D H A T L A A F A Q		
	CalH_PCP3	L V A L I A D L V E L P Q E Q I E R D R P L Q Y L G W D S V L T L Q M V R L D E R F A V T L S N R E L L E H D T V A S L V A		
	CalH_PCP4	V L E L W R T V L Q I D N I A L D D - - A F F E V G G D S L N A V I L A E K I Q E R L G C D F T A A L L Q Y P K V A A V A D		
	CalH_PCP5	V S G V L A D T T R S A R E K I R P E M S F E Q L G V D S I L Q M S V I E A L E K V T G E - L P K T L F F E Y P N L N E L V D		
	CalI_PCP1	V R H Q L A D A V G I P A G T L A V D A N L M D V G M A S T Q L V L A A D L E R E A K I E L D P T L F F E Y P N I R E L A A		
	CalI_PCP2	L R Q L V A I Q L G Q P I E R I E A G H G Y L E V G L D S R G L V A L V Q G V S H L Q E N F S P G L L F E H T I D A F A D		
	CalI_PCP3	L A G I W Q E V L G Q V R I G V D D - - H F F F E L G G H S L L G L Q L L T K I D R I F G R N L P L S T L L E A P H L S E L A A		

Fig. 57 ACP のアライメント

■; Phosphopantetheine binding residue, ■; Important residue for β -branching ACPs structure and function, ■; Critical residue for interaction with HCS

KS ドメインの clade

cal 遺伝子に含まれる KS ドメインについて、既に報告されている *trans*-AT 型 PKS に属する KS ドメインの配列と系統樹解析を行った (Fig. 51b, Fig. S2)。その結果、配列情報から予想される KS ドメインが受け入れる基質の部分構造は calyculin A と良い一致を示した。ただし、モジュール 14 の KS11 については既知の KS ドメインと相同性が認められず、clade が不明であった。KS11 の上流では CalD (Ox) による減炭反応が推測されたことから、この過程で生じた混合酸無水物を基質として受け入れる新たな clade の可能性がある。また、KS5、KS11 および KS26 の 3 つのドメインについては、伸長反応に必要な活性残基 Cys-His-His が保存されているが (Fig. S1)、calyculin A の骨格構築には必要ない。*trans*-AT 型 PKS において、このように活性残基を保持しながらも生合成過程においてスキップされるドメインやモジュールが存在する例が報告されており¹⁵²⁻¹⁵⁴、*cal* 遺伝子に認められたこれらの KS ドメインも同様にスキップされる可能性が示唆される。さらに、活性残基が保存されていない KS⁰ が複数認められた。KS⁰ の機能や存在意義について現段階では不明であるが、これらの多くは PKS と NRPS の中間部分や、メチル化やスピロアセタール環形成、オレフィン構造の異性化など、修飾反応が起こると予想される位置に存在する傾向が認められた。このことから、このような修飾反応によって導入される官能基や部分構造は calyculin A の構造において不可欠であり、calyculin A の分子骨格が精緻に創り上げられたことが示唆される。

cal 遺伝子下流の解析

Calyculin A の末端部分であるテトラエンが生合成されると考えられるモジュールの下流には予想外のモジュールが認められた。モジュール 30 の A ドメイン CalA4 は、基本的な NRPS コードとは不一致であったが、Ala をアデニル化する bacillaene の生合成酵素 BaeN¹⁵⁵ の NRPS コードと完全に一致しており、Ala が基質であることが支持された。また、その後、モジュール 31 によって 1 分子のマロニル-CoA が伸長されると考えた。その下流のモジュール 32 は KS⁰、DH、ACP で構成される。この DH ドメインは、脱水反応の際のプロトン供与体である DxxxQ/H モチーフの Asp が Asn へ置換されていることから、従来の脱水反応触媒酵素としての機能は持たず、 α 、 β -位の二重結合を β 、 γ -位へシフトする異性化に関与することが推測可能であった^{111, 112}。二重結合の β 、 γ -シフトによって生じたエナミド構造が加水分解されることで、末端アミドの類縁体である calyculinamide A が生合成されると予想した (Fig. 58)。このような加水分解反応は、myxothiazol の末端部分の生合成経路において、同様の機構が推測されている¹⁵⁶。さらに、アミド部分の脱水により最終的に calyculin A のニトリルが形成すると推測した。なお、アミドからニトリルの生成機構の推定経路は第 3 章で述べる。

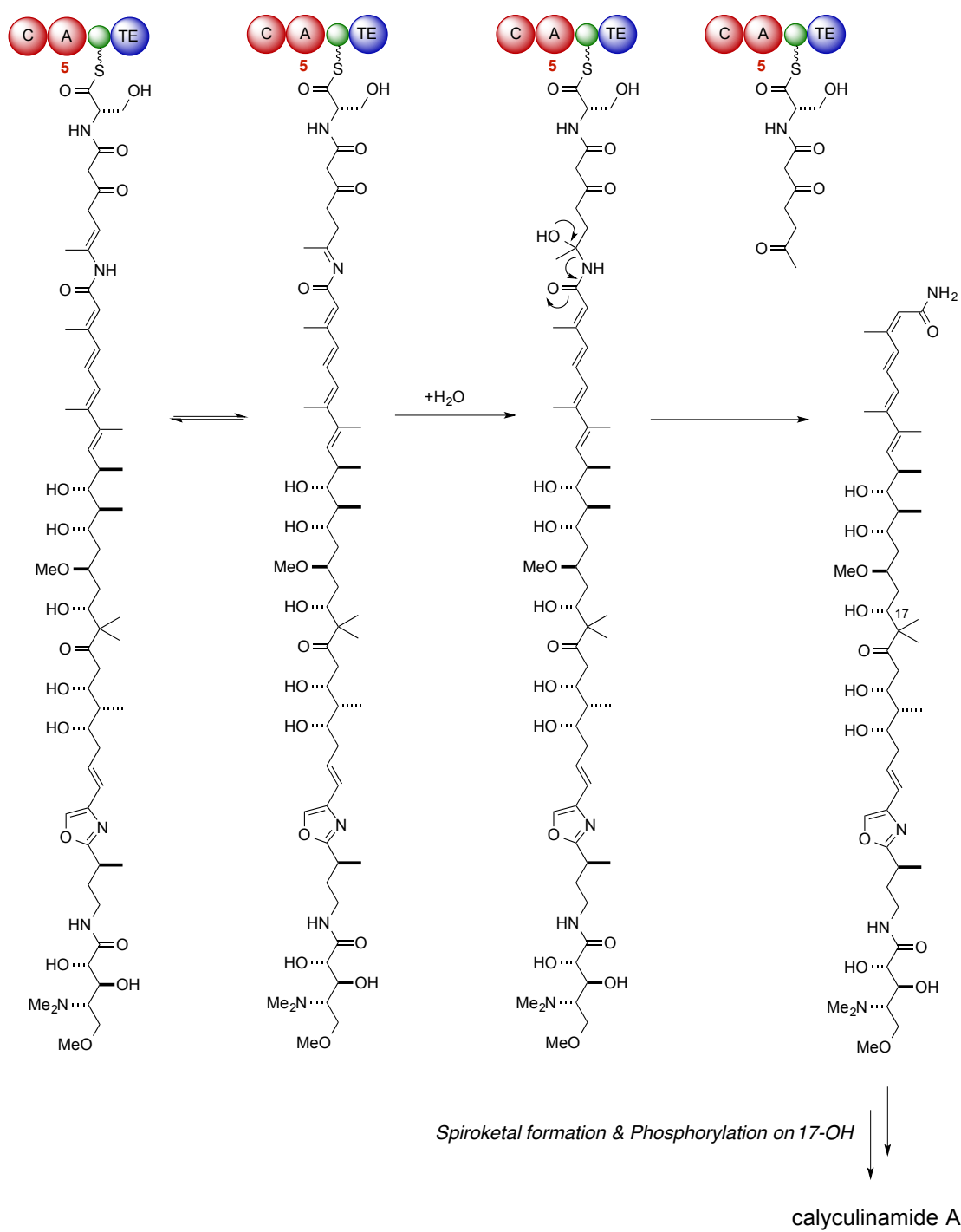


Fig. 58 末端アミド構造の推定生成機構

その他の修飾酵素

calA の上流には金属依存性タンパク質脱リン酸化酵素と 40%の配列相同性を有する *calL* が認められた。*calL* がコードするタンパク質 CalL は、(i) calyculin/phosphocalyculin 結合タンパク質、(ii) phosphocalyculin 脱リン酸化酵素 (第 4 章で詳しく述べる)、(iii) 転写制御調節脱リン酸化酵素としての機能を有する可能性が推測される。CalL を大腸菌にて異種発現後、機能解析を試みたが、詳細な機能解明には未だ至っていない。また、さらに上流には 3 種類のリン酸基転移酵素と相同性を示す *calM/P/Q* がコードされていた。これらはいずれも抗生物質耐性に関与するバクテリア由来のタンパク質と配列相同性を示した。Calyculin A は構造中にリン酸基を有することから、このいずれかが calyculin A のリン酸化を担っている可能性が示唆された。詳細な解析については、第 3 章で述べる。

cal 遺伝子の水平伝播の可能性

calA の上流に存在する *calJ* は、八丈島産海綿 *T. swinhoei* の共生微生物 ‘*Candidatus Entotheonella factor TSY1*’ に由来する unknown protein ORF5 および ORF16 (bacterium symbiont of *Theonella swinhoei* pTSMAC1)^{124), 157)} とアミノ酸レベルで 78% (similarity; 85%) の高い配列相同性を示した。‘*Candidatus Entotheonella factor TSY1*’ 由来の本タンパク質は、polytheonamide 生合成遺伝子クラスターの両端にコードされている¹²⁴⁾。それに加えて、*cal* 遺伝子の両端には、約 1 kb の完全に同一の核酸配列が認められた。これらの核酸配列は *cal* 遺伝子の水平伝播の可能性を示唆している。

第 6 節 *cal* 遺伝子のトランスクリプトーム解析

逆転写 PCR による *cal* 遺伝子の発現解析

海綿 *D. calyx* における *cal* 遺伝子の発現の有無を検討するために、逆転写 PCR を用いたトランスクリプトーム解析を行った。海綿 *D. calyx* より total RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として *cal* 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR を行った結果、目的の遺伝子断片の増幅を確認した。以上の結果より、*cal* 遺伝子は海綿 *D. calyx* において発現していることを明らかにした (Fig. 59)。

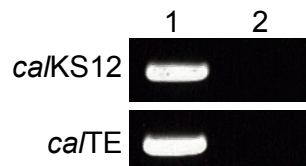


Fig. 59 逆転写 PCR による *cal* 遺伝子の発現解析

1; *D. calyx* cDNA、2; *D. calyx* total RNA (negative control)

第 7 節 小括

本章において、*trans*-AT 型 PKS 特有の KS ドメインの配列と基質の部分構造との間に認められる相関性を利用し、メタゲノムマイニングによる calyculin A の生合成遺伝子の取得を目指した。まず、KS ドメインの解析から、海綿 *D. calyx* には *cis*-AT 型、*trans*-AT 型および *sup* に分類される I 型 PKS が存在することを明らかにした。さらに、取得した *trans*-AT 型 KS ドメインの clade は calyculin A に認められる部分構造と一致していたことから、*D. calyx* メタゲノムライブラリーよりこれらの配列をコードする遺伝子を探索した。スクリーニングにより得られたフォスミド pDCYE1-12 の挿入配列を次世代シーケンサーにて解析した結果、約 150 kb におよぶ PKS-NRPS をコードする *cal* 遺伝子の配列を得た。本生合成遺伝子は、これまでに報告されている *trans*-AT 型 PKS の中でも最大であった。*cal* 遺伝子の配列を詳細に解析した結果、A ドメインの基質特異性、KR ドメインの配列から予想される水酸基の立体化学とオレフィンの幾何異性、MT ドメインの位置、KS ドメインの *calde* および全体のモジュールの並びは calyculin A の構造と非常に良い一致を示したことから、*cal* 遺伝子が calyculin A の生合成遺伝子であることが強く示唆された。さらに、逆転写 PCR による解析から、*cal* 遺伝子は海綿で発現していることを明らかにした。また、*cal* 遺伝子にはイントロンが認められなかったことから、本遺伝子が原核生物由来であることが判明した。

第 2 章 Calyculin 生産菌の特定

第 1 節 序論

海綿動物を起源とする生物活性物質の中には、陸上微生物由来二次代謝産物と構造上類似しているものや昆虫など生物種を超えて類縁化合物が単離されている例が複数ある。これらの知見を根拠に海綿由来生物活性物質の多くは共生微生物が生産を担っていることが長年疑われてきた。しかしながら、そのほとんどが現在の技術では難培養性であるため、真の生産者の同定は困難であった。海綿を起源とする二次代謝産物の生産者に関する研究の始まりは今から 30 年以上前に遡る。1983 年、D. J. Faulkner らのグループにより、海綿 *Aplysina fistularis* 由来二次代謝産物 aerothionin および homoaerothionin が海綿細胞に局在することが報告された¹⁵⁸⁾。1984 年には、伏谷らによって海綿に由来する最初の生物活性ペプチドとして *Discodermia kiiensis* より discodermin A が単離・構造決定された¹⁵⁹⁾。Discodermin A は構造中に D-体のアミノ酸や *tert*-Leu といった異常なアミノ酸を有しており、同様の部分構造が放線菌 *Streptomyces bottropensis* 由来 bottromycin A²¹⁶⁰⁾ に認められたことから、論文中では “*It is interesting to speculate whether this unusual peptide is biosynthesized by the sponge or produced by an associated organism.*” と述べられている。その 10 年後の 1994 年、D. J. Faulkner らによって海綿 *Dysidea (Lamellodysidea) herbacea* の乾燥重量 12% を占める polybrominated biphenyl ethers 類がシアノバクテリアに局在することが示された¹⁶¹⁾。さらに、1996 年には、パラオ産海綿 *Theonella swinhoei* の密度勾配遠心法による細胞分画が試みられ、シアノバクテリアの他に、単細胞状および単細胞が数珠状に連なった特徴的なフィラメント状バクテリア ‘*Candidatus Entotheonella palauensis*’ が存在することが報告された^{162), 163)}。*T. swinhoei* 由来の二次代謝産物の局在を解析した結果、theopalauamide はフィラメント状バクテリア画分で、swinholid A は単細胞画分で検出されたことから、これらのバクテリアがそれぞれの化合物の生産菌であることが示された。また、2008 年には、酒井らのグループによって海綿 *D. herbacea (L. chondrodes)* より単離された興奮性アミノ酸 dysiherbaine がシアノバクテリア *Synechocystis* sp. に局在することが報告されている¹⁶⁴⁾。このように過去 30 年間の海綿由来二次代謝産物の生産菌の解析例は少数であり、それらはいずれも化合物の局在に基づく報告であった。一方で、2005 年に W. H. Gerwick らのグループは、前述の polybrominated biphenyl ethers の生合成遺伝子をコードするシアノバクテリアを *Oscillatoria spongeliae* と同定した¹⁶⁵⁾。また、2004 年に J. Piel らによって報告された八丈島産海綿 *T. swinhoei* 由来の onnamide 生合成遺伝子である *onn* 遺伝子は、海綿由来生物活性物質の生合成遺伝子として初めての単離例であり、原核生物由来であることが明らかにされた¹³⁰⁾。その 10 年後、*onn* 遺伝子をコードするバクテリア ‘*Candidatus Entotheonella factor TSY1*’ が onnamide 生産菌として同定された¹⁵⁷⁾。これまでに報告されている遺伝子レベルでの生産菌特定の成功例はわずか 2 例であり、海綿に由来する二次代謝産物の生合成研究や生産菌の探索が困難であることを示している。しかしながら、海綿由来生物活性物質の真の生産者を突き止めることは、実験室下での培養条件の確立や量的な安定供給に繋がることから、海綿由来二次代謝産物の臨床応用を目指す上でも重要な知見であ

る。本章では、calyculin A の真の生産者の同定を目指した。第 1 章において、取得した *cal* 遺伝子にはイントロンが認められなかったことから、calyculin A の生産者は原核生物、つまり海綿に共生するバクテリアであることが示唆された。そこで、*cal* 遺伝子をコードするバクテリアを特定することにより calyculin 生産者の同定を目指した。

第 2 節 海綿 *Discodermia calyx* 共生微生物の解析

16S rRNA 解析による海綿 *D. calyx* 共生微生物の多様性

海綿 *D. calyx* に共生する微生物の多様性を遺伝子レベルで検討するため、16S rRNA 解析に着手した。*D. calyx* メタゲノム DNA を鋳型とし、16S rRNA に特異的なプライマー¹⁶⁶⁾ を用いて PCR を行った結果、約 1,500 bp 付近に目的の遺伝子断片の増幅を確認した (Fig. 60)。得られた PCR 産物を pT7 Blue vector ヘクローニング後、無作為に 30 クローン選び、その挿入配列を解析した。その結果、取得したクローンはいずれも異なる核酸配列を有しており、それぞれ異種バクテリアに由来するものであった。NCBI nucleotide BLAST による相同性解析を行った結果、30 種類の 16S rRNA は全て難培養性バクテリア (uncultured bacterium) に由来する配列と最も高い相同性を示し、そのほとんどが海綿を起源とする微生物であった (Table 5)。さらに、系統樹解析の結果、*D. calyx* メタゲノムより取得した 16S rRNA は、 α -, γ -, δ -proteobacteria や Chloroflexi など様々なバクテリアに由来することを明らかにした (Fig. 61)。以上の結果より、これまでに報告されている様々な海綿と同様に、*D. calyx* にも多様な微生物が共生することが示唆された。また、その中には *D. calyx* と同じ Theonelladae 科に属するパラオ産海綿 *T. swinhoei* に共生する主要なバクテリアとして報告された ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. が内在することを 16S rRNA レベルで明らかにした。

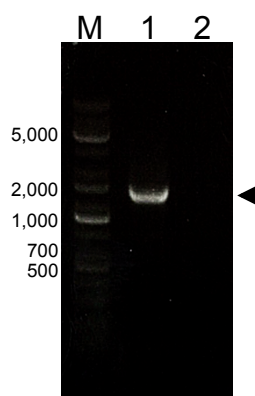


Fig. 60 *D. calyx* メタゲノム DNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子断片の増幅

M; DNA marker、1; *D. calyx* メタゲノム DNA、2; no template (negative control)

Table 5 海綿 *D. calyx* 由来 16S rRNA の相同性解析

<i>D. calyx</i> _SB	Closest bacterium	Source	%	Accession No.
1	Uncultured bacterium clone HH-E12	<i>Haliclona hogarthi</i>	99	GU981905
2	Uncultured bacterium clone GBc128	<i>Geodia barretti</i>	98	JQ612281
3	Uncultured bacterium clone GBc121	<i>Geodia barretti</i>	97	JQ612303
4	Uncultured Chloroflexi bacterium clone CtgComparison_2	<i>Aplysina cauliformis</i>	99	KF286001
5	Uncultured Entotheonella sp. clone Dd-Ent-A87	<i>Discodermia dissoluta</i>	97	AY897123
6	Uncultured Acidobacteria bacterium clone XA2F04F	<i>Xestospongia testudinaria</i>	99	FJ269280
7	Uncultured Chloroflexi bacterium clone PK016	<i>Plakortis sp.</i>	99	EF076083
8	Uncultured bacterium clone TO10-919_C30	<i>Ircinia oros</i>	99	JX206635
9	Uncultured Entotheonella sp. clone Dd-Ent-A87	<i>Discodermia dissoluta</i>	98	AY897123
10	Uncultured gamma proteobacterium clone ONGS206	coastal soil	96	JX241001
11	Uncultured actinobacterium clone LSI107H8f_c02	<i>Aplysina cauliformis</i>	99	KF286051
12	Uncultured microorganism clone WGA_7.12.-5G	<i>Aplysina aerophoba</i>	98	JN002377
13	Uncultured bacterium clone GBc093	<i>Geodia barretti</i>	98	JQ612351
14	Uncultured bacterium clone GBc138	<i>Geodia barretti</i>	99	JQ612186
15	Uncultured bacterium clone B17/GW947	<i>Vaceletia crypta</i>	98	HE817794
16	Uncultured Chloroflexus sp. clone XA3A12F	<i>Xestospongia testudinaria</i>	97	FJ481252
17	Uncultured bacterium clone GBc005	<i>Geodia barretti</i>	98	JQ612231
18	Uncultured bacterium clone IS-67	<i>Ircinia strobilina</i>	99	GU982167
19	Uncultured delta proteobacterium clone BZ40D8f_f09	<i>Aplysina cauliformis</i>	99	KF286212
20	Uncultured bacterium clone XB3A11F	<i>Xestospongia muta</i>	99	HQ270322
21	Uncultured bacterium clone BA88-C18	<i>Ircinia felix tan morph</i>	99	JX280351
24	Uncultured bacterium clone GBc019	<i>Geodia barretti</i>	99	JQ612206
25	Uncultured Chloroflexi bacterium clone XD2033	<i>Xestospongia testudinaria</i>	97	JN596763
26	Uncultured bacterium clone GBc038	<i>Geodia barretti</i>	99	JQ612356
27	Uncultured bacterium clone B17/GW947	<i>Vaceletia crypta</i>	98	HE817794
28	Uncultured Chloroflexi bacterium clone PK017	<i>Plakortis sp.</i>	98	EF076100
29	Uncultured bacterium clone GBc089	<i>Geodia barretti</i>	99	JQ612195
30	Uncultured bacterium clone 1101F18	soybean stem	98	AB459757
31	Uncultured marine bacterium clone MS2-15	marine sediment	99	GU368020
32	Uncultured bacterium clone B4-72	permafrost soil	99	KF494546

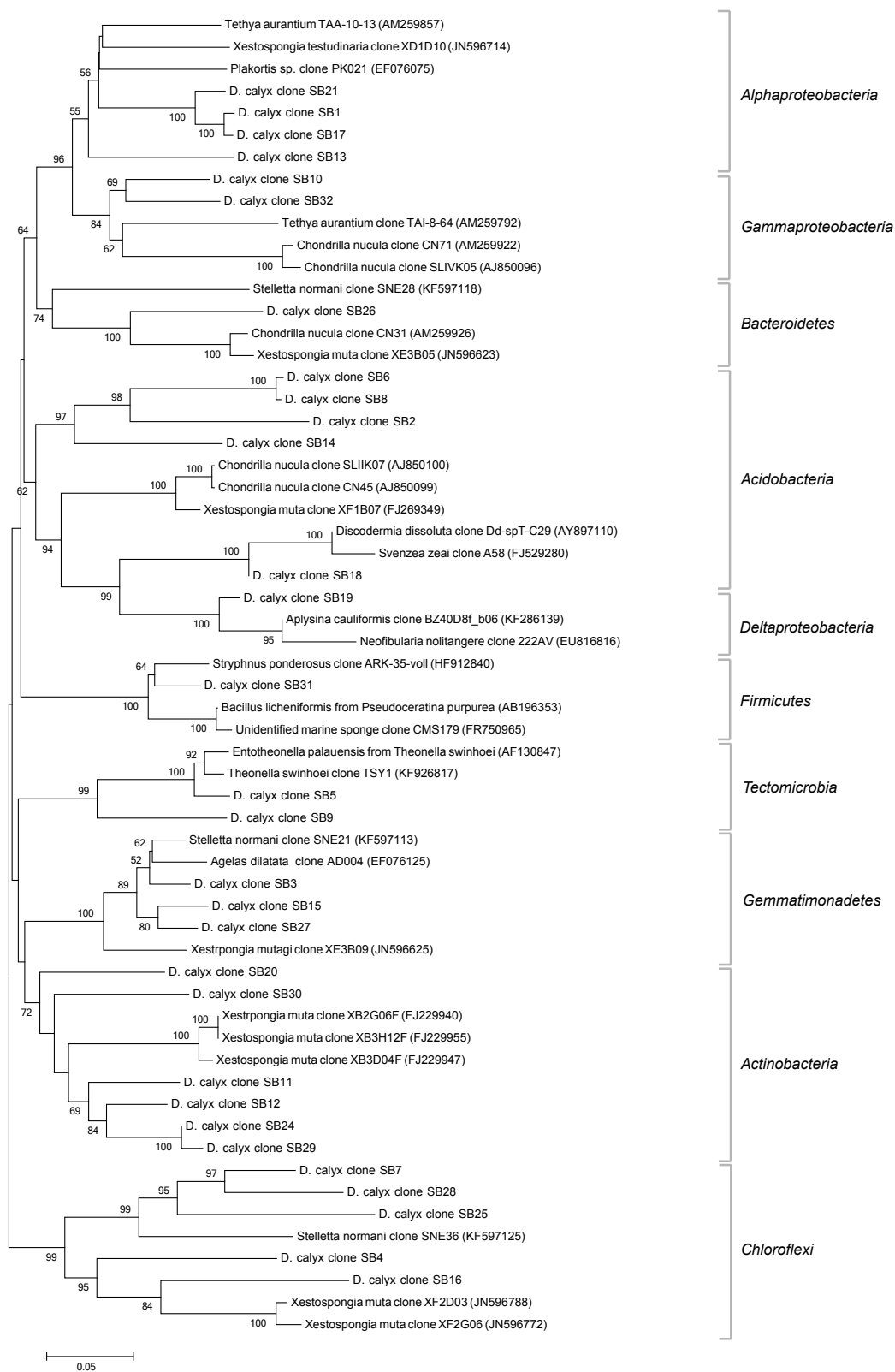


Fig. 61 海綿 *D. calyx* 由来 16S rRNA の系統樹解析

光学顕微鏡下における共生微生物の観察

採取後の新鮮な海綿 *D. calyx* をナイフで細かく破碎し、CMF-ASW (Ca^{2+} - Mg^{2+} free artificial sea water)¹⁶⁷⁾ に懸濁した上清を位相差顕微鏡にて観察した。その結果、単細胞やフィラメント状細胞など様々な微生物を観察した (Fig. 62)。その中でも、8~20 の単細胞が数珠状連なったフィラメント状バクテリア (Fig. 62, **F**) と 2~4 細胞が連なった位相差顕微鏡下において光を帯びて見える短いフィラメント状バクテリア (Fig. 62, **S**) を *D. calyx* に特徴的なバクテリアとして確認した。フィラメント状バクテリア **F** の形状は、パラオ産海綿 *T. swinhoei* に特徴的な共生微生物として D. J. Faulkner らによって報告された '*Candidatus Entotheonella palauensis*'¹⁶³⁾ に類似していた。16S rRNA 解析では特定の微生物に収束することなく様々な微生物に由来する 16S rRNA を検出した一方で、顕微鏡下ではフィラメント状バクテリア **F** および **S** を主要な微生物として認めた。このことから、*D. calyx* にはバクテリア **F** および **S** 以外にも顕微鏡では確認できない多様な微生物が潜在していると考えられる。

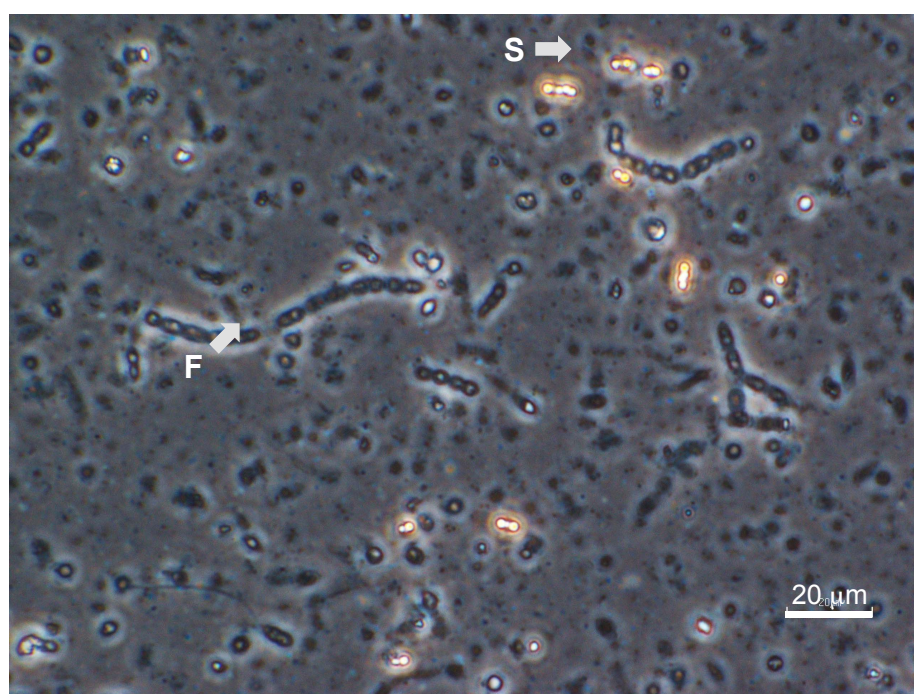


Fig. 62 位相差顕微鏡下における *D. calyx* 細胞懸濁液の観察

第 3 節 シングルセル解析による calyculin 生産菌の特定

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) による calyculin 生産菌の検出

第 1 章において取得した *cal* 遺伝子を保持する微生物を探索することで、遺伝子レベルでの calyculin A 生産菌の特定を目指した。生産菌が保持する生合成遺伝子のコピー数が不明であったため、検出にはより好感度に目的の遺伝子断片を検出できる catalyzed reporter deposition-fluorescence *in situ* hybridization (CARD-FISH) 法^{168), 169)}を用いた。断片化した *cal* 遺伝子をプローブとし、FITC にて検出した。その結果、フィラメント状バクテリア **F** が特異的に蛍光検出され、*cal* 遺伝子がコードされていることが判明した (Fig. 63)。

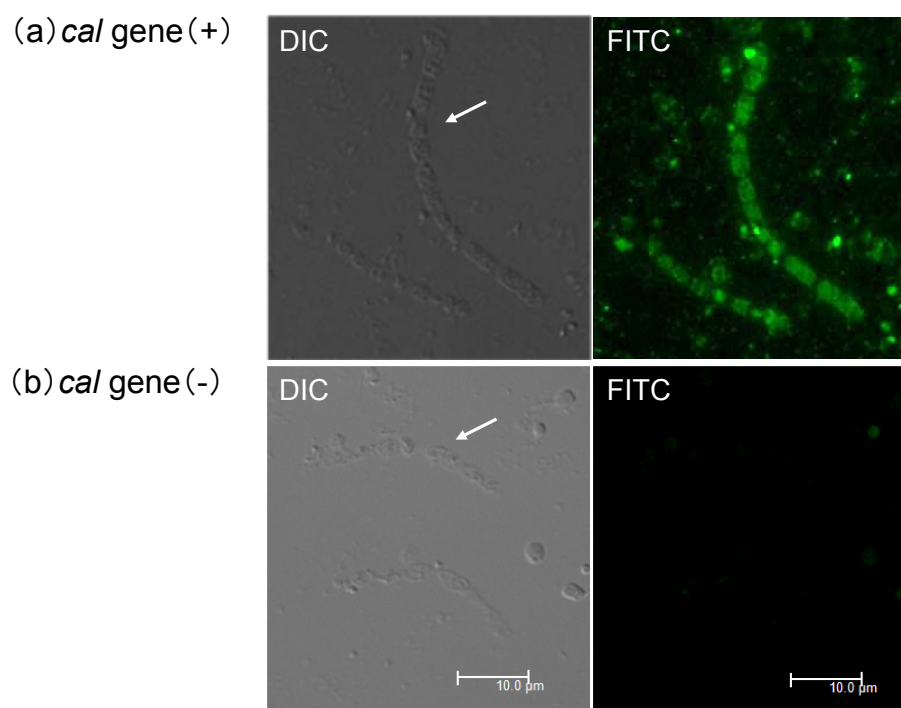


Fig. 63 CARD-FISH による *cal* 遺伝子の検出

(a) *cal* gene probe (+)、(b) *cal* gene probe (-)、DIC; differential interference contrast、FITC; fluorescein isothiocyanate

レーザーマイクロダイセクションを用いたシングルセル解析

CARD-FISH において、フィラメント状バクテリア **F** が *cal* 遺伝子を保持していることを明らかにした。さらに確証を得るため、レーザーマイクロダイセクション (LMD) を用いたシングルセル解析を行った。採取後の新鮮な海綿 *D. calyx* をナイフで細かく砕き、CMF-ASW で懸濁した上清をマイクロダイセクション専用のスライドガラスに塗布した。フィラメント状バクテリア **F** および **S** をそれぞれ LMD で直接 PCR チューブに回収し (Fig. 64)、凍結融解によって細胞を融解後、*cal* 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR の鋳型 DNA として用いた。その結果、フィラメント状バクテリア **F** 特異的に目的の遺伝子断片の増幅を確認した (Fig. 65)。以上の結果から、バクテリア **F** を calyculin 生産菌として特定した。

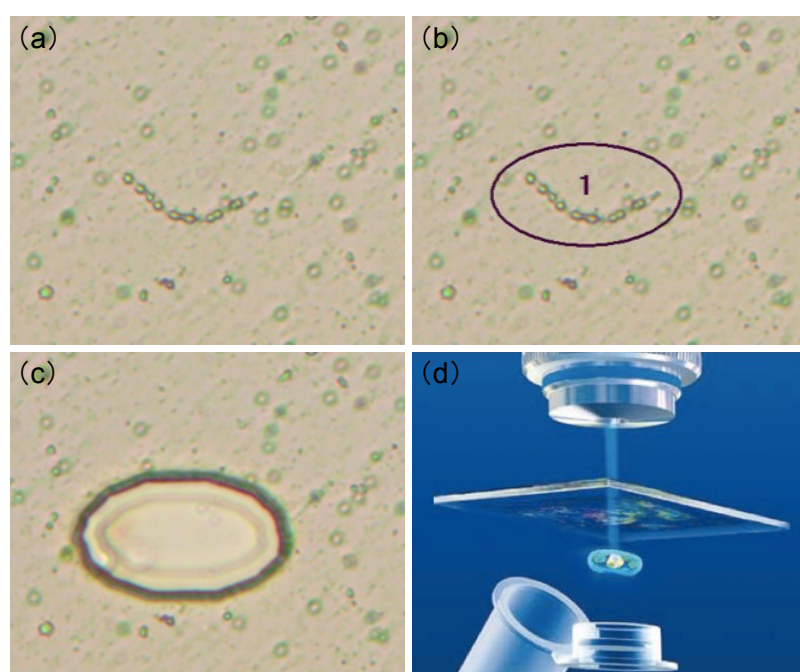


Fig. 64 LMD によるバクテリアの単離

(a) *D. calyx* 細胞懸濁液を LMD 専用スライドガラスに塗布、(b) 目的のバクテリアを選択、
(c) 選択した領域をレーザーで切断、(d) サンプルを PCR チューブへ回収

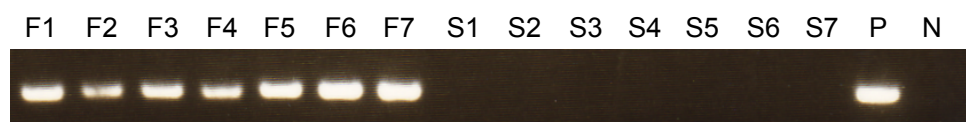


Fig. 65 LMD-PCR による calyculin 生産菌の特定

F; フィラメント状バクテリア **F** (F1-4; シングルフィラメント、F5-7; 4 フィラメント)、**S**; フィラメント状バクテリア **S** (S1-4; 4 フィラメント、S5-7; 8 フィラメント)、**P**; *D. calyx* メタゲノム DNA (positive control)、**N**; no template (negative control)

Calyculin 生産菌の 16S rRNA 解析

Calyculin 生産菌の属を特定するためにフィラメント状バクテリア **F** の 16S rRNA 解析を行った。前項と同様に、LMD を用いて目的のバクテリア **F** を単菌後、16S rRNA ユニバーサルプライマー¹⁶⁶⁾ を用いて PCR を行った。しかしながら、目的の遺伝子断片の増幅は確認されなかった。前項での PCR 産物は約 200 bp であるのに対し、本実験では約 1,500 bp であり、目的の遺伝子断片サイズが増大したために増幅されなかったと考えた。実際に、LMD-PCR において遺伝子断片の長さが増幅効率に影響を与えるという報告がある¹⁷⁰⁾。そこで、鋳型 DNA の濃度を上げるために 500 フィラメントのバクテリア **F** を単菌し、同様に PCR を試みたが状況は改善されなかった。また、LMD でバクテリア **F** を単菌し、 ϕ 29 DNA ポリメラーゼ¹⁷¹⁾ による全ゲノム増幅を行った後に 16S rRNA の PCR による増幅を試したが、目的の遺伝子断片は得られなかった。そこで、顕微鏡での観察においてフィラメント状バクテリア **F** の形状がパラオ産海綿 *T. swinhoei* の共生微生物として過去に報告されている '*Candidatus Entotheonella palauensis*' に類似している点に注目した。本章第 2 節 *D. calyx* メタゲノム DNA の 16S rRNA 解析において、'*Candidatus Entotheonella*' sp. を検出していたことから (Fig. 61)、特異的なプライマーを設計し、PCR を行った。10 および 100 のフィラメント状バクテリア **F** とバクテリア **F** が存在しない領域 50 画分をそれぞれレーザーマイクロダイセクションにより単離し、DNA を抽出した。得られた DNA を鋳型として *D. calyx* '*Candidatus Entotheonella*' sp. 16S rRNA および *cal* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。その結果、両プライマーからフィラメント状バクテリア **F** 特異的に目的の遺伝子断片の増幅を確認したことから、calyculin 生産菌を '*Candidatus Entotheonella*' sp. と特定した (Fig. 66)。

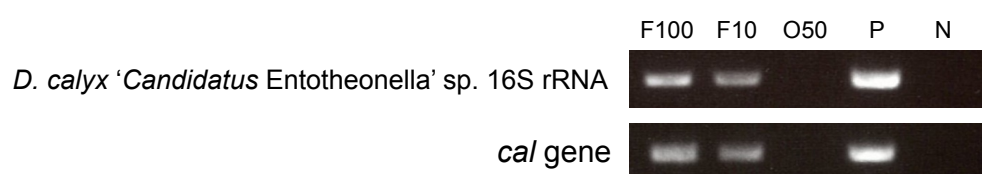


Fig. 66 LMD-PCR による 16S rRNA 解析

F100; 100 フィラメント状バクテリア **F**、F10; 10 フィラメント状バクテリア **F**、O50; フィラメント状バクテリア **F** 以外の *D. calyx* 懸濁液上清塗布領域 50 画分、P; *D. calyx* メタゲノム DNA (positive control)、N; no template (negative control)

第 4 節 小括

本章では、生合成遺伝子をコードする微生物を探索することにより、calyculin 生産菌の特定を目指した。16S rRNA 解析の結果、*D. calyx* には多様なバクテリアが共生することが示唆された。一方で、光学顕微鏡下、人工海水中で破砕した海綿の懸濁液には特徴的な形状を有する 2 種類のフィラメント状バクテリアを検出した。そこで、*cal* 遺伝子をプローブとして CARD-FISH を行った結果、8~20 の単細胞が数珠状に連なったフィラメント状バクテリア **F** を特異的に検出した。さらに、*D. calyx* に特徴的なバクテリアとして認めた 2 種類のフィラメント状バクテリアをそれぞれレーザーマイクロダイセクションにて単菌し、*cal* 遺伝子に特異的な PCR の鋳型 DNA として用いた。その結果、バクテリア **F** においてのみ特異的に目的の遺伝子フラグメントが増幅されたことから、本バクテリアを calyculin 生産菌として突き止めた。16S rRNA 解析により calyculin 生産菌を ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. と特定した。‘*Candidatus Entotheonella palauensis*’ は、1996 年、D. J. Falkner らによって、パラオ産海綿 *T. swinhoei* に共生する特徴的なバクテリアとして示され、環状ペプチド theopalauamide の生産菌として報告された¹⁶³⁾。その後、海綿 *Discodermia dissoluta* にもフィラメント状のバクテリア ‘*Candidatus Entotheonella*’ spp. が共生することが報告されている¹³²⁾。*D. dissoluta* からは、抗がん剤のリード化合物として第 II 相臨床試験まで進んだ discodermolide が単離されている。さらに、2014 年には私たちの共同研究者である J. Piel らのグループによって、八丈島産海綿 *T. swinhoei* の共生バクテリア ‘*Candidatus Entotheonella factor TSY1*’ に polytheonamide や onnamide、keramamide など本海綿から単離されたポリケタイドやペプチド類のほとんどの生合成遺伝子がコードされていることが示された¹⁵⁷⁾。その結果、‘*Candidatus Entotheonella factor TSY1*’ は二次代謝産物生産能に秀でたバクテリア “metabolically talented bacteria” として報告され、candidate phylum ‘Tectomicrobia’ が提唱された。本研究において、式根島産 *D. calyx* にも ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. が共生しており、細胞毒性物質 calyculin A の真の生産者であることを突き止めた。また、私たちの研究室では *D. calyx* より単離された二次代謝産物である calyxamide 類および kasumigamide の生合成遺伝子も同一バクテリアにコードされていることを明らかにしている。‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. は、海綿 *D. calyx* においても二次代謝産物の生産を担う重要な共生微生物であると考えられる。また、‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. は、*Theonella* 属や *Discodermia* 属以外の海綿にも広く分布しており^{157), 172)}、海綿由来生物活性物質の多くの生産を担っている可能性を示唆している。

第 3 章 Calyculin 推定生合成修飾酵素の機能解析

第 1 節 序論

第 1 章において取得した *cal* 遺伝子は、その配列情報から calyculin 生合成遺伝子であることが強く示唆された。しかしながら、遺伝子情報から予測できる PKS-NRPS 産物が最終的に calyculin A となるには、スピロアセタール環やニトリルの形成など複数の修飾反応が必要であり、このように特徴的な部分構造の生合成機構には興味を持たれる。また一方で、取得した遺伝子クラスターが calyculin の生合成遺伝子であることを示すには、*cal* 遺伝子によって calyculin 類が生産されることを実証しなければならない。生合成研究において、遺伝子クラスターの証明には主に 3 つの方法が用いられている。1 つ目は、遺伝子の表現型を生産菌ベースで証明する方法である。生産菌が保持する生合成遺伝子を破壊し、代謝産物生産への影響を評価することで、その関与を検討する。この方法は、実験室下で培養可能な微生物の生合成研究において広く用いられている方法である。しかしながら、現段階の試みでは実験室下において *cal* 遺伝子をコードする共生バクテリア '*Candidatus Entothoonella*' sp. の培養に成功していないため、*cal* 遺伝子の表現型を生産菌ベースで証明することは困難であった。2 つ目として、培養可能な微生物を宿主として、目的の遺伝子を異種発現によって評価する方法が挙げられる。本方法は、生産菌を実験室下において培養できない場合や生産菌が未同定である場合に用いられる。実際に、海綿 *T. swinhoei* 由来の polytheonamide 生合成遺伝子クラスターの異種発現など成功例も複数報告されている¹²⁴⁾。しかしながら、150 kb におよぶ *cal* 遺伝子はこれまでに報告されてきた二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの中で最も大きく、このような遺伝子クラスターの異種発現例は報告がなかったため、本方法を用いるのは難しいことが予想された。3 つ目は、目的の遺伝子がコードするタンパク質を異種発現にて取得し、*in vitro* においてその機能を評価する方法がある。生合成酵素として予想されるタンパク質を大腸菌にて異種発現後、基質や補酵素と反応させることで二次代謝産物の生産に成功した例も報告されている。本方法では、タンパク質発現系の問題、反応基質や補因子など様々な条件を検討する必要がある。*cal* 遺伝子にコードされているタンパク質は最大 800 kDa 以上であり、かつ、生合成中間体となる基質も入手困難であったことから、*cal* 遺伝子の生合成産物をこれらの方法によって証明することは難しいことが予想された。そこで、本章では *cal* 遺伝子にコードされる生合成修飾酵素と推測された ORF を機能解析することで、本クラスターの calyculin 生合成への関与を検討した。同時に、PKS-NRPS によって組み立てられた骨格が最終的に calyculin A へと成熟するためには、複数の修飾反応が必要であることから calyculin A の生合成経路における修飾反応の解明を目指した。

第 2 節 Calyculin A 生合成機構の推定

PKS-NRPS 産物から calyculin A への変換機構の推定

cal 遺伝子の配列から予想される PKS-NRPS 産物が最終的に calyculin A となるには、1) アミド部分の加水分解、2) 5,6-スピロアセタール環の形成、3) 17 位の水酸基の立体反転、4) 17 位のリン酸化、5) ニトリルの形成が起こる必要がある (Fig. 67)。そこで、過去に報告されている例を参考に calyculin A の生合成に参与するこれらの修飾反応を推定した。

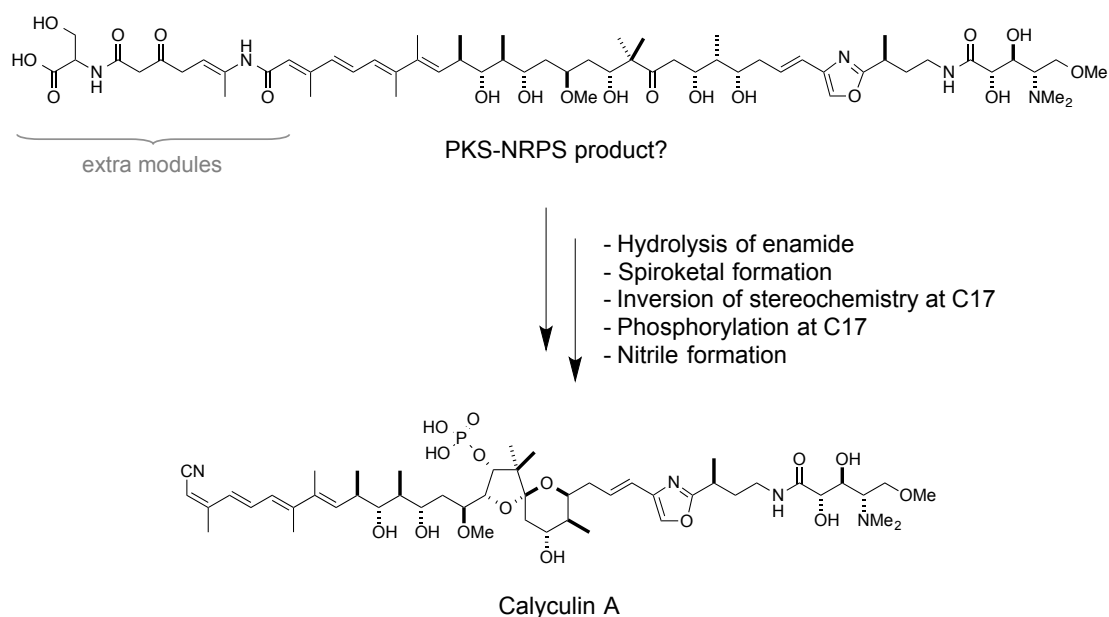


Fig. 67 PKS-NRPS 産物から calyculin A の修飾経路

リン酸化の推定機構

放線菌 *Streptomyces pulveraceus* 由来の二次代謝産物である fostriecin^{79), 80)} は、calyculin A と同様にタンパク質脱リン酸化酵素阻害活性を有する。構造中にはリン酸を有しており、その生合成機構は明らかにされている¹⁷³⁾。Fostriecin のリン酸基は、homoserine kinase と配列相同性を有する FosH によって付加される。FosH は ATP をリン酸ドナーとして fostriecin 前駆体の水酸基をリン酸化する (Fig. 68)。海綿 *D. calyx* から脱リン酸化体である dephosphonocalyculin A が単離されていることから、calyculin A の生合成経路においても同様の修飾反応が起こる可能性が考えられた。つまり、calyculin A は dephosphonocalyculin A の 17 位の水酸基がリン酸化されて生じる可能性が考えられる (Fig. 69)。ただし、第 1 章における *cal* 遺伝子の配列情報に基づいた解析では、リン酸基が結合する 17 位の水酸基の立体化学は calyculin A の立体化学と異なっていた。この点を踏まえると 17 位の立体反転とリン酸化反応が双方に参与して起こり、calyculin A が生合成される新規の機構が備わっている可能性も考えられる。

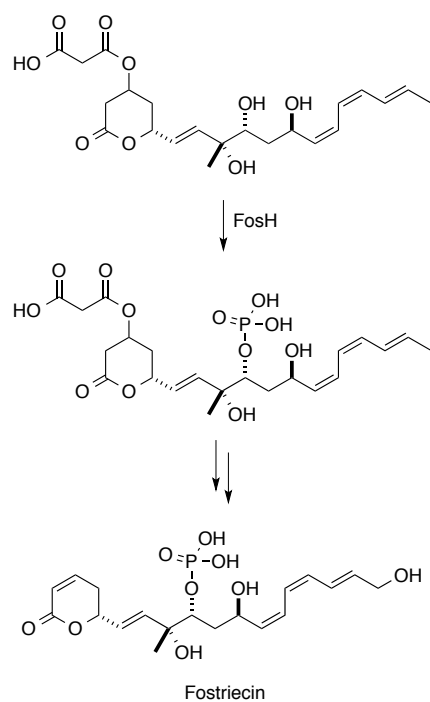


Fig. 68 Fostriecin のリン酸化機構

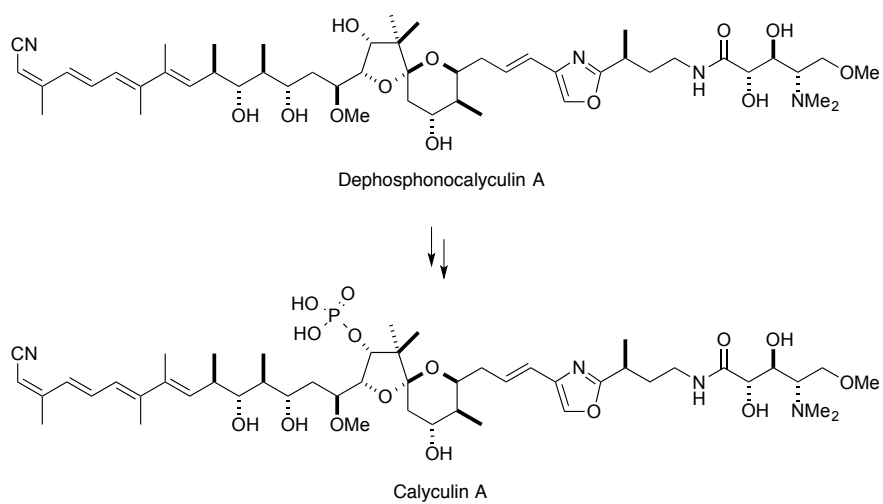


Fig. 69 Calyculin A の推定リン酸化機構

スピロアセタール環形成機構の推定

スピロアセタール環やポリエーテル環を有する二次代謝産物はバクテリアや渦鞭毛藻などから広く単離されてきた (Fig. 70)。今日までに明らかにされているスピロアセタール環生成機構は大きく 2 つのメカニズムに分類される。1 つ目は、エポキシドを経由する機構であり、monensin A^{174), 175)} の生合成経路において報告されている (Fig. 71a)。2 つ目の機構は、spirangien A¹⁷⁶⁾ や reveromycin¹⁷⁷⁾ などに認められる。本機構では、dihydroxyketone からオキソニウムイオンを生じた後にスピロアセタール環へと変換される (Fig. 71b)。

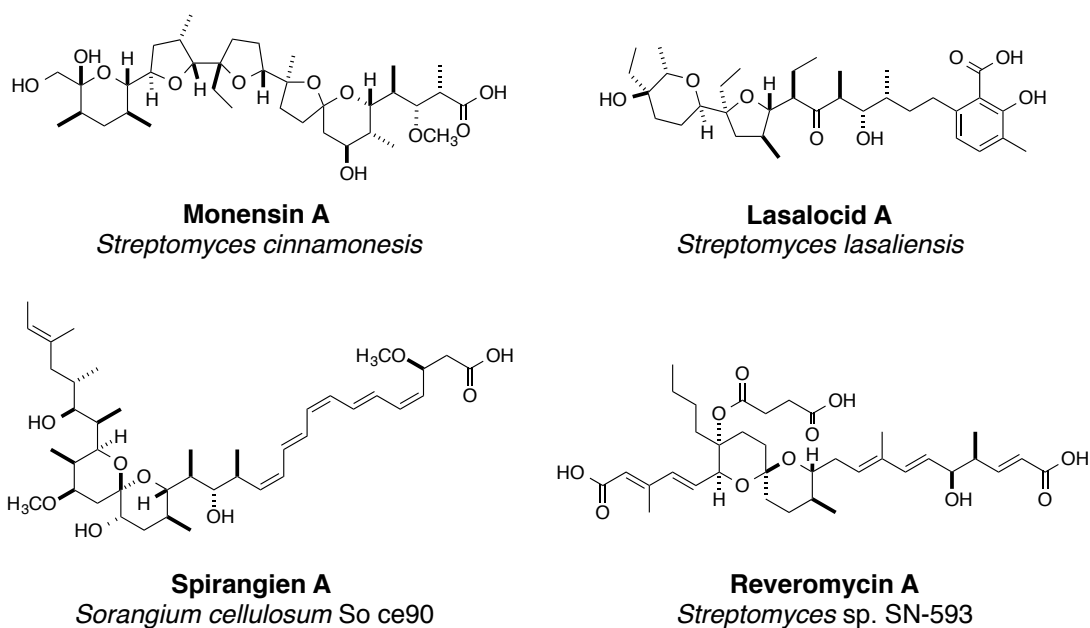


Fig. 70 スピロアセタール環あるいはポリエーテル環を有する天然物

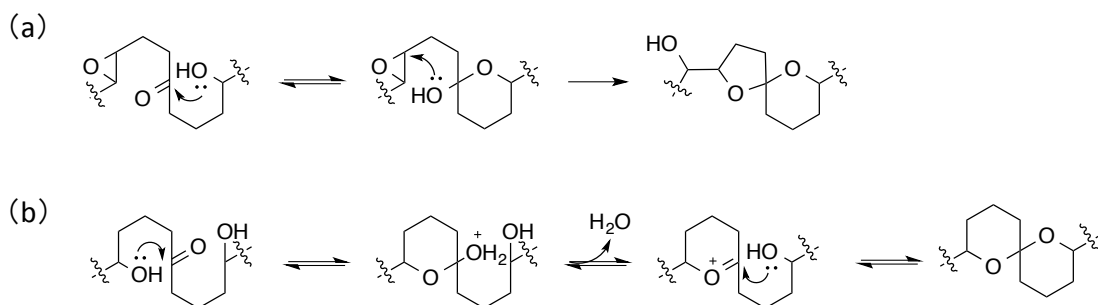


Fig. 71 スピロアセタール環の生合成機構

(a) エポキシド中間体を経由するスピロアセタール環形成機構、(b) オキソニウムイオン中間体を経由するスピロアセタール環形成機構

Calyculin A のスピロアセタール環形成機構の推定

(i) エポキシド中間体を経由する場合

cal 遺伝子の配列情報から予測される生合成経路では、既に 15 位が *O*-メチル化がされており、C15-C16 がエポキシ化する可能性は低い。C16-C17 がエポキシ化された中間体を経てスピロアセタール環の形成が起こる可能性が考えられる (Fig. 72)。この場合、まず C17 の水酸基が脱水し、C16-C17 に二重結合が形成した後、酸化酵素によってエポキシ化される。さらに生じたエポキシドに対して 19 位のカルボニル酸素から求核攻撃が起こるが、5 員環を形成するためには C16 へ起こる必要があり、ボールドウィン則に反する。過去の研究において、lasalocid A (Fig. 70) の 6 員環形成は生合成酵素 Lsd19 の制御によって、ボールドウィン則に反し 6-endo 環化が起こることが報告されている¹⁷⁸⁾。同様に calyculin A の生合成においても、5-endo 環化によるエポキシド中間体を経由した 5,6-スピロアセタール環の形成が起こる可能性が考えられる。

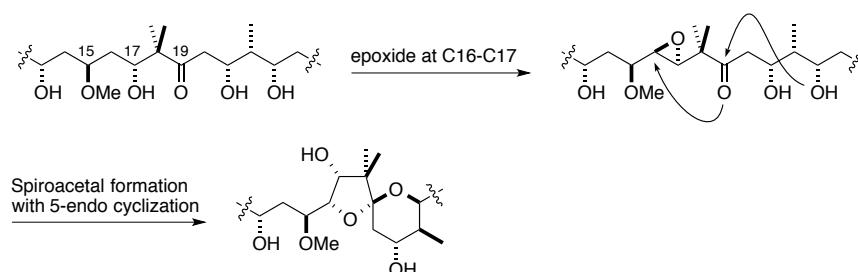


Fig. 72 エポキシド中間体を経由する calyculin A スピロアセタール環推定生合成機構

(ii) Dihydroxyketone 中間体を経由する場合

Calyculin A のスピロアセタール環形成が dihydroxyketone 中間体を経由する場合、16 位が水酸化される必要がある。*cal* 遺伝子において、16 位の炭素原子は *calE* のモジュール 19 において伸長されると支持された (Fig. 51b, Fig. 73)。そのすぐ下流に存在する *calF* のモジュール 20 は、活性残基を失った KS ドメイン (KS⁰) と ACP のみで構成されており、ここで何らかの修飾反応が起こる可能性が考えられる。Dihydroxyketone 中間体を経由してスピロアセタール環が生合成される場合、このモジュール 20 において α -位の水酸化が起こる可能性が示唆される。なお、calyculin A のスピロアセタール環部分は、オキサゾールを含む最もかさ高い側鎖がエクアトリアル位にあり、それに加えて、21 位の水酸基と 5 員環を形成する酸素原子が 1,3-ジアキシャル位で水素結合を形成しており、熱力学的に最も安定なコンフォメーションをとっている (Fig. 74)。このため、16 位が水酸化された後のスピロアセタール環形成については酵素的あるいは非酵素的、両方起こりうると思われる。

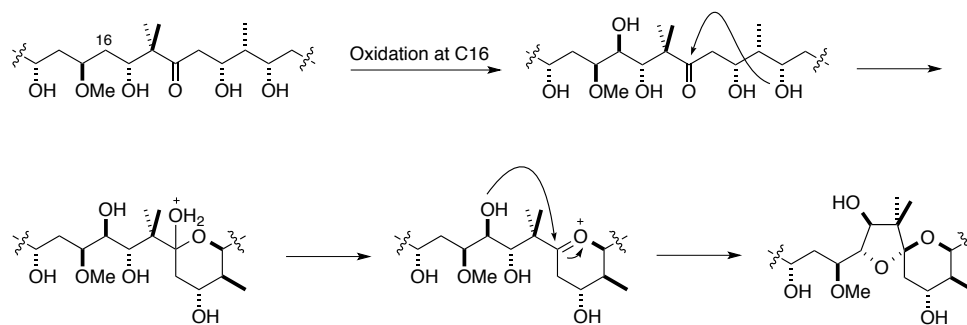


Fig. 73 Dihydroxyketone 中間体を経由する calyculin A スピロアセタール環推定生成機構

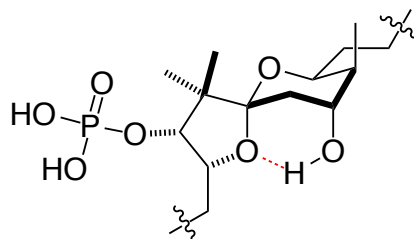


Fig. 74 Calyculin A のスピロアセタール環部分のコンフォメーション

ニトリル生合成機構の推定

ニトリルを有する天然物の単離例はそれほど多くない。二次代謝産物におけるニトリル形成機構として、(i) アルドキシム中間体を経由する機構、(ii) カルボン酸中間体を経由する機構、(iii) オキサゾール分解による機構の3種類がこれまでに報告されている。

(i) アルドキシム中間体を経由する機構

Cyanogenic glycoside は、植物や糸状菌、バクテリアなど生物種を超えて広く分布する。Cyanogenic glycoside を構成するニトリルはアミノ酸由来であり、P450 によりアミノ基が酸化されて生成したアルドキシム中間体が更に脱水することでニトリルが形成する¹⁷⁹⁾ (Fig. 75)。

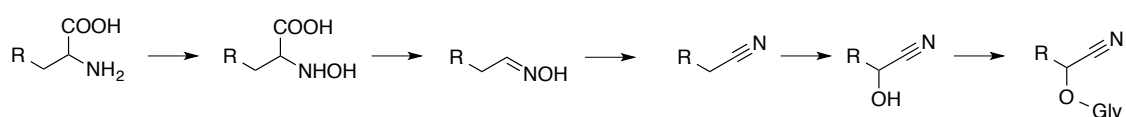


Fig. 75 Cyanogenic glycoside の生合成経路

Cyanogenic glycoside と類似したニトリル形成機構が放線菌 *Streptomyces parvulus* が生産する borrelidin の生合成経路で見出されている¹⁸⁰⁾。Borrelidin のニトリルは、メチル基が BorI (P450) によって酸化され、生じたアルデヒドにアミノ基転移酵素 BorJ が作用することによってアミン中間体が生成する。再度、BorI により酸化されて生じたアルドキシム中間体が、脱水してニトリルを生成する (Fig. 76)。

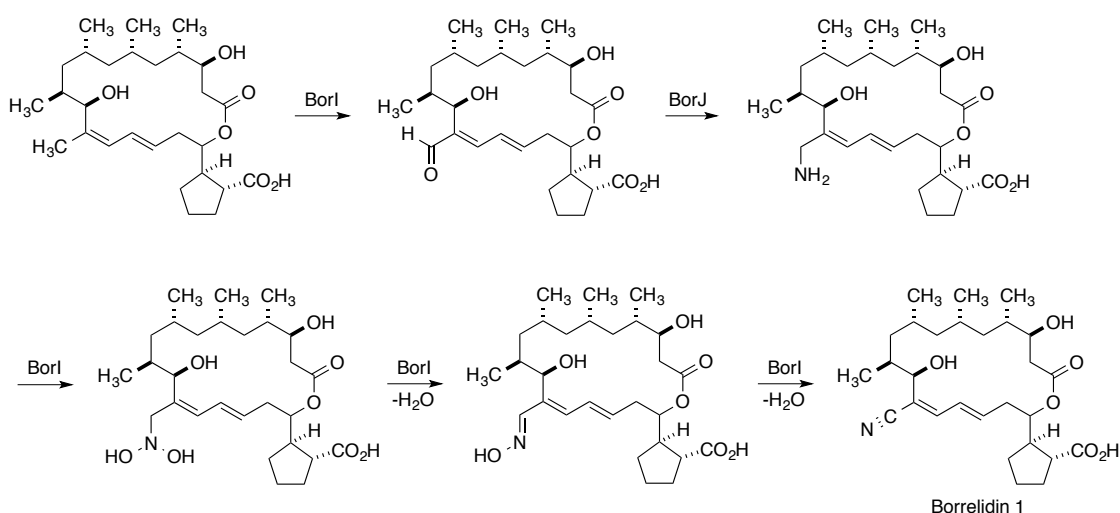


Fig. 76 Borrelidin 1 のニトリル生合成機構¹⁸⁰⁾

(ii) カルボン酸中間体を経由する機構

放線菌 *Streptomyces* 属には deazapurine 骨格を有する二次代謝産物が広く分布する。その中の 1 つにニトリルを有する二次代謝産物 toyocamycin が単離されており、さらに、そのアミド類縁体として sangivamycin が報告されている。これらの前駆体である 7-cyano-7-deazaguanine (preQ₀) は GTP から生じる^{181), 182)}。GTP が複数の酵素の触媒によりカルボン酸を有する 7-carboxy-7-deazaguanine (CDG) へと変換され、その後、ToyM によってニトリルを有する preQ₀ へと変換される。ToyM は ATPase スーパーファミリーに属し、ATP 存在下においてカルボン酸からニトリルへの変換反応を触媒する。投与実験によりニトリルの窒素源は NH₄⁺であることが明らかにされている。詳細な反応機構については深く言及されていないが、カルボン酸の酸素原子が ToyM によってリン酸化され、生じた中間体に NH₃ の窒素原子が求核攻撃し、リン酸基の脱離に伴ってニトリルが生成することが推測される (Fig. 77)。さらに、toyocamycin は nitrile hydrolase の α 、 β 、 γ サブユニットである ToyJ、ToyK および ToyL の触媒によって加水分解され、アミド体 sangivamycin が生成される。

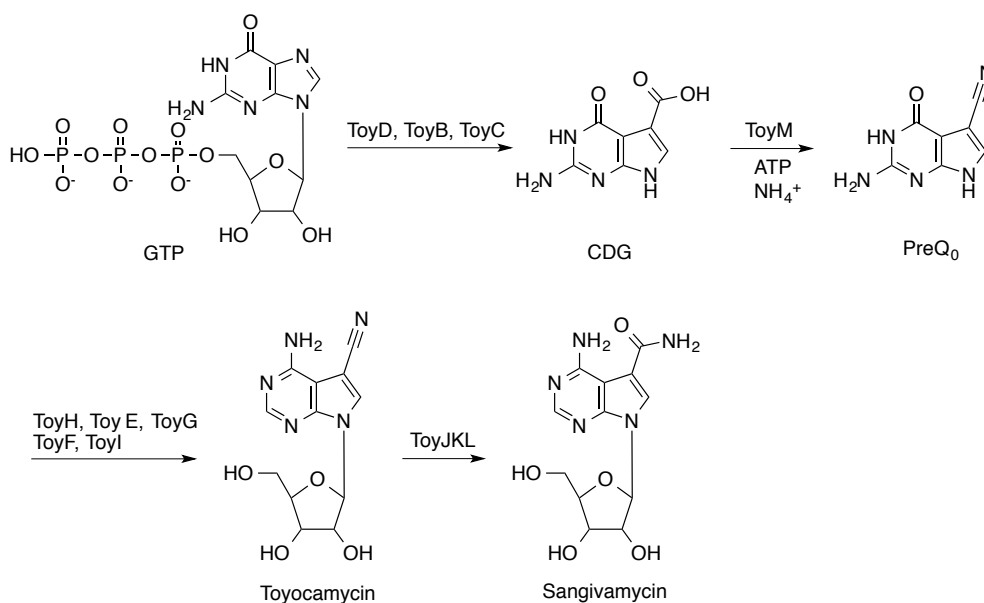


Fig. 77 Toyocamycin のニトリル合成機構^{181), 182)}

(iii) オキサゾールの分解によるニトリル形成機構

Calyculin 類縁体である hemicalyculin A や rhizoxin 類縁体である rhizoxin N1 の構造中には、ニトリルが認められる (Fig. 78a)。これらのニトリルは、オキサゾールの一重項酸素による分解を経て形成されることが報告されている^{65), 183)} (Fig. 78b)。

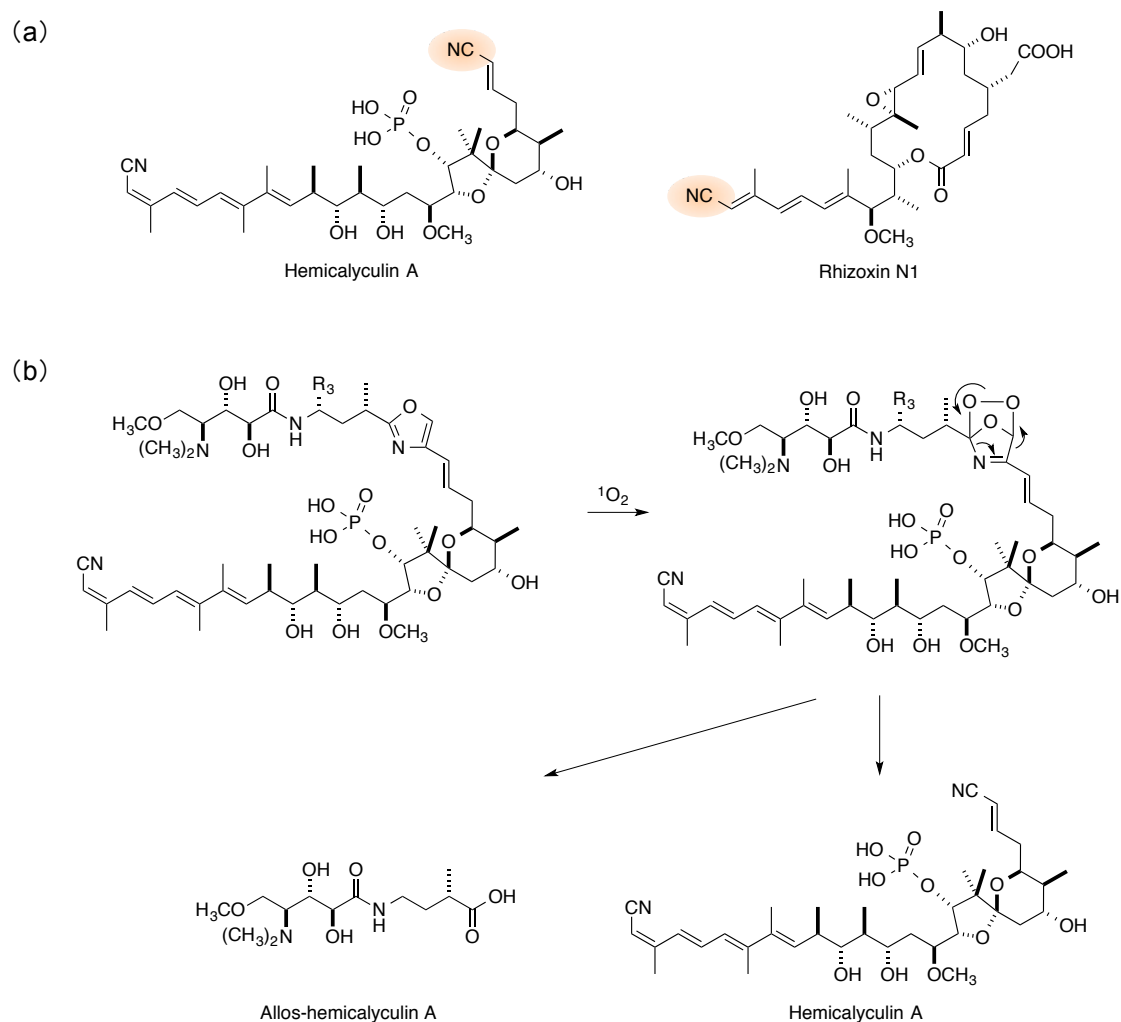


Fig. 78 (a) Hemicalyculin と rhizoxin N1、(b) オキサゾールの一重項酸素分解によるニトリル形成機構⁶⁵⁾

Calyculin A のニトリル形成機構の推定

cal 遺伝子の近傍には P450 およびアミノ基転移酵素と相同性を示す ORF は見出されなかったことから、calyculin A のニトリルはアルドキシム中間体を經由する機構とは異なる反応機構によって生合成される可能性が強く示唆された。また、*cal* 遺伝子の配列情報から、テトラエン部分を生合成するモジュールの下流にはオキサゾールの形成に関与するモジュールが存在しないことから、オキサゾールの一重項酸素による分解によってニトリルが形成する可能性は低いと考えられた。一方で、*D. calyx* からは calyculin A の末端アミド類縁体 calyculinamide A が単離されており、sangivamycin の場合と同様に、calyculinamide A は calyculin A のニトリルの加水分解によって生じる可能性が考えられる。しかしながら、*cal* 遺伝子の近傍に preQ₀ のニトリル形成に関与する ToyM のホモログ酵素は見出されておらず、calyculin A のニトリル形成機構については不明である。

第 1 章において解析した *cal* 遺伝子の配列情報から、テトラエンが生合成された後に 1 分子の Ala が付加し、さらにエナミド構造が形成することが推測された (Fig. 51b、Fig. 58)。生じたエナミド中間体が加水分解されることにより、まず calyculinamide A が生成する可能性が考えられる。つまり、calyculin A は calyculinamide A を經由して生合成されることが 1 つの可能性として推測された。Bezerramycin 類の生合成経路において、アミド構造を經由したニトリルの生合成機構が提唱されている¹⁸⁴⁾ (Fig. 79)。カルボン酸を有する bezerramycin B からアミド類縁体 bezerramycin A が生成し、アミド部分のリン酸化および脱リン酸化を伴いニトリルを有する bezerramycin C が生合成すると推測されている。しかしながら、二次代謝産物の生合成においてこのような反応機構を証明した例はない。

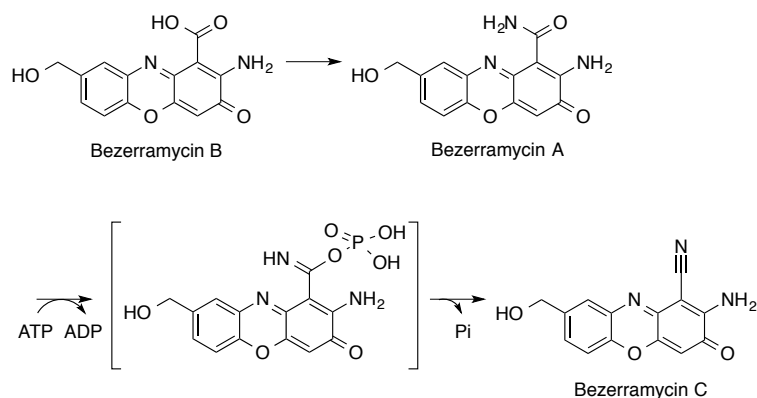


Fig. 79 Bezerramycins A-C の推定生合成機構¹⁸⁴⁾

一方で、NiFe-hydrogenase の金属リガンドの生合成機構において、リン酸化および脱リン酸化を伴うチオアミドからチオシアネートの形成機構が報告されている^{185), 186)}。NiFe-hydrogenase は、金属リガンドとして CO と CN⁻を酵素内に保持する。この CN⁻は、NH₃ と CO₂ から生じたアミドが ATP によりリン酸化され、さらに脱リン酸化を伴ってチオシアネートが形成され、最終的に CN⁻として脱離する (Fig. 80)。

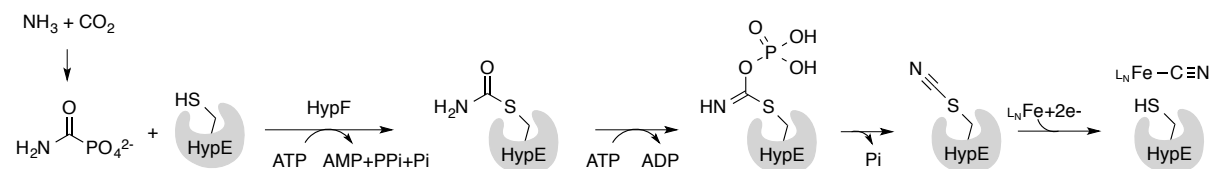


Fig. 80 NiFe-hydrogenase 金属リガンド CN⁻の生合成機構^{185), 186)}

Calyculin A が calyculinamide A から生合成されると仮定した場合、同様にアミドの酸素原子がリン酸化され、iminophosphate 中間体を経由してニトリルが生じると推測した (Fig. 81)。

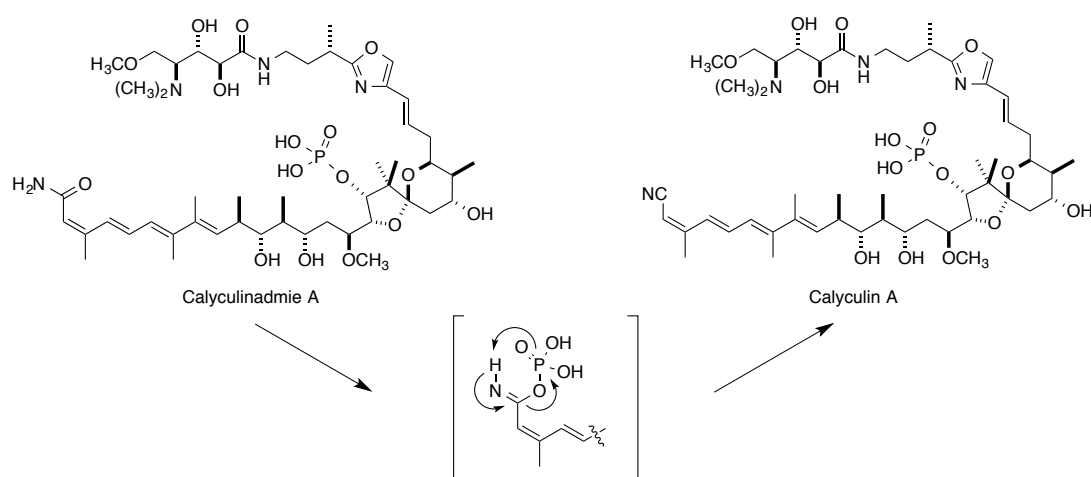


Fig. 81 Calyculin A のニトリルの推定生合成機構

第3節 推定リン酸基転移酵素の機能解析

Calyculin 生合成におけるリン酸基転移酵素の機能推測

cal 遺伝子上流には、phosphotransferase と配列相同性を有する 3 つの ORF、*calM*、*calP* および *calQ* がコードされていた。これらはいずれもバクテリア由来の抗生物質耐性に関与するリン酸基転移酵素であった。CalQ は aminoglycoside phosphotransferase (APH) とアミノ酸レベルで 30% の配列相同性を示した。APH は、kanamycin や neomycin などのアミノグリコシド系抗生物質生産菌や耐性菌に分布しており、これらの抗生物質をリン酸化修飾することにより自己耐性を獲得する。APH はリン酸化する水酸基の位置によって複数のファミリーに分類される¹⁸⁷⁾。CalQ と最も高い配列相同性が認められた aminoglycoside 3'-phosphotransferase は、ATP をリン酸ドナーとして Mg^{2+} 存在下で 3' 位の水酸基をリン酸化する (Fig. 82)。海綿 *D. calyx* からは calyculin A の脱リン酸化体 dephosphonocalyculin A が単離されており、本化合物が生合成中間体である可能性がある。構造類似性から、アミノグリコシド系抗生物質の糖の水酸基をリン酸化する APH のホモログ CalQ によって dephosphonocalyculin A の 5 員環に位置する 17 位の水酸基がリン酸化され、calyculin A が生合成されると推測した (Fig. 69)。

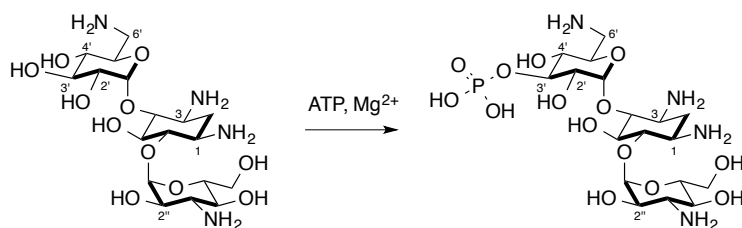


Fig. 82 Aminoglycoside 3'-phosphotransferase (APH) によるリン酸化反応

CalM および CalP は、chloramphenicol 3-O phosphotransferase (CPT) とアミノ酸レベルで 31% の配列相同性を示した。CPT は chloramphenicol 生産菌より同定されたリン酸基転移酵素であり、自己耐性に関与する修飾酵素である。APH の場合と同様に、ATP をリン酸ドナーとして Mg^{2+} 存在下、chloramphenicol の 3 位の水酸基のリン酸化を担う¹⁸⁸⁾ (Fig. 83)。本章第 2 節で述べたように、calyculin A が有するニトリルは calyculinamide A のアミド部分がリン酸化された後に生じる可能性が推測された (Fig. 81)。この変換反応に CalM あるいは CalP が関与する可能性を考えた。

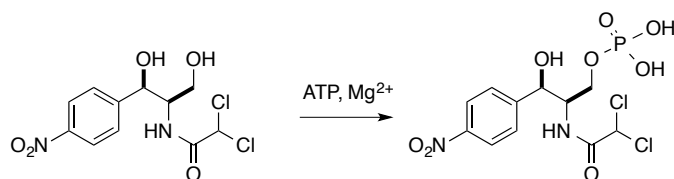


Fig. 83 Chloramphenicol phosphotransferase (CPT) によるリン酸化反応

CalM、CalP および CalQ の異種発現

cal 遺伝子にコードされている 3 種類のリン酸基転移酵素のホモログ CalM、CalP および CalQ の *in vitro* における機能解析を行うため、大腸菌を宿主とした異種発現を試みた。目的の遺伝子断片を PCR により増幅後、pET22b(+)や pColdII、pQE vector へ導入し、大腸菌 BL21 (DE3) および BLR へ形質転換した。タンパク質の発現は T7 プロモーター下、IPTG により誘導した。IPTG の濃度や培養温度、培養時間、またタンパク質抽出に用いる緩衝液の組成など様々な条件を検討したが、目的のタンパク質はすべて不溶性画分に得られた。そこで、分子シャペロンとの共発現を試みた。複数の分子シャペロンとの共発現を検討した結果、GroES および GroEL¹⁸⁹⁾ と共発現した場合、目的のタンパク質を可溶性画分に得ることに成功した。それぞれのタンパク質を N 末端 His タグ融合タンパク質 Nhis-CalM、Nhis-CalP および Nhis-CalQ として発現させ、Ni アフィニティークラムを用いて精製した。精製タンパク質を SDS-PAGE に供した結果、GroES-GroEL も共存することを確認したが (Fig. 84)、これらシャペロンタンパク質は酵素反応に影響を及ぼさないと考え、得られた精製タンパク質を用いて *in vitro* における酵素反応を行うこととした。

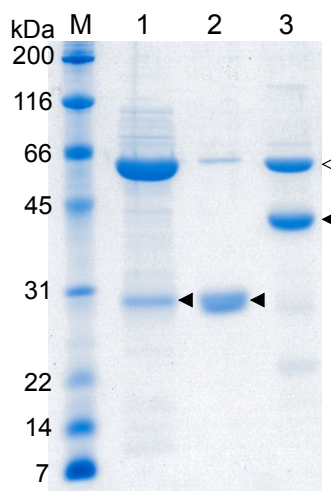


Fig. 84 精製タンパク質 Nhis-CalM、Nhis-CalP、Nhis-CalQ

M; Protein marker、1; Nhis-CalP (27.0 kDa)、2; Nhis-CalM (27.1 kDa)、3; Nhis-CalQ (45.3 kDa)、
▲; Nhis-CalM、Nhis-CalP、Nhis-CalQ、△; GroES-GroEL

in vitro における酵素反応

精製タンパク質について、*in vitro* における機能解析を行った。酵素反応の基質として、末端アミドの類縁体 calyculinamide A および脱リン酸化体 dephosphonocalyculin A を用いた。pH5~pH9 において、ATP または GTP および 2 価の金属イオン (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+}) 存在下、精製タンパク質 Nhis-CalM、Nhis-CalP、Nhis-CalQ と各基質を 20 °C で反応させた。酵素反応進行の有無は ODS-HPLC にて評価した。その結果、dephosphonocalyculin A を基質として用いた場合には、いずれの精製酵素存在下においても新たな生成物は得られなかった (Fig. 85b)。一方で、calyculinamide A を基質とした際、pH6~pH7.5、ATP または GTP および Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Co^{2+} 存在下において、CalQ との反応溶液に新規生成物を得た (Fig. 85a)。そこで、本酵素反応生成物について LC-MS 分析を行った結果、1107 の m/z が得られ、calyculinamide A ($m/z = 1027 [M+H]^+$) より分子量が 80 増加した化合物であることが判明した。この時点で、calyculinamide A のアミド構造の酸素原子に 1 分子のリン酸基が付加した imino phosphate 構造を有した化合物を期待した。しかしながら、予想に反し、CalQ は calyculin A ($m/z = 1009 [M+H]^+$) および C ($m/z = 1023 [M+H]^+$) をも基質として受け入れ、calyculinamide A の場合と同様に分子量が 80 増加した化合物 ($m/z = 1089$ および $1103 [M+H]^+$) を与えることが判明した (Fig. 86)。つまり、CalQ は末端ニトリルの calyculin A および C についてもリン酸化することから、先に得られた CalQ と calyculinamide A の酵素反応生成物は imino phosphate 構造を有する化合物ではないことが強く示唆された。これまで、calyculin A および C は *D. calyx* 中に主要に含まれる二次代謝産物として報告され、生合成の最終産物として考えられていたため、CalQ によって calyculin 類がリン酸化される意義はこの段階で不明であった。

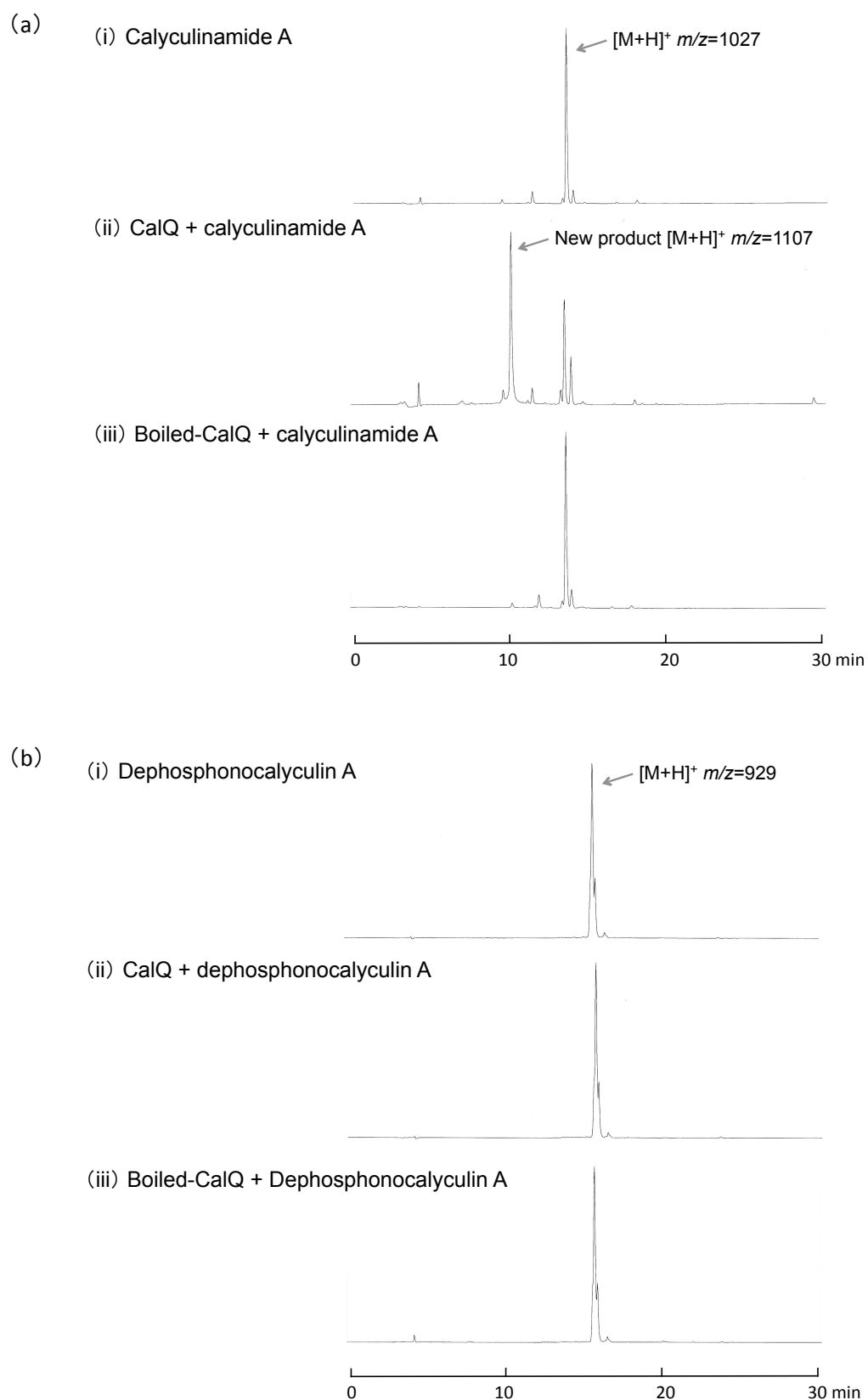


Fig. 85 CalQ の *in vitro* 酵素反応

(a) Calyculinamide A、(b) Dephosphonocalyculin A、(i) 基質のみ、(ii) 基質および CalQ 酵素反応液、(iii) 基質および煮沸変性 CalQ 反応液

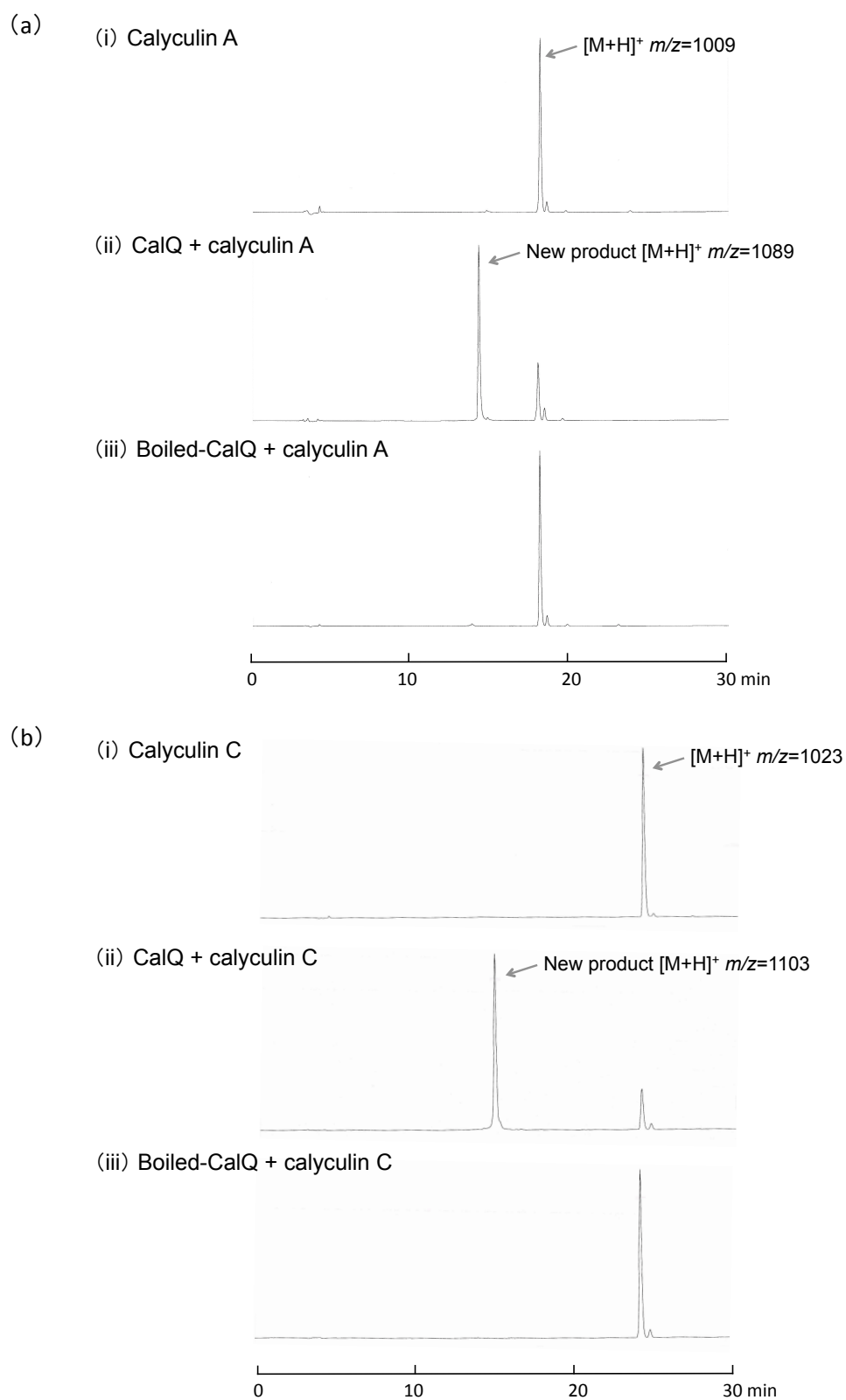


Fig. 86 Calyculin A および C と CalQ 酵素反応生成物

(a) Calyculinamide A、(b) Dephosphonocalyculin A、(i) 基質のみ、(ii) 基質および CalQ 酵素反応液、(iii) 基質および煮沸変性 CalQ 反応液

第 4 節 海綿 *Discodermia calyx* 抽出物の再精査

海綿 *D. calyx* 抽出物の再精査

これまで伏谷らや私たちのグループによって *D. calyx* の成分研究が遂行されてきたが、calyculin A や calyculinamide A がリン酸化された化合物の報告は皆無であった。そこで、リン酸化された calyculin 類の天然における存在意義を明らかにするために、海綿 *D. calyx* の抽出物を再度精査することとした。採集後-30 °C にて保存しておいた *D. calyx* の MeOH 抽出物を再分析したが、主に含まれるのは calyculin A であり、そのリン酸化体は検出されなかった (Fig. 87a)。凍結保存中におこる酸化などによる代謝物の変化を考慮し、採集直後の新鮮な海綿の抽出物を分析した。採集後の *D. calyx* を EtOH や DMSO、人工海水 CMF-ASW、50 mM Tris-HCl (pH8.0) で抽出し、ODS-HPLC にて分析したが、凍結保存海綿の MeOH 抽出物と同様に主に検出されるのは calyculin A であった (Fig. 87b)。そこで、*D. calyx* を採集後、直ちに液体窒素中で瞬間凍結し、凍結乾燥した海綿の MeOH 抽出物を分析した。その結果、上記の抽出方法において主要代謝物として認められた calyculin A はほとんど検出されず、その代わりに calyculin A と同一の極大吸収を有する新規ピークを主要代謝産物として検出した (Fig. 87c, 88)。さらに、同様の極大吸収を有する凍結海綿では認められなかったマイナーなピークも検出した。新たに認めたこれらの化合物について LC-MS 解析を行った結果、 $m/z = 1089$ および 1103 が得られ、それぞれ calyculin A および C より分子量が 80 増加した化合物であることが判明した。さらに、ODS-HPLC 分析により、これらは calyculin A および C を基質とした際に得られた CalQ 酵素反応生成物と一致することを明らかにした (Fig. 87d, e)。

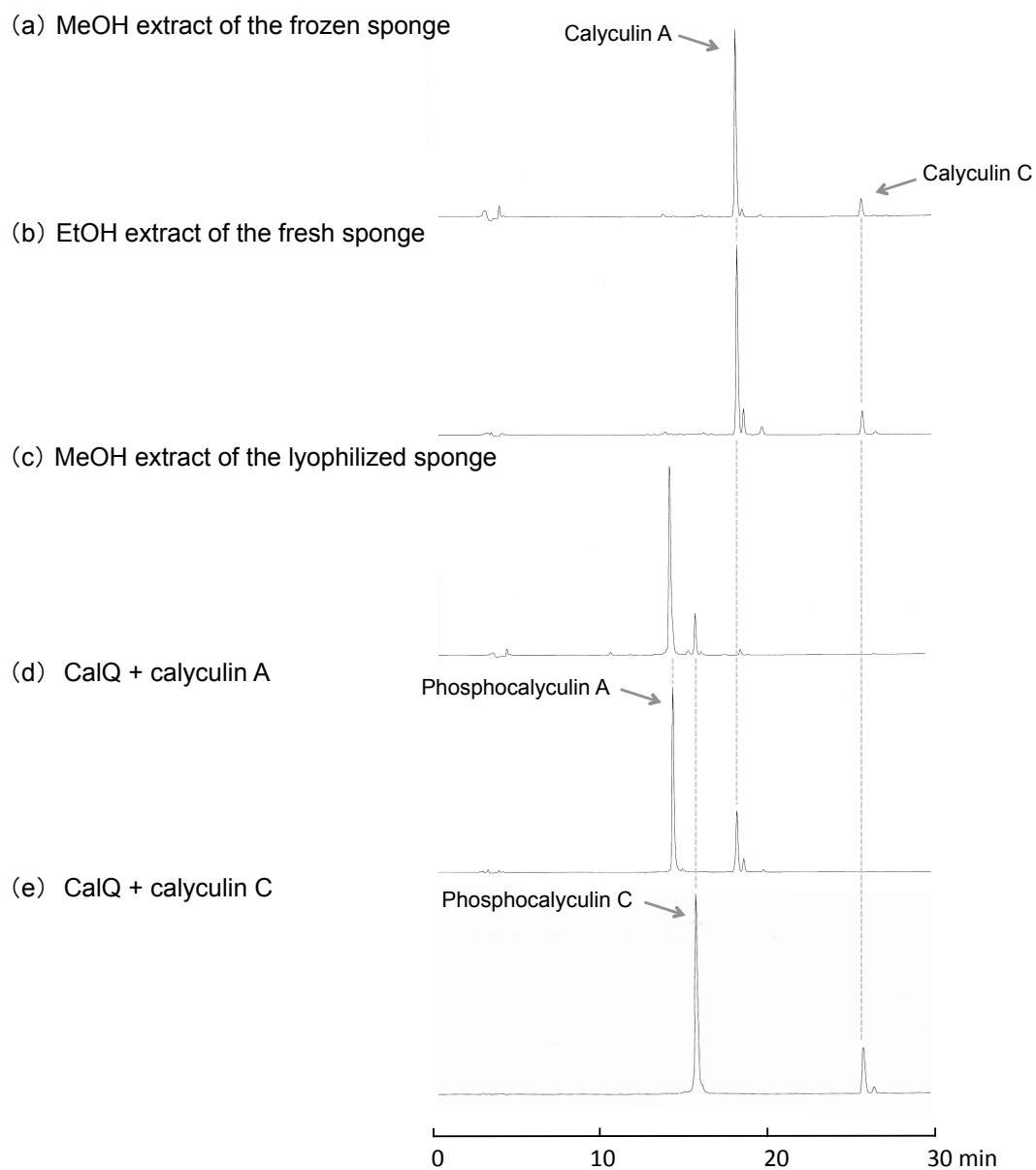


Fig. 87 海綿 *D. calyx* 抽出物の ODS-HPLC 分析

(a) 凍結保存海綿 *D. calyx* MeOH 抽出物、(b) 新鮮な生海綿 *D. calyx* EtOH 抽出物、(c) 凍結乾燥海綿 *D. calyx* MeOH 抽出物、(d) Calyculin A および CalQ 酵素反応生成物、(e) Calyculin C および CalQ 酵素反応生成物

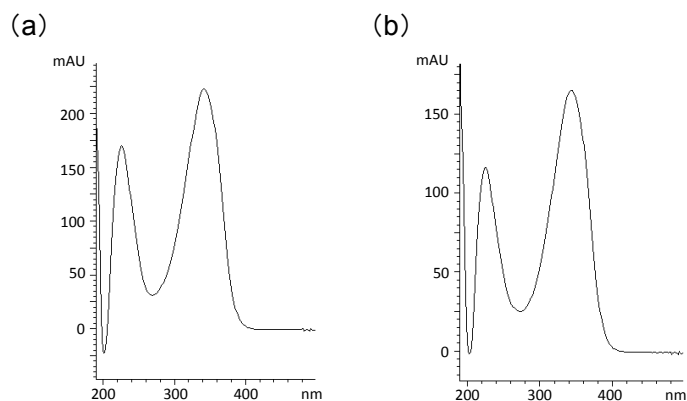


Fig. 88 UV 吸収スペクトル (a) Calyculin A、(b) Phosphocalyculin A

第 5 節 Phosphocalyculin A および C の単離と構造決定

新規化合物の構造決定

海綿 *D. calyx* の MeOH 抽出物の再精査により、採集後、液体窒素により瞬間凍結し、凍結乾燥した海綿抽出物には CalQ の酵素反応生成物と一致する化合物が主要代謝産物として含まれることを明らかにした。これらの化合物を構造決定するために、凍結乾燥海綿より単離・精製することとした。凍結乾燥海綿 *D. calyx* を MeOH 抽出し、ゲルろ過 LH-20 カラムに供した。得られた新規化合物画分を ODS-HPLC および Hilic-HPLC 分取により精製し、無色の粉末の phosphocalyculin A 17.4 mg および phosphocalyculin C 6.8 mg を得た (Fig. 89)。¹H-NMR および ¹³C-NMR 解析の結果、phosphocalyculin A のスペクトルは calyculin A とほぼ一致していた。¹³C-NMR 解析により、C17 ($^2J_{C,P} = 6.0$ Hz) と C16 ($^3J_{C,P} = 7.2$ Hz) においてダブルットのシグナルが認められた一方で、その他の炭素原子に相当するシグナルは全てシングレットであった。このことから、calyculin A の水酸基はいずれもリン酸基が結合していないことが判明した。さらに、³¹P-NMR 解析により 2 本のダブルットのシグナル ($^2J_{P,P} = 16.0$ Hz) を検出したことから、本化合物を calyculin A のリン酸基部分がリン酸化されたピロホスフェート体 phosphocalyculin A と構造決定した (Fig. 90)。また、phosphocalyculin C は phosphocalyculin A のスペクトルとほぼ類似していた。両者で大きく異なる点として、phosphocalyculin A は 1-2 ppm の高磁場領域に 4 つのダブルットのシグナルが認められたのに対し、phosphocalyculin C では 5 つのダブルットのシグナルを確認した。さらに、HMBC 解析の結果、C32 位がメチル化されていることが支持され、calyculin C と同様の骨格であることが判明した。また、phosphocalyculin A の場合と同様に、¹³C-NMR 解析において、C17 ($^2J_{C,P} = 6.0$ Hz) および C16 ($^3J_{C,P} = 6.0$ Hz) のみダブルットのシグナルが認められ、³¹P-NMR 解析で 2 本のダブルットのシグナル ($^2J_{P,P} = 16.1$ Hz) を確認したことから、本化合物を calyculin C のピロホスフェート体 phosphocalyculin C と構造決定した (Fig. 90)。

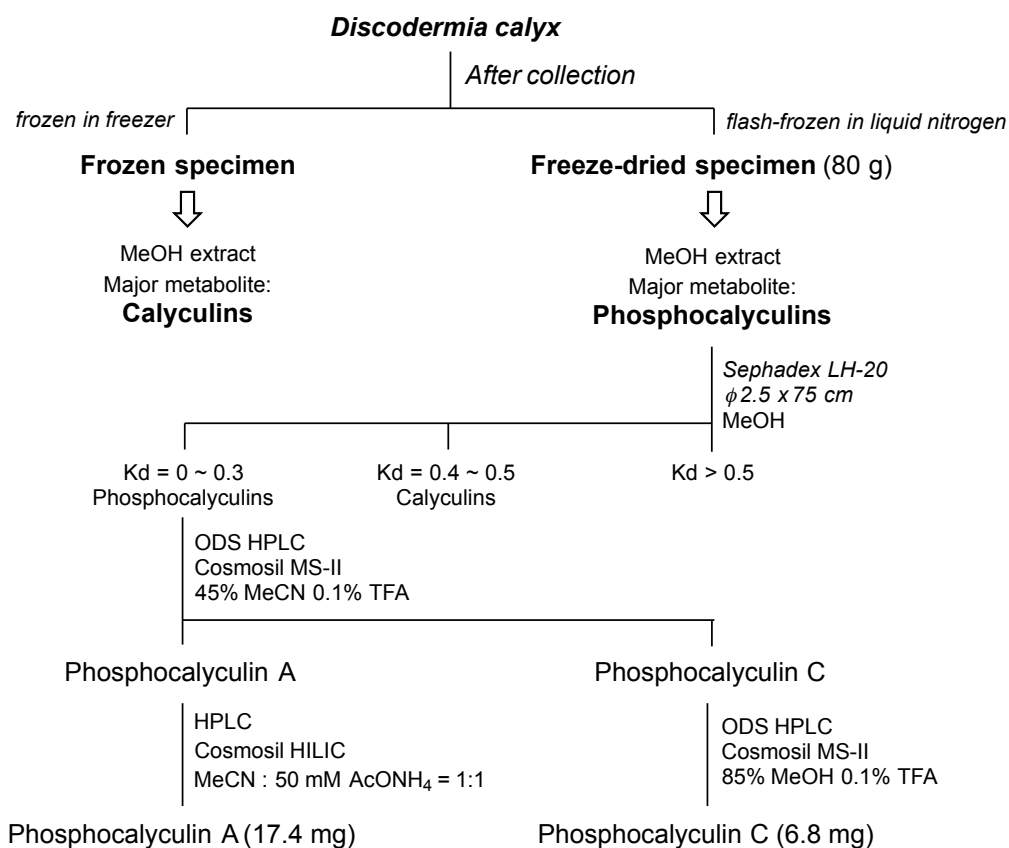
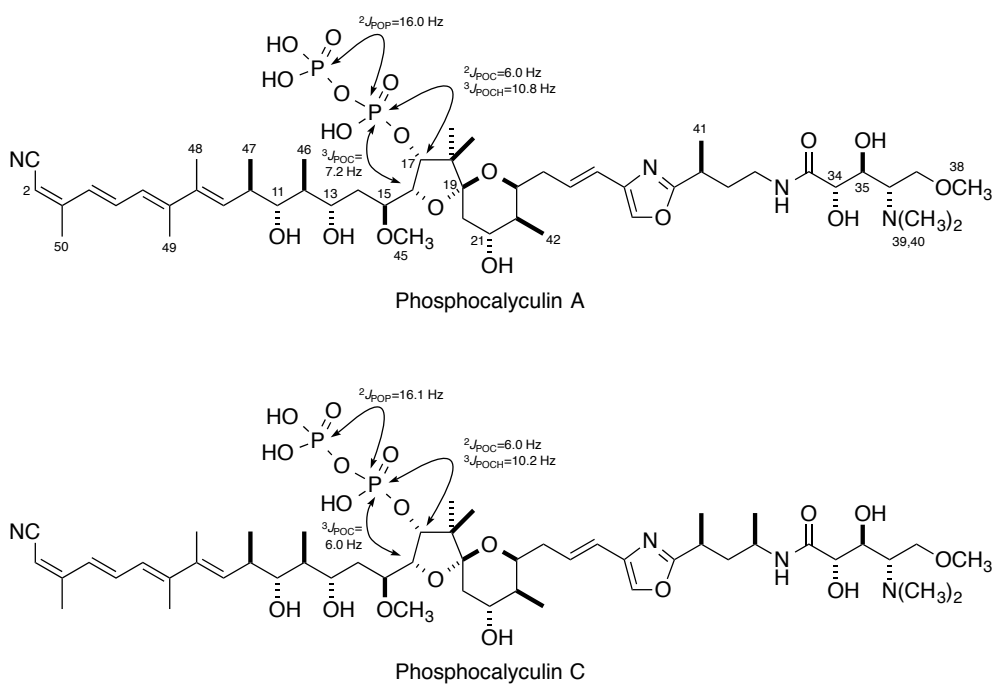


Fig. 89 Calyculin 新規類縁体の精製チャート



第 6 節 小括

cal 遺伝子の配列から推測される PKS-NRPS 産物が最終的に calyculin A へと変換されるには、いくつかの修飾反応が必要であることから、本章において、予想される修飾酵素の機能解析を試みた。17 位のリン酸化およびニトリルの生合成において、リン酸基転移反応が重要な役割を担っていることが推測された。そこで、クラスターの上流に存在する phosphotransferase と配列相同性を有する 3 つの ORF、*calM*、*calP* および *calQ* にコードされているタンパク質を大腸菌を宿主として異種発現した後に、*in vitro* における機能解析を行った。その結果、APH と配列相同性を示す CalQ と calyculin A および C、calyculinamide A との酵素反応液においてそれぞれ分子量が 80 増加した新規生成物を得た。CalQ は calyculin 類をリン酸化することを明らかにしたが、これまでに天然からリン酸基が 1 分子付加した calyculin 類縁体の報告例はなかった。そこで、海綿抽出物を再度精査した。様々な溶媒や緩衝液を用いた抽出方法を試したが、検出される主要代謝産物は calyculin A および C であった。一方で、海綿を採集後、液体窒素下で瞬時に凍結させ、そのまま凍結乾燥した *D. calyx* の MeOH 抽出物では、calyculin A および C は検出されず、その代わりに分子量が 80 増加した $m/z = 1089$ および 1103 を有する化合物が新たに検出された。さらに、これらはそれぞれ calyculin A および C を基質として用いた場合の CalQ 酵素反応生成物と一致することが明らかとなった。そこで、これらの化合物を凍結乾燥海綿 MeOH 抽出物より分画・精製した結果、calyculin A および C のピロホスフェート体 phosphocalyculin A および C と構造決定した。

本章において、*cal* 遺伝子の機能解析によりピロホスフェート体 phosphocalyculin A および C を海綿 *D. calyx* より新たに発見し、さらに、これらが生合成の最終産物であることを明らかにした。同時に、*cal* 遺伝子にコードされている CalQ は calyculin 生合成に関与するタンパク質であることを示した。これらの結果は、*cal* 遺伝子が calyculin の生合成遺伝子であることを強く支持するものである。また、本章で見出した結果は、主要代謝産物として単離構造決定された天然物が必ずしも生合成最終産物であるとは限らないことを提示する。

第 4 章 海綿 *Discodermia calyx* における phosphocalyculin A の意義の解明

第 1 節 序論

第 3 章においてピロホスフェート体 phosphocalyculin A および C を新たに単離し、本化合物が合成の最終産物であることを明らかにした。本章では海綿 *D. calyx* における phosphocalyculin 類の存在意義の解明を目指した。

第 2 節 Phosphocalyculin A の生物活性

細胞毒性試験

Phosphocalyculin A のマウス白血病細胞 P388 およびヒト子宮頸癌細胞 HeLa に対する細胞毒性を MTT アッセイにより検討した。その結果、phosphocalyculin A の IC₅₀ は calyculin A より約 1,000 倍高い値を示すことが判明した (Table 6)。

抗菌活性試験

Phosphocalyculin A の抗菌活性をペーパーディスク法により検討した。アッセイには 4 種類の微生物 *Escherichia coli*、*Bacillus cereus*、*Saccharomyces cerevisiae*、*Candida albicans* を用いた。その結果、calyculin A と phosphocalyculin A のグラム陰性菌 *E. coli* およびグラム陽性菌 *B. cereus* に対する抗菌活性は認められなかった。一方で、酵母 *S. cerevisiae* および糸状菌 *C. albicans* に対して穏和な活性を示し、その強さは calyculin A の方が phosphocalyculin A より約 100~1000 倍高いことが判明した (Table 6)。

脱リン酸化酵素阻害活性試験

Phosphocalyculin A の脱リン酸化酵素 PP2A に対する阻害活性を検討した。その結果、phosphocalyculin A の IC₅₀ は calyculin A より約 40 倍高い値を示すことが明らかとなった (Table 6)。

Table 6 Phosphocalyculin A の生物活性

	Phosphocalyculin A	Calyculin A
<i>Cytotoxicity</i> (IC ₅₀)		
HeLa	50 nM	0.02 nM
P388	120 nM	0.07 nM
<i>Antimicrobial</i>		
<i>E. coli</i>	-	-
<i>B. cereus</i>	-	-
<i>S. cerevisiae</i>	+, >500 µg/disc	+, >0.5 µg/disc
<i>C. albicans</i>	+, >50 µg/disc	+, >0.5 µg/disc
<i>Enzyme Inhibition</i> (IC ₅₀)		
PP2A	200 nM	5 nM

Half maximal (50%) inhibitory concentration (IC₅₀)

第3節 Phosphocalyculin A から calyculin A への変換

凍結乾燥海綿 *D. calyx* 抽出物の分析

第3章において、新鮮な海綿 *D. calyx* より直接 MeOH 抽出した試料と瞬間凍結後凍結乾燥した試料の MeOH 抽出物に含まれる代謝産物には大きな違いがあることを明らかにした。この違いの要因を探るため、採集後直ぐに瞬間凍結および凍結乾燥した *D. calyx* を H₂O、50%、100% MeOH で抽出し、含まれる化合物を ODS-HPLC にて分析した。その結果、100% MeOH 抽出物には phosphocalyculin A が主に含まれるのに対し、H₂O 抽出物では calyculin A が主要代謝産物であることを確認した (Fig. 91)。また、50% MeOH 抽出物には、phosphocalyculin A および calyculin A が約 9 : 1 の割合で含まれることを確認した。そこで、50% MeOH 抽出物について経時的に分析した。その結果、時間が経つにつれて徐々に phosphocalyculin A から calyculin A へ変換されることが判明した (Fig. 92a-d)。一方で、精製した phosphocalyculin A を室温下、H₂O 中で放置した場合、calyculin A への変換はほとんど認められなかった (Fig. 92e)。これらの結果より、phosphocalyculin A から calyculin A への変換には *D. calyx* の存在が必須であることが判明した。また、H₂O 抽出過程では瞬時にこの変換反応が起こることから、phosphocalyculin A の脱リン酸化は酵素依存の変換であると推測した。

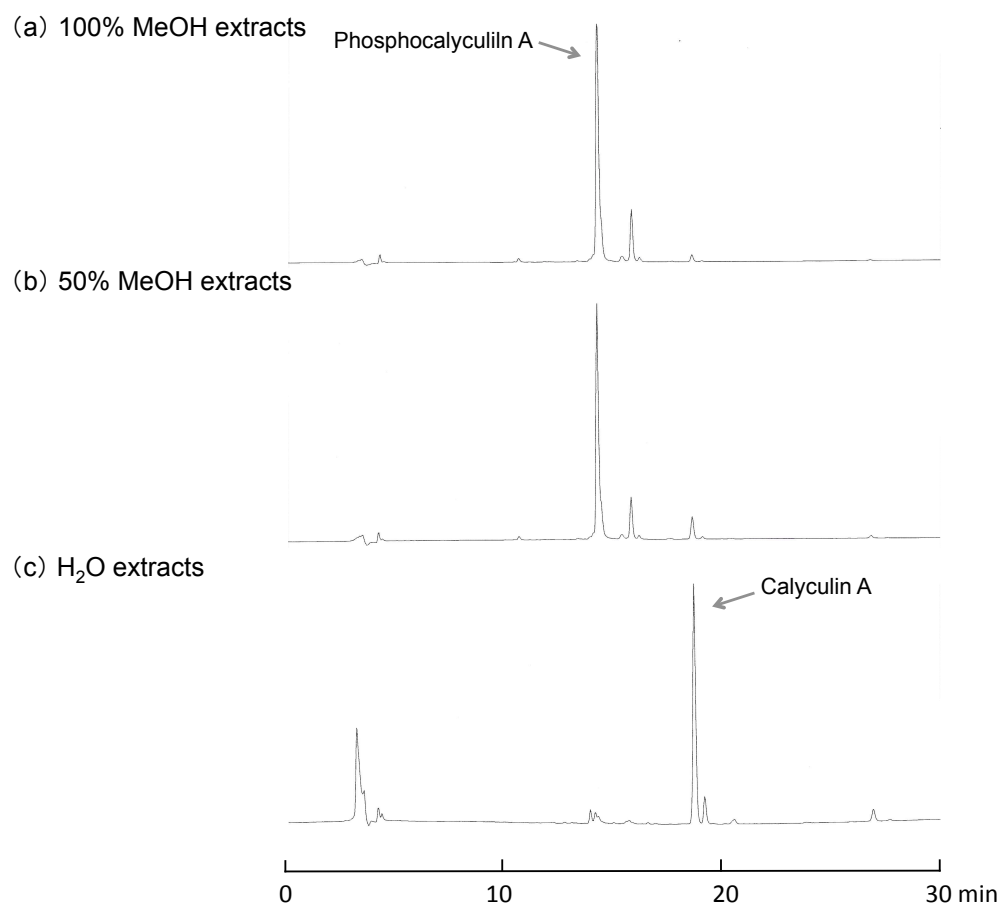


Fig. 91 凍結乾燥 *D. calyx* 抽出物の分析 (a) MeOH 抽出、(b) 50% MeOH 抽出、(c) H₂O 抽出

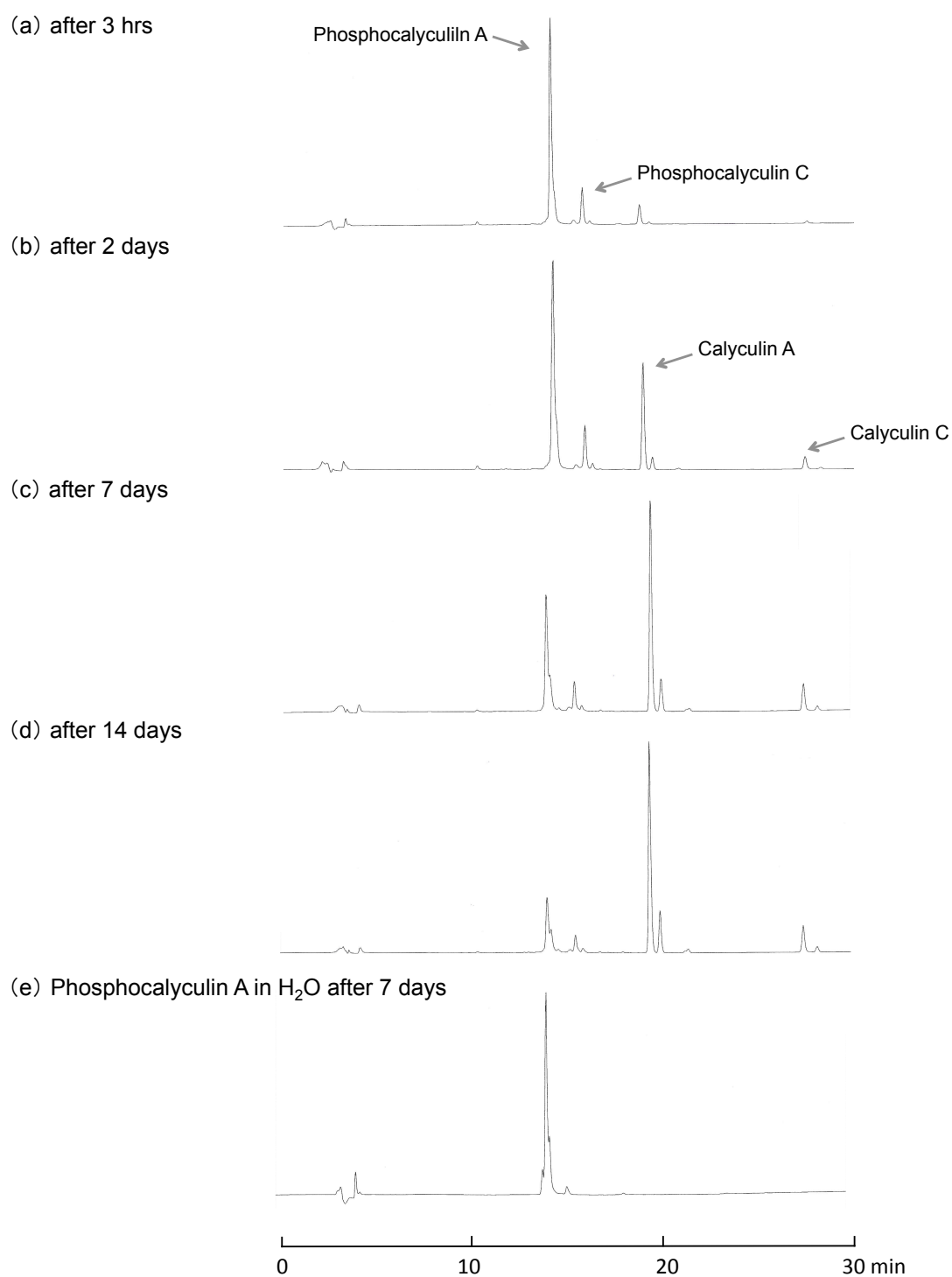


Fig. 92 凍結乾燥 *D. calyx* 50% MeOH 抽出物の経時的な変化 (a) 3 時間後、(b) 2 日後、(c) 7 日後、(d) 14 日後、(e) H₂O 中で 7 日間放置した精製 phosphocalyculin A

海綿粗酵素液による phosphocalyculin の脱リン酸化

Phosphocalyculin の脱リン酸化が酵素依存的であることを検討するために、海綿 *D. calyx* より粗酵素を抽出し、phosphocalyculin を主要に含む凍結乾燥 *D. calyx* の MeOH 抽出物と反応させた。その結果、粗酵素を加えて数分の間に phosphocalyculin から calyculin へ変換されることを確認した (Fig. 93b)。一方で、90 °C にて 20 分間熱変性した粗酵素液では phosphocalyculin の脱リン酸化が認められなかった (Fig. 93c)。また、同じ Theonellidae 科に属する海綿 *Discodermia kiiensis* および *T. swinhoei* の粗酵素液を用いた場合においても、phosphocalyculin の脱リン酸化が認められなかった (Fig. 93d)。以上の結果から、phosphocalyculin から calyculin への変換が海綿 *D. calyx* 特異的に存在する酵素によって進行することを確認した。これらの結果と合わせて、第 3 章第 4 節の海綿抽出物の再分析において、採取後の新鮮な海綿 *D. calyx* の EtOH 抽出物では phosphocalyculin は検出されず、既に calyculin へ変換されていたこと、および、本章第 2 節の生物活性試験の結果から考察すると、海綿に何らかの外部刺激が加わった際に、不活性化体である phosphocalyculin から強力な細胞毒性を示す calyculin へと瞬時に変換されることが示唆された。

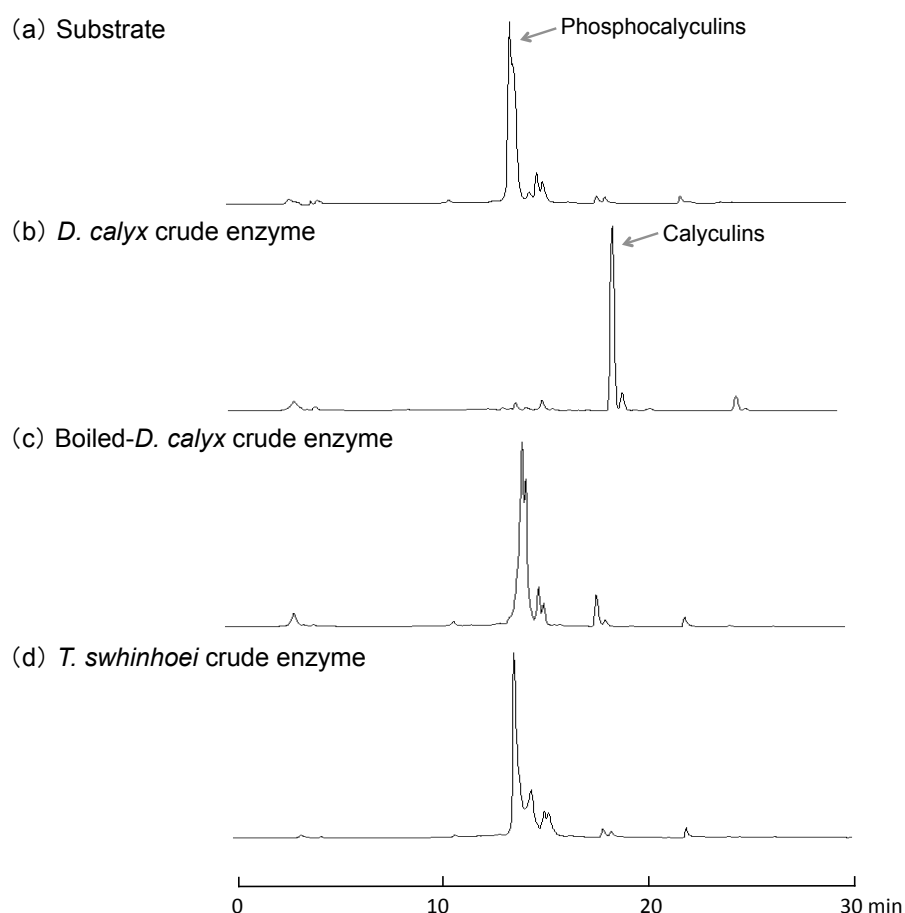


Fig. 93 海綿粗酵素液を用いた phosphocalyculin 脱リン酸化反応の検討

(a) 基質（凍結乾燥海綿 *D. calyx* MeOH 抽出物）、(b) 海綿 *D. calyx* 粗酵素液、(c) 煮沸変性した *D. calyx* 粗酵素液 (d) 海綿 *T. swinhoei* 粗酵素液

CalL による phosphocalyculin 脱リン酸化反応の検討

cal 遺伝子には、金属依存性タンパク質脱リン酸化酵素と配列相同性を示す *calL* が認められ、本遺伝子がコードするタンパク質 CalL が phosphocalyculin 類の脱リン酸化酵素である可能性が考えられた。そこで、CalL を異種発現し、酵素反応を行うこととした。第 3 章第 3 節における CalM、CalP および CalQ の異種発現と同様の方法にて、大腸菌を宿主として様々な条件下での発現を試みたが、CalL 単独での異種発現で得られるタンパク質はすべて封入体であった。そこで、分子シャペロン GroES および GroEL¹⁸⁹⁾との共発現を行った結果、目的のタンパク質を可溶性画分に得た。N 末端 His タグ融合タンパク質 Nhis-CalL として発現させ、Ni アフィニティーカラムを用いて目的のタンパク質を精製した (Fig. 94)。精製後の Nhis-CalL を用いて、phosphocalyculin 類との酵素反応を試みた。酵素反応における補酵素が不明であったため、海綿抽出液を煮沸にてタンパク質を変性後、その上清を反応液に添加した。また、複数の 2 価金属イオン (Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Ca^{2+}) 存在下における酵素反応についても試みた。しかしながら、現段階では、いずれの反応条件においても CalL による phosphocalyculin 脱リン酸化活性は検出されていない。

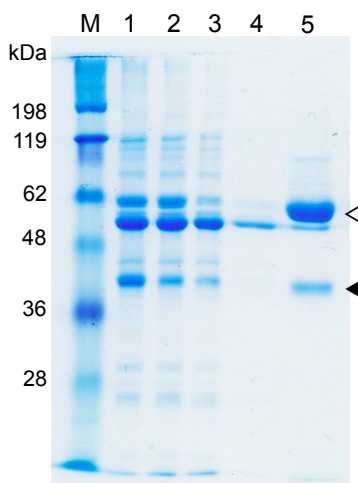


Fig. 94 CalL の異種発現と Ni アフィニティーカラムによる精製

M; Protein marker、1; CalL 発現後全タンパク質画分、2; 可溶性画分、3; Flow through 画分、4; 洗浄画分、5; 溶出画分、▲; Nhis-CalL、△; GroES-GroEL

第4節 海綿 *D. calyx* における activated chemical defense

Activated chemical defense の再現

第3節において、海綿 *D. calyx* における phosphocalyculin A から calyculin A への酵素依存的脱リン酸化反応は、外敵からの攻撃など組織傷害に起因することが示唆された。そこで、本節では海綿に物理的な傷害を与えた際に起こる代謝産物の変化を分析した。採集直後の海綿 *D. calyx* を2分間ナイフで切り刻むことによって物理的な傷害を与え、その後一定時間毎に液体窒素中で瞬間凍結し、そのまま凍結乾燥した。乾燥後の試料を MeOH 抽出し、ODS-HPLC にて分析した。その結果、物理的な刺激を受けていないコントロール群では phosphocalyculin A が主に含まれていたのに対し、傷害を受けた海綿組織においては phosphocalyculin A から calyculin A へ瞬時に変換されることを確認した (Fig. 95)。

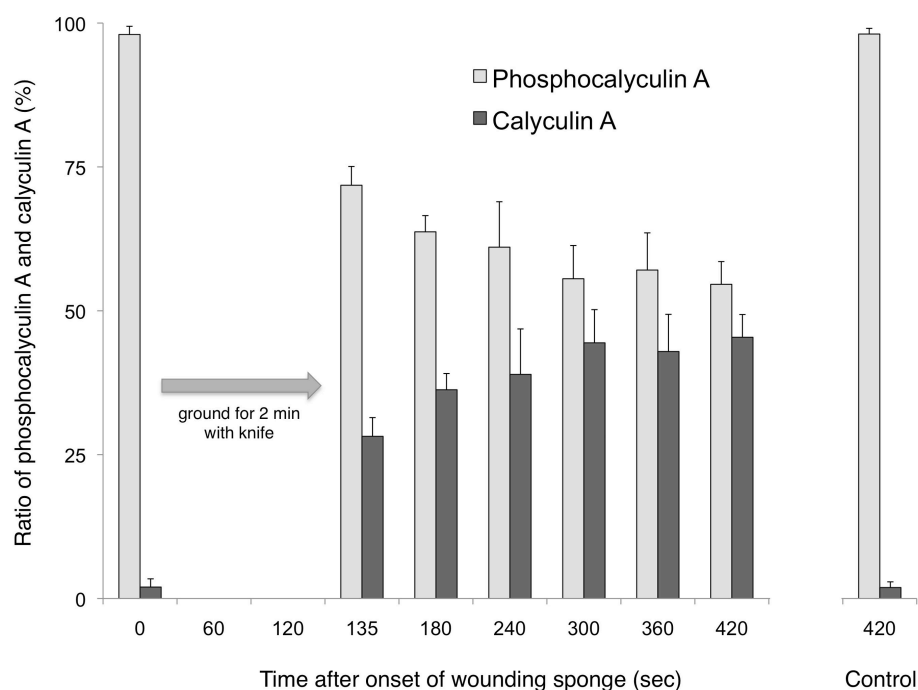


Fig. 95 海綿組織傷害による phosphocalyculin A の生物変換

第 5 節 小括

本章において、1) phosphocalyculin A の細胞毒性は calyculin A より約 1,000 倍減弱すること、2) 海綿 *D. calyx* に物理的な傷害を与えた際に phosphocalyculin A が瞬時に脱リン酸化され calyculin A が生成すること、3) phosphocalyculin 類の脱リン酸化は *D. calyx* に特異的に存在する酵素によって反応が進行することを明らかにした。これらの結果を踏まえると、*D. calyx* における phosphocalyculin-calyculin 変換システムは activated chemical defense 機構に基づくと考えられる (Fig. 96)。Activated chemical defense 機構は、1) 生物活性が低い化合物から高い化合物へ変換される、2) 数秒から数分間に瞬時に化合物変換される、3) 酵素依存的に化合物変換される化学防御機構と定義されており¹⁹⁰⁾、本章で得られた結果はこれらを満たす。タンパク質のリン酸化-脱リン酸化は真核生物において重要な生体反応であり、タンパク質脱リン酸化酵素を強力に阻害する calyculin A は海綿自身にとって有毒であることが推測される。そこで、*D. calyx* は化学防御物質として calyculin 類を利用する際に、リン酸化により不活性化された phosphocalyculin 類を前駆体として貯蔵し、外敵からの攻撃など防御が必要な際に瞬時に活性化体 calyculin 類へ変換することで自己に対する毒性を制御しながら身を守っていると考えられる。これまでに報告されている海綿における化学防御物質と自己耐性機構の研究例は数少ないが、その 1 例として calyculin A と同様にタンパク質脱リン酸化酵素を阻害する okadaic acid の例が挙げられる。Okadaic acid が単離された海綿 *H. okadaii* からは okadaic acid binding protein (OABP) 1 および 2 が自己耐性に関わる結合タンパク質として同定されている^{191), 192)}。本研究において、海綿 *D. calyx* には、*H. okadaii* における自己耐性システムとは異なる毒性回避機構が備わっていることを見出した。

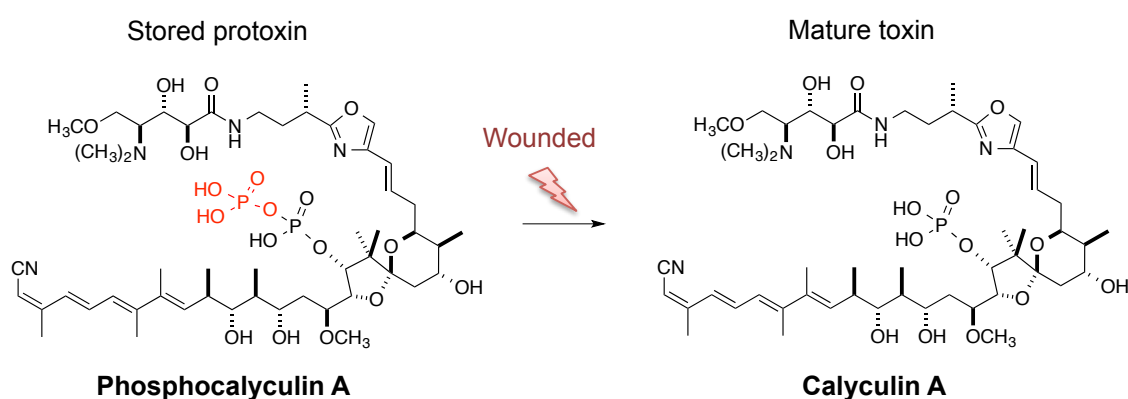


Fig. 96 海綿 *D. calyx* における calyculin A を利用した activated chemical defense 機構

Activated chemical defense は、高等植物において見出された化学防御機構である¹⁹³⁾。その例としてシアノヒドリン配糖体を利用した化学防御機構が挙げられる。植物に蓄積されたシアノヒドリン配糖体が β -グリコシダーゼによって分解し、生じたアグリコンがシアン化水素となることで毒性を発現する。前駆体は液胞や細胞質に、活性化酵素である β -グリコシダーゼは葉緑体にそれぞれ貯蔵されており、外敵からの組織傷害に伴って両者が混合することで、毒性物質が瞬時に生成する。高等植物に広く分布する防御機構である一方で、海綿動物における activated chemical defense 機構の報告はわずか 2 例のみである。1993 年、P. Proksch らのグループによって、地中海産 *Aplysina* 属海綿におけるジブロモチロシン由来アルカロイドの組織傷害依存的な変換機構が初めて報告された^{194), 195)}。また、2008 年には P. J. Schupp らによってグアム近海に生息する海綿 *Aplysinella rhax* より psammaphin A の脱硫酸化による化学防御機構が報告された¹⁹⁶⁾。これらはいずれも前駆体から活性本体への化合物変換のみの報告である。本研究では、海綿 *D. calyx* における activated chemical defense 機構を生合成遺伝子を基に初めて示した。

詳細は不明であるが、毒性制御機構について本章で得られた結果を基に考察する。まず、本章第 3 節において、凍結乾燥海綿の H₂O 抽出物では calyculin 類が主に検出されたことから考察すると、活性化を担う phosphocalyculin 脱リン酸化酵素は傷害を受けて発現するのではなく、既に海綿に保持されていると考えられる。また、第 4 節において、海綿を破砕した直後は時間依存的に phosphocalyculin の脱リン酸化が起こる一方で、破砕後 5 分辺りを過ぎるとこの変換反応は頭打ちとなり 100%の変換は認められなかった。この結果から、海綿の組織傷害に伴う phosphocalyculin 脱リン酸化反応は、海綿全体で生じるのではなく、傷害を受けた部位局部的に起こると考えられる。つまり、必要最小限の毒性発現が伺える。この酵素依存的な phosphocalyculin 脱リン酸化反応は、何が引き金となって活性化するのか、巧妙な毒性発現の制御機構については不明であるが、現段階において 2 つの可能性が考えられる。1 つ目として、高等植物におけるシアノヒドリン配糖体の活性化機構と同様に、活性型の脱リン酸化酵素が phosphocalyculin 類とは異なる分画に局在し、細胞膜が傷害を受けることで両者が混じり合い calyculin 類が生成する機構である。もう 1 つの可能性として、不活性型の脱リン酸化酵素が海綿組織の傷害に伴い、修飾などにより活性化される機構が考えられる。また、phosphocalyculin 脱リン酸化酵素が、calyculin 生産菌 '*Candidatus Entotheonella*' sp. 由来か、海綿由来か、あるいは全く異なる共生微生物由来か、その起源にも興味を持たれる。Calyculin 類を利用した細胞毒性発現機構の詳細な解明は今後の課題である。

総括

本研究において私は、化合物の構造と *trans*-AT 型 PKS 特有の配列情報の相関を基にしたメタゲノムマイニングにより式根島産海綿 *D. calyx* を起源とする細胞毒性物質 calyculin A の生合成遺伝子の取得に成功した。2000 年以降、ゲノムシーケンス技術の革新により様々な微生物のゲノム解析が急速に進み、多くの二次代謝産物の生合成遺伝子が同定されてきた。その一方で、海綿を起源とする生物活性物質の生合成遺伝子の取得は依然として困難な状況にある。本成果は、*trans*-AT 型 PKS に由来する二次代謝産物において、複雑な海綿メタゲノムからでも効率的にその生合成遺伝子が探索可能であることを示している。

Calyculin A は、ニトリルや 5,6-スピロアセタール環、リン酸エステルなどユニークな部分構造を有しており、その生合成機構には興味を持たれる。本研究によって取得した *cal* 遺伝子には 34 モジュールからなる PKS および NRPS がコードされており、その配列情報から推測可能な生合成産物は、calyculin A の骨格と非常に良い一致を示していた。これまでに報告されている *trans*-AT 型 PKS には、モジュールの外に存在する修飾酵素が生合成中間体に対して機能する例や、モジュールのスキップ、繰り返しなど遺伝子情報からは推測不可能で不規則な生合成経路をとる例が多く認められており、*cal* 遺伝子のように遺伝子情報と構造が高い相関性を示す例は珍しい。一方で、遺伝子クラスターの最も下流に位置する *calH* および *calI* には、calyculin A の構造とは相関が認められない 6 つのモジュールがコードされていた。海綿抽出液において、この余分なモジュールによって生合成されると推測可能な calyculin 類縁体は現在のところ検出されておらず、このモジュールの生合成的な意味について興味を持たれる。また、PKS-NRPS 産物が最終的に calyculin A の骨格へと成熟するためには、複数の修飾反応が必要であるが、本研究においてこれらの解明には至らなかった。特に、ニトリルおよびスピロアセタール環の生合成機構および酸化酵素と配列相同性を示す CalD によって触媒されると予想される減炭機構については、これまでに報告例が少なく、その解明は今後の課題である。

calK および *cal* 遺伝子の上流、下流には、複数の transposase が認められた。また、*calI* は八丈島産海綿 *T. swinhoei* の共生バクテリア '*Candidatus* Entotheonella factor TSY1' の機能未知 ORF と高い配列相同性を有していた。この機能未知 ORF は、polytheonamide 生合成遺伝子クラスターの両端にコードされている。さらに、*cal* 遺伝子の両端には約 1 kb の全く同一の核酸配列が認められた。これらの知見は、calyculin 生産菌が *cal* 遺伝子を水平伝播によって獲得した可能性を示唆する。

また、*cal* 遺伝子を用いたシングルセル解析によって共生バクテリア ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. を calyculin 生産菌として特定した。このように海綿メタゲノムから直接取得した生合成遺伝子の配列をもとに、生産菌の特定を達成した例は本研究が初めてである。‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. は、1996 年、D. J. Faulkner らのグループによってパラオ産海綿 *T. swinhoei* に共生する特徴的な形状を有するバクテリアで、二次代謝産物 theopalauamide の生産菌として初めて報告された¹⁶²⁾。さらに、2014 年には J. Piel らのグループによって同様のバクテリアが八丈島産海綿 *T. swinhoei* に由来するほとんどの二次代謝産物の生産を担っていることが示された¹⁵⁷⁾。その結果、‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. は二次代謝産物生産能に秀でたバクテリア “metabolically talented bacteria” として報告され、candidate phylum ‘Tectomicrobia’ が提唱された。私たちの研究室では、calyculin 以外に、式根島産海綿 *D. calyx* に由来する二次代謝産物 calyxamide 類や kasumigamide の生合成遺伝子が ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. にコードされていることを明らかにしており、*D. calyx* においても本バクテリアが化合物生産を担う重要な共生微生物であることが分かっている。従来より、*Discodermia* 属や *Theonella* 属が属するイシカイメン目の海綿は、医薬品リード化合物として有望視される二次代謝産物が特に多く単離されていることから、「生物活性物質の宝庫」として報告されている⁵⁸⁾。これらの多くが ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. によって生産されている可能性が示唆される。共生バクテリア ‘*Candidatus Entotheonella*’ sp. は未だ難培養性であるが、生産微生物の可培養化あるいは生合成遺伝子の異種発現系の開拓によって、希少生物資源である海綿由来有用天然物の供給法の確立に繋がることが期待される。

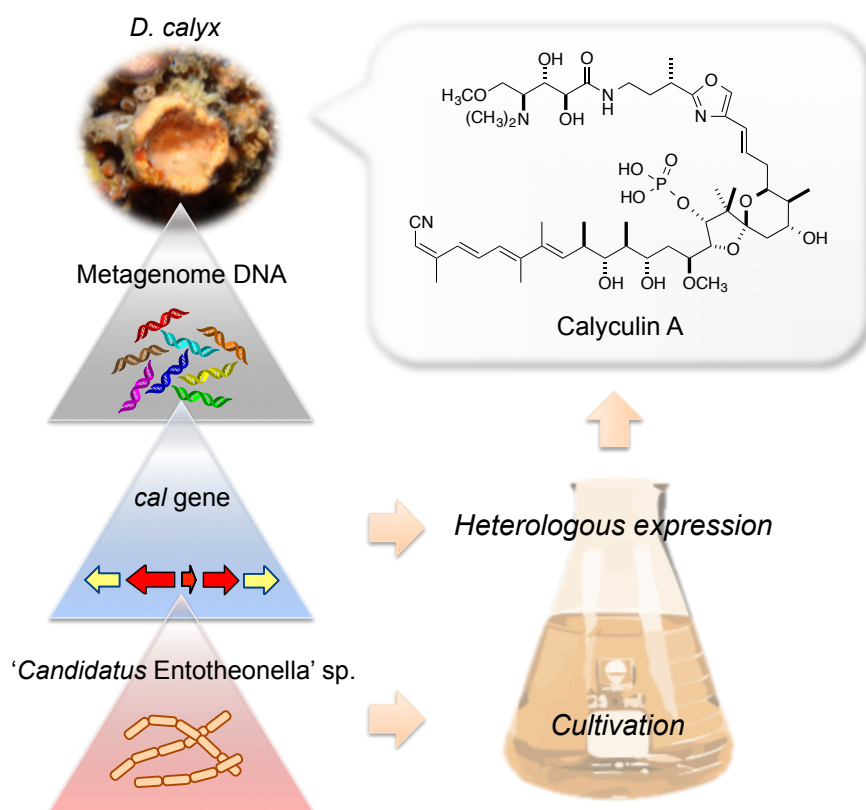


Fig. 97 本研究において提示する方法論と今後の可能性

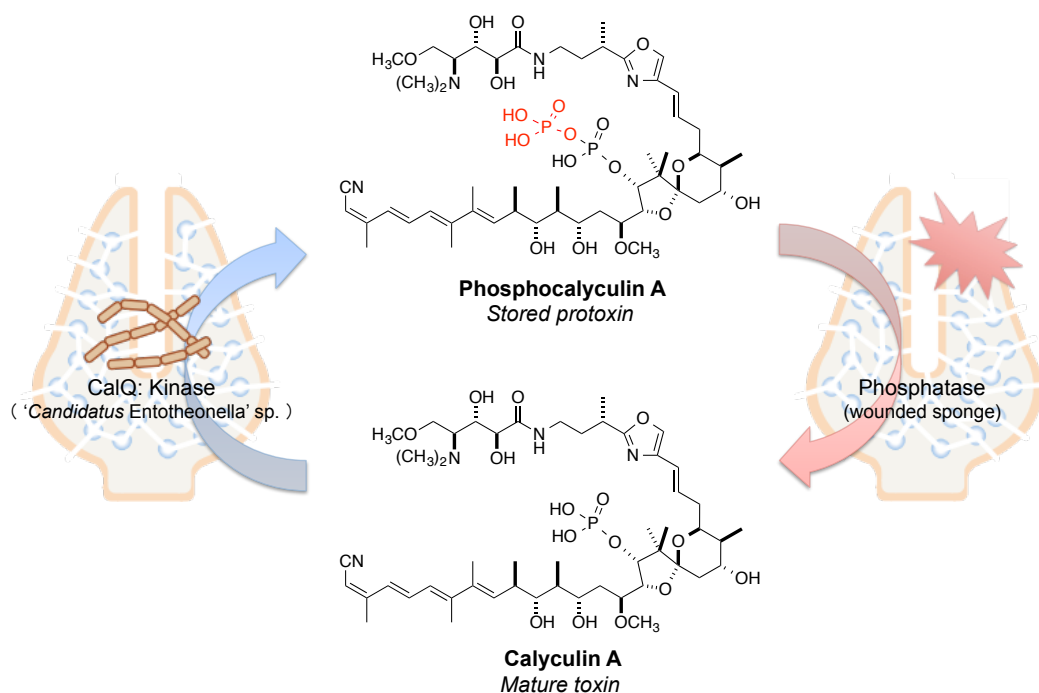


Fig. 98 海綿 *D. calyx* における activated chemical defense 機構

cal 遺伝子に含まれる calyculin 生合成修飾酵素の機能解析により、ピロホスフェート体 phosphocalyculin A および C を生合成の最終産物として新たに同定した。本研究結果は、本来短寿命であるために検出できなかった生合成最終産物を生合成遺伝子の解析をもとに示したと同時に、主要代謝産物として単離構造決定された天然物が必ずしも生合成の最終産物であるとは限らないことを提示する。さらに、phosphocalyculin A の生物活性は calyculin A より大きく減弱しており、それに加え、海綿組織の傷害に伴って phosphocalyculin 類から calyculin 類の酵素依存的な変換反応が認められた。以上の結果から、*D. calyx* には phosphocalyculin-calyculin を利用した “activated chemical defense” 機構が備わっていることを明らかにした (Fig. 98)。本研究は、海綿動物における “activated chemical defense” 機構を生合成遺伝子に基づいて示した初めて例である。

構造活性相関に関する研究から、calyculin A がリン酸化されることで生物活性が減弱する理由として以下のように考察する。Calyculin A のリン酸エステルはタンパク質脱リン酸化酵素 PP1 の活性中心に入り込み、さらに、テトラエン部分が酵素の疎水性ポケットにはまり込むことで酵素阻害活性を示す⁸³⁾。酵素阻害活性に最も重要な calyculin A のリン酸基がリン酸化修飾されることで、立体的なかさ高さが増し、酵素との親和性が減少すると考えられる。また、calyculin A のペプチド部分は酵素阻害活性には関与しない一方で、細胞毒性発現に必須である⁶⁴⁾。これは、calyculin A のペプチド部分に認められるジメチルアミノ基とリン酸基が水素結合により、擬似的な環状構造を形成することで分子の疎水性が増し、膜透過性を高めることに起因すると考えられている (Fig. 18)。ピロホスフェート体 phosphocalyculin 類の ¹H-NMR および ¹³C-NMR 解析において、calyculin 類のスペクトルと比較するとオキサゾール付近のケミカルシフトに顕著な変化が認められたことから、phosphocalyculin 類では calyculin 類で認められる擬似的な環状構造が変化している可能性が考えられる。

天然物のリン酸化による生物活性の減弱は、アミノグリコシド系抗生物質やクロラムフェニコール生産菌あるいはその耐性菌において広く見出されている。これらは自己耐性を獲得するための化合物修飾である。一方で、本研究で見出した calyculin 類のリン酸化の意義はこれらの例とは異なる。Phosphocalyculin 類および calyculin 類は大腸菌など原核生物に対する抗菌活性を示さないことから、これらは生産菌 '*Candidatus Entotheonella*' sp. にとって無害である可能性が高い。その一方で、calyculin 類の標的であるタンパク質脱リン酸化酵素は真核生物に普遍的に存在するため、calyculin 類は海綿に対して毒性物質である可能性が高い。つまり、calyculin 類のリン酸化は生産菌自身の耐性獲得ではなく、ホストである海綿に対する無毒化あるいは低毒化の役割を果たしていると推測される。ホストを気遣って、共生バクテリアが化学防御物質の前駆体を生産する本機構は、海綿動物と微生物との共生関係を探る上で非常に興味深い。また、真核生物においてタンパク質のリン酸化-脱リン酸化は、細胞周期やシグナル伝達などあらゆる生体反応を司る重要なシステムである¹⁹⁷⁾。同様に、原核生物においても二成分情報伝達系や低分子のリン酸化を介したシグナル伝達、環境応答が備わっている^{198), 199)}。本研究で見出した現象は、calyculin 類のリン酸化を介した海綿 *D. calyx* と共生バクテリア '*Candidatus Entotheonella*' sp. 間でのクロストークの可能性を示唆するものであり、生物におけるリン酸化反応の新たな重要性を提示する。本研究において、活性化を担う phosphocalyculin 脱リン酸化酵素が傷害を受けた海綿組織において機能することを明らかにしたが、その起源などについては未だ不明であり、今後、この巧妙な細胞毒性発現機構の解明を目指す。

実験項

本研究では、以下の実験機器・試薬類を用いた。

実験機器類

超純水装置	Elix® 5 UV, Milli-Q Labo (Millipore)
オートクレーブ	BS-325、KS-243 (Tomy)
遠心機	MX-305 (Tomy)
天秤	PJ400 (メトラー)
分光光度計	UV-1700 (SHIMADZU)、Gene Spec III (Hitachi)
ブロック恒温槽	DTU-1BN (TAITEC)
恒温振とう培養機	BR-42FL, BR-3000LF (TAITEC)
クリーンベンチ	CCV (Hitachi)
アガロースゲル電気泳動層	Mupid-2 plus (ADVANCE)
アガロースゲル撮影装置	AE-6933FXES-W (ATTO)
サーマルサイクラー	TP600 (Takara)
DNA キャピラリーシークエンサー	ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies)
次世代シークエンサー	Genome Analyzer II (Illumina) Ion PGM™ (Life Technologies)
光学顕微鏡	IX70 (OLYMPUS)、AE30-SA1 (SHIMADZU)
蛍光顕微鏡	AF6000 (Leica)
レーザーマイクロダイセクション	LMD7000 (Leica)
超音波ホモジナイザー	UH-300 (SMT)
凍結乾燥機	FDU-2200 (EYELA)
HPLC	LC solution (SHIMADZU)
LC-MS	Agilent 1100 series (Agilent technologies) JMS-T 100LP AccuTOF LC-plus (JEOL)
NMR	ECX-500、ECA-500 (JEOL)
旋光度計	DIP-1000 Digital Polarimete (JASCO)
細胞培養用 CO ₂ インキュベーター	NAPCO7000 (Thermo Fisher Scientific)
マイクロプレートリーダー	Infinite® 200 PRO (Tecan)

試薬・溶媒類

40(w/v)%-Acrylamide/Bis Mixed Solution (29:1) (ナカライ)

Agar (関東化学)

Agarose L (ニッポンジーン)

Agarose S (ニッポンジーン)

Ampicillin (ナカライ)

APS (ammonium peroxodisulfate) (Bio-Rad)

ATP (adenosine triphosphate) (和光純薬工業)

Bacto™ Polypeptone (BD Biosciences)

Bacto™ Tryptone (BD Biosciences)

Bacto™ Yeast extract (BD Biosciences)

CBB Stain One (Ready To Use) (ナカライ)

Chloramphenicol (ナカライ)

Chloroform (和光純薬工業)

EDTA・3Na (和光純薬工業)

Ethanol (和光純薬工業)

Ethidium bromide solution (和光純薬工業)

Formaldehyde (和光純薬工業)

Glycerol (関東化学)

GTP (guanosine triphosphate) (和光純薬工業)

dNTPs (deoxynucleoside triphosphate mixture) (日本ジェネティクス)

Hydrochloric acid (和光純薬工業)

Imidazole (ナカライ)

Isoamyl alcohol (和光純薬工業)

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) (ナカライ)

Hi-Di formamide (Life Technologies)

L-arabinose (和光純薬工業)

Methanol for LC-MS (関東化学)

MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (和光純薬工業)

Paraformaldehyde (和光純薬工業)

Sodium acetate (和光純薬工業)

Sodium chloride (和光純薬工業)

Sodium hydroxide (和光純薬工業)

Tris (hydroxymethyl) aminomethane (ナカライ)

10% Tween-20 (Bio-rad)

TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine) (ナカライ)

Urea (和光純薬工業)

生化学試薬類

DNA polymerase	KAPATaq Extra DNA polymerase (日本ジェネティクス) PrimeSTAR® HS DNA polymerase (Takara)
Ligase	DNA Ligation Kit Ver 2.1 (Takara)
DNase, RNase	DNase I (ニッポンジーン) Plasmid Safe ATP dependent DNase (Epicentre) RNase A (ニッポンジーン)
Restriction enzyme	<i>Hind</i> III (Takara) <i>Nde</i> I (Takara)
Protease	Proteinase K (和光純薬工業)
Protein phosphatase	PP2A (Merck millipore)
DNA ladder	KAPA DNA Universal Ladder (Nippon Genetics) λ-EcoT14 I/Bgl II digest (Takara)
Protein marker	Protein Markers for SDS-PAGE (ナカライ)

キット類

BigDye Terminator ver. 3.1 (Life Technologies)
BioNick™ DNA Labeling System (Life Technologies)
CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre)
Genomic DNA Buffer Set (QIAGEN)
Hi-Di formamide (Life Technologies)
Ion Xpress™ Library Kit (Life Technologies)
Ion OneTouch™ 200 Template v2 Kit (Life Technologies)
Ion PGM™ 200 Sequencing Kit (Life Technologies)
QIAGEN® Genomic-tip 20/G (QIAGEN)
QIAshredder (QIAGEN)
RNeasy® Mini Kit (QIAGEN)
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche)
TSA™ Plus Fluorescein System (PerkinElmer)
Ion 314™ Chip Kit (Life Technologies)
Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega)
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification Kit (Promega)

※キット類は添付のプロトコールに従って使用した

ベクター・プラスミド DNA 類

pT7blue (Novagen)
 pCC1FOS (Epicentre)
 pET22b (+) (Novagen)
 pColdII (Takara)
 Chaperone Plasmid Set (Takara)

大腸菌株

BL21 (DE3) $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacI lacUV5-T7 \text{ gene } 1 \text{ } ind1 \text{ } sam7 \text{ } nin5$
 BL21 (DE3) pLys $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacI lacUV5-T7 \text{ gene } 1 \text{ } ind1 \text{ } sam7 \text{ } nin5$ pLysS
 (Cam^R)
 BLR (DE3) $F^- ompT hsdS_B (r_B^- m_B^-) gal dcm lacI lacUV5-T7 \text{ gene } 1 \text{ } ind1 \text{ } sam7 \text{ } nin5$
 $\Delta(srl-recA)306::Tn10$ (Tet^R)
 DH5 α $F^- \phi80dlacZ\Delta M15 \Delta(argF-lacZAY)U169 \text{ } recA1 \text{ } endA1 \text{ } hsdR17 (r_K^- m_K^+) \text{ } supE44$
 $mcrA^- mcrB^+ \lambda^- \text{ } thi-1 \text{ } gyrA96 \text{ } relA1$
 EPI300TM-T1^R $F^- mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) \phi80dlacZ\Delta M15 \Delta lacX74 \text{ } recA1 \text{ } endA1 \text{ } araD139$
 $\Delta(ara, leu) 7697 \text{ } galU \text{ } galK \lambda^- \text{ } rpsL \text{ } nupG \text{ } trfA \text{ } tonA \text{ } dhfr$
 NovaBlue $endA1 \text{ } hsdR17 (r_{K12}^- m_{K12}^+) \text{ } supE44 \text{ } thi-1 \text{ } recA1 \text{ } gyrA96 \text{ } relA1 \text{ } lac$
 $F'[proA^+B^+ lacI^q ZAM15::Tn10]$ (Tet^R)

培養細胞株

HeLa DS ファーマバイオメディカルより購入
 P388 東京大学大学院理学系研究科福沢世傑先生より分与

培地・緩衝液類

LB 培地 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl
 LB 寒天培地 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 1.5% agar
 Semi-liquid LB 培地 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 0.6% SeaPrep[®] agarose
 YPD 培地 2% polypeptone, 1% yeast extract, 2% glucose
 サブロー培地 1% peptone, 4% glucose

※微生物培養用培地はすべて 121°C で 20 分間オートクレーブした

細胞培養用培地 RPMI1640 (和光純薬工業), 10% ウシ胎仔血清 (MP Biomedical),
 10 μ g/mL penicillin-streptomycin (Invitrogen)

※ウシ胎仔血清は 56 °C にて 30 分間インキュベートし、非働化した後に用いた

CMF-ASW¹⁶⁷⁾ 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 2.5 mM EGTA (pH8.0), 449 mM NaCl, 9 mM KCl,
 33 mM Na₂SO₄, 2.15 mM NaHCO₃

本研究で用いたプライマー

Primer name	Sequence
KSDPQQF	5'-MGN GAR GCN NWN SMN ATG GAY CCN CAR CAN MG-3'
KSHGTGR	5'-GGR TCN CCN ARN SWN GTN CCN GTN CCR TG-3'
KS1Up	5'-MGI GAR GCI HWI SMI ATG GAY CCI CAR CAI MG-3'
KSD1	5'-GGR TCI CCI ARI SWI GTI CCI GTI CCR TG-3'
degKS2F.i	5'-GCI ATG GAY CCI CAR CAR MGI VT-3'
degKS5R.i	5'-GTI CCI GTI CCR TGI SCY TCI AC-3'
degKS2F.gc	5'-GCS ATG GAY CCS CAR CAR CGS VT-3'
KSR5.gc	5'-GTS CCS GTS CCR TGS SCY TCS AC-3'
KSLF	5'-CCS CAG SAG CGC STS YTS CTS GA-3'
KSLR	5'-GTS CCS GTS CCG TGS GYS TCS A-3'
DKF	5'-GTG CCG GTN CCR TGN GYY TC-3'
DKR	5'-GCG ATG GAY CCN CAR MG-3'
M13F	5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3'
M13R	5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3'
A3F	5'-GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG-3'
A7R	5'-SAS GTC VCC SGT SCG GTA-3'
HMGSF	5'-GGS RTY GAY TTY RGC AAR TC-3'
HMGSR	5'-CTG WAR AAY TCS GAR CAR CAR CC-3'
DCKS4F	5'-TTG CCA CGA TCT CGA ACC G-3'
DCKS4R	5'-ATC CGG ACC TCG CAC AGA-3'
DCKS5F	5'-CAA TGA GGC CTC GGT GAT C-3'
DCKS5R	5'-AGC ATG CCA GCA TCG TTG GA-3'
DCKS8F	5'-CGA ATC GGG TTT TGC GAT CTC G-3'
DCKS8R	5'-CCA TCT GCA TCT CGG CCA A-3'
CalKS9F	5'-AAC CGC GTA TTG CCG CAT TG-3'
CalKS9R	5'-AGC GCT GAC AAC ACG ATC GGA-3'
CalKS26F	5'-GGA TGT ACA CTC AGG TTG ACC-3'
CalKS26R	5'-TAC ACC GCT GAT CGC GAG GA-3'
CalTEF	5'-CGA ACA GGA ACC ACT CAA CG-3'
CalTER	5'-AGT TCT GTC TCA CTC GTG TC-3'
27f	5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'
1492r	5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'
DCEnto2F	5'-TCG CCG GTC TGA GAT GAG CTT G-3'
DCEnto2R	5'-GCT TTG GGG GTA CCG TCA TCA TC-3'
CalMF	5'-CCA CAT ATG TTG AAT GGT GCA CAC TGC-3'
CalMR	5'-TTA AAG CTT CTA CCA CCA TTG GAC CGG AA-3'
CalPF	5'-CCG CAT ATG ATC AAC GAA GGC GAA AT-3'
CalPR	5'-GAG AAG CTT TTA CCA CAA TGC CAC AGG AA-3'
CalQF	5'-TGT CAT ATG GAG GAC GTT GTG TTT CC-3'
CalQR	5'-TAT AAG CTT TCA TCC CTG CTC CTC TGC CT-3'
T7 promoter	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'
T7 terminator	5'-CTA GTT ATT GCT CAG CGG TG-3'

第 1 章 Calyculin A 生合成遺伝子の探索

海綿 *D. calyx* の採集

海綿 *D. calyx* は、2011 年 5 月式根島においてスキューバダイビングにより採集した。採集後の試料は一部を RNA later に浸し-80 °C にて保存し、残りは-30 °C にて保存した。

D. calyx メタゲノム DNA の抽出

-30 °C にて保存しておいた凍結海綿 10 g を液体窒素下において乳鉢および乳棒を用いて破碎した。試料を 50 mL ファルコンチューブに移し、20 mL の lysis buffer (8 M urea, 2% SDS, 350 mM NaCl, 50 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5))¹³²⁾ を加え、60 °C にて 1 時間インキュベートした。室温、500g、5 分間遠心し、上清を回収した。得られた上清に等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、転倒混和した後、室温、800g、5 分間遠心し、水層と有機層に分けた。水層を回収し、再度等量のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール (25:24:1) を加え、転倒混和した後、室温、800g、5 分間遠心した。水層を回収し、等量のクロロホルム:イソアミルアルコール (24:1) を加え、転倒混和した後、室温、800g、5 分間遠心する操作を 2 回繰り返した。得られた DNA 溶液に 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム (pH5.2) および 2.5 倍量の 99.5% 冷エタノールを加え、析出してきた白い繊維状の沈殿をパスツールピペットで回収した。得られた DNA を 70% 冷エタノールで 2 回洗浄した後、風乾し、DNase-RNase free water で溶解した。得られた DNA 溶液に 100 µg/mL proteinase K (ナカライ) および 0.5% SDS を加え、50 °C で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、再度フェノール-クロロホルムにて DNA を抽出し、*D. calyx* メタゲノム DNA とした。

D. calyx 由来 PKS KS ドメインの縮重 PCR

50 µL スケールで PCR を行い、反応液の組成は 1.75 mM MgCl₂、1 µM プライマー、0.3 mM dNTP mixture、1.25 U KAPATaq Extra DNA polymerase (日本ジェネティクス)、10 µg *D. calyx* メタゲノム DNA とした。プライマーは既に過去報告されている PKS の KS ドメインの保存配列に特異的に設計された 6 種類の縮重プライマー KSDPQQF/KSHGTGR¹⁴¹⁾、KS1Up/KSD1¹⁴²⁾、degKS2F.i/degKS5R.i、degKS2F.gc/KSR5.gc¹³²⁾、KSLF/KSLR¹⁴³⁾ および DKF/DKR¹⁴⁴⁾を用いた。また、反応条件は 95 °C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 °C で 30 秒、アニーリング 54 °C で 30 秒、伸長 72 °C で 75 秒を 35 サイクル行った。更に、PCR 産物 1 µL を鋳型とし、上記の組成および反応条件で 2nd PCR を行った。

KS ドメイン遺伝子断片の TA クローニング

PCR 産物 50 μ L を 1%アガロースゲル電気泳動に付し、約 700 bp の目的の DNA 断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) を用いて精製した。精製後の DNA 断片を TA クローニングした。ライゲーション反応液の組成はインサート DNA 100 ng、pT7Blue vector (Novagen) 100 ng および等量の ligase を含む Ligation Kit Ver.2.1 Solution I (Takara) とし、16 °C で 45 分インキュベートした。得られたライゲーション産物を熱ショックにより大腸菌へ形質転換した。ライゲーション反応液 1 μ L をコンピテント化した大腸菌 Novablue 50 μ L と混合し、氷上で 40 分間インキュベートした。42 °C で 90 秒間熱ショックを加え、再度氷上で 3 分間急冷した後、直ちに LB 培地 500 μ L を加え、37 °C にて 1 時間振とう培養した。形質転換後の菌体を 100 μ g/mL アンピシリン含有 LB 寒天培地へプレーティングし、37 °C にて一晩静置培養した。翌日、寒天培地に形成された大腸菌の単一コロニーを採取し、コロニーPCR を行った。PCR は 10 μ L スケールで行い、反応液の組成は 1.75 mM MgCl₂、0.4 μ M プライマー、0.3 mM dNTP mixture、1.25 U KAPATaq Extra DNA polymerase (日本ジェネティクス) とした。プライマーは M13F および M13R を用いた。また、反応条件は 95 °C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 °C で 30 秒、アニーリング 55 °C で 30 秒、伸長 72 °C で 80 秒を 25 サイクル行った。PCR 産物 5 μ L を 1%アガロースゲル電気泳動に付し、約 800 bp の遺伝子断片が増幅されたクローンを陽性とした。

KS ドメイン遺伝子断片のシーケンス解析

TA クローニングにおいて陽性であったクローンについて、単一クローンを 100 μ g/mL アンピシリン含有 LB 培地 10 mL に植菌し、37 °C、200 rpm にて一晩振とう培養した。翌日、培養液を 4 °C、5,000g にて 10 分間遠心し、大腸菌を回収した。Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いて、プラスミド DNA を抽出および精製した。抽出したプラスミド DNA を鋳型としてサイクルシーケンスを行った。反応は 10 μ L スケールで行い、組成は BigDye Terminator ver. 3.1、sequence buffer (Life Technologies)、10 pmol プライマーおよびプラスミド DNA 200 ng とした。プライマーは M13F および M13R を用いた。また、反応条件は変性 98 °C で 10 秒、アニーリング 55 °C で 5 秒、伸長 68 °C で 4 分を 25 サイクル行った。サイクルシーケンス後の反応溶液をエタノール沈殿にて精製し、DNA を 10 μ L の Hi-Di formamide に再溶解した。98 °C で 5 分間熱変性した後、氷上にて 3 分間急冷し、キャピラリーシーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) に泳動した。泳動後、取得した核酸配列をアミノ酸配列へ変換し、NCBI Protein BLAST にて相同性検索を行った。

海綿 *D. calyx* メタゲノムライブラリーの構築

CopyControl™ Fosmid Library Production Kit (Epicentre) を用いて *D. calyx* メタゲノムライブラリーを構築した。第 2 節において抽出した *D. calyx* メタゲノム DNA 100 µg を 0.8% 低融点アガロースゲル agarose L (ニッポンジーン) を用いて 50 V で 20 時間電気泳動し、40 kb 部分の DNA を切り出した。70 °C にて 10 分間インキュベートし、アガロースゲルを完全に融解した。300 mg のアガロースゲルに対し 1 U の GELase enzyme preparation を加え、45 °C にて 2 時間インキュベートした後、70 °C で 10 分間インキュベートすることで GELase を不活化した。室温下 11,000g で 20 分間遠心した後、上清を回収し、2.5 倍量の 99.6% EtOH と 0.1 倍量の 3M 酢酸ナトリウム (pH7.0) を加え、室温下 11,000g で 30 分間遠心した。上清を除去し、冷 70% EtOH で 2 回洗浄した。沈殿した DNA を 50 µL の 10 mM Tris buffer (pH8.5) で再溶解した。得られた DNA に End-repairo enzyme mix を加え、室温にて 45 分間インキュベートした後、70 °C で 10 分間インキュベートすることにより反応を終結した。再度、エタノール沈殿を行い、精製した平滑末端化 DNA を pCC1FOS vector へライゲーションした。なお、ライゲーションにはインサート DNA 240 ng およびベクター DNA 500 ng を用いた。ライゲーション後の反応液 10 µL に MaxPlax™ Lambda Packaging Extracts 25 µL を加え、30 °C で 120 分間インキュベートした。この操作を 2 度行なった。パッケージング後のファージ 10 µL を大腸菌 EPI300™-T1^R 100 µL と混合し、37 °C にて 1 時間インキュベートした。ファージ感染後の EPI300™-T1^R を 12.5 µg/mL クロラムフェニコール含有 LB 寒天培地へ塗布し、37 °C にて一晩静置培養した。翌日、形成したコロニーをカウントし、ライブラリーサイズを算出した (Table 7)。同様の方法にて、ライブラリーファージを大腸菌 EPI300™-T1^R へ感染させ、2500 cfu/plate となるように 12.5 µg/mL クロラムフェニコール含有 LB 寒天培地へ塗布し、37 °C にて一晩培養した。培養後、形成したコロニーを 1 mL の LB 培地で回収し、終濃度 20% のグリセロールを加え、*D. calyx* メタゲノムライブラリーとして -80 °C で保存した。

Table 7 海綿 *D. calyx* メタゲノムライブラリーのタイター

Dilution	# of colony		Efficiency (cfu/mL)	Library size (cfu)
	white	blue		
1	Many	3	-	2.5 x 10 ⁵
10	246	0	2.5 x 10 ⁵	
100	25	0	2.5 x 10 ⁵	
1000	4	0	4 x 10 ⁵	

***D. calyx* メタゲノムライブラリーのスクリーニング**

構築した *D. calyx* メタゲノムライブラリーより DCKS4、5 および 8 を含む遺伝子を保持するクローンを PCR 法によりスクリーニングした。スクリーニングには、J. Piel らによって報告された 3D-gel 法を用いた¹⁴⁶⁾。3D-gel 法は、室温で半個体状態を維持できるアガロースを LB 培地に混和することで、大腸菌が三次元でコロニーを形成できる (Fig. 99a)。コロニー形成後の培養液を混和し、大腸菌を均一した後、その一部を鋳型 DNA として PCR を行うことで、大量の候補の中から目的の遺伝子を効率的に選別できる方法である。まず、-80 °C にて保存しておいたライブラリー大腸菌を用いて PCR により一次スクリーニングを行った。PCR は 10 µL スケールで行い、反応液の組成は 1.75 mM MgCl₂、0.4 µM プライマー、0.3 mM dNTP mixture、1.25 U KAPATaq Extra DNA polymerase (日本ジェネティクス) とした。プライマーは DCKS4F/ DCKS4R、DCKS5F/ DCKS5R および DCKS8F/ DCKS8R を使い、ライブラリー大腸菌 1 µL を鋳型 DNA とした。また、反応条件は 95 °C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 °C で 30 秒、アニーリング 60 °C で 30 秒、伸長 72 °C で 30 秒を 35 サイクル行った。PCR 産物 5 µL を 1% アガロースゲル電気泳動に付し、陽性クローンの有無を確認した。陽性であったライブラリーストックを LB 培地で希釈し、OD₆₀₀ を測定した。OD₆₀₀ = 1 を 1 x 10⁹ cfu/mL として、大腸菌の濃度を算出した。この値を目安に、12.5 µg/mL クロラムフェニコール含有 3D-gel LB に 1000 cfu/tube となるように 1 次スクリーニング陽性ライブラリーを 20 チューブに植菌し、37 °C で一晩培養した。なお、実際の cfu 数を確認するために、一部を 12.5 µg/mL クロラムフェニコール含有 LB 寒天培地に植菌し、一晩培養後のコロニー数をカウントした。3D-gel LB 中で形成した大腸菌コロニーをボルテックスにて均一に混和し、これを鋳型 DNA として 2 次スクリーニングを行った。PCR の反応液、反応条件は 1 次スクリーニングと同様とした。1 チューブ辺りに培養する大腸菌の cfu 数を約 1/10 ずつ減らしながらこの操作を繰り返し、10 cfu/tube 以下となった時点で、陽性大腸菌培養液を 12.5 µg/mL クロラムフェニコール含有 LB 寒天培地へ塗布し、形成した単一コロニーを PCR の鋳型 DNA とすることで最終スクリーニングとした (Fig. 99b)。得られた陽性クローンのフォスミド DNA を Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いて抽出した。単離したフォスミド DNA の挿入領域の両端の核酸配列の解析を行った。サイクルシーケンシスの反応液の組成は、第 1 章の **KS ドメイン遺伝子断片のシーケンシス解析**と同様とした。また、反応条件は変性 98 °C で 30 秒、アニーリング 55 °C で 10 秒、伸長 68 °C で 4 分を 30 サイクル行った。シーケンシス解析の結果、PKS または NRPS と相同性を示したクローンについては、さらにその領域のプライマーを設計し、再度 3D-gel 法によるライブラリースクリーニングを繰り返した。

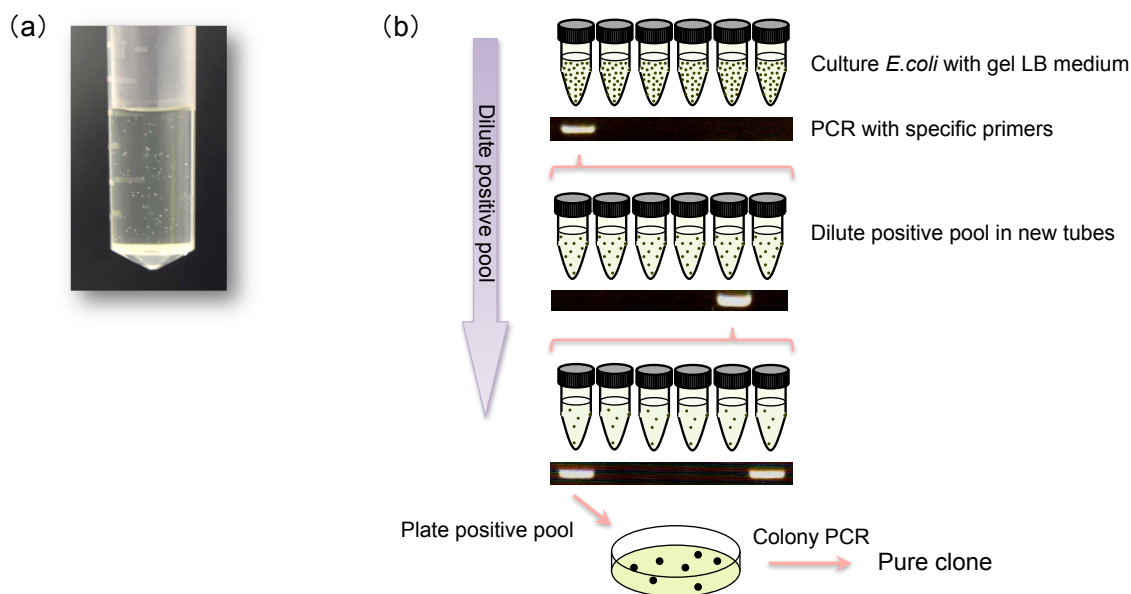


Fig. 99 3D-gel 法によるライブラリーのスクリーニング

(a) 3D-gel LB での大腸菌コロニー形成、(b) 3D-gel 法によるライブラリーのスクリーニング

HCS ドメイン遺伝子断片の増幅および解析

スクリーニングによって取得したフォスミド DNA pDCYE1-12 について、I 型 PKS の β -branch の生合成に関与する修飾酵素遺伝子の有無を検討するために、 β -branch の生合成を担う酵素群の一つである HMG-CoA synthase like domain (HCS) に特異的なプライマーを用いた縮重 PCR を行った。縮重プライマーを設計するために、過去に報告されている I 型 PKS の生合成遺伝子で“HCS”とアノテーションされているアミノ酸配列を NCBI データベースより収集後、アライメントした。アライメントの結果、アミノ酸配列が保存されている領域に対して特異的な縮重プライマー HCSF および HCSR を設計した (Fig. 48)。また、反応条件は 95 °C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 °C で 30 秒、アニーリング 54 °C で 30 秒、伸長 72 °C で 75 秒を 35 サイクル行った。増幅した PCR 産物について、**KS ドメインの解析**と同様の方法にて TA クローニングおよびシーケンス解析を行った。

A ドメイン遺伝子断片の増幅および解析

スクリーニングによって取得したフォスミド DNA pDCYE1-12 について、NRPS をコードする遺伝子の有無を検討するために、A ドメインに特異的な縮重プライマーを用いた PCR を行った。50 μ L スケールで PCR を行い、反応液の組成は 1.75 mM MgCl₂、1 μ M プライマー、0.3 mM dNTP mixture、1.25 U KAPATaq Extra DNA polymerase、フォスミド DNA pDCYE1-12 10 μ g とした。プライマーは既に過去報告されている A ドメインの保存配列に特異的に設計された縮重プライマー A3F/A7R¹⁴⁸⁾ を用いた。PCR 反応液の組成および反応条件は、本章 **HCS ドメイン遺伝子断片の増幅および解析**と同様とした。PCR により増幅した遺伝子断片について、**KS ドメインの解析**と同様の方法にて TA クローニングおよびシーケンス解析を行った。

pDCYE1-12 のシーケンス解析

徳島文理大学薬学部浅川義範教授、伊藤卓也講師および兼目裕充講師との共同研究にて、スクリーニングによって取得したフォスミド pDCYE1-12 の DNA 配列を次世代シーケンサーGenome Analyzer II (Illumina) にて解析した。方法はマニュアルに従った。各フォスミド DNA 5mg を用いてシーケンス解析用ライブラリーを作製し、シーケンス解析した。その結果、pDCYE1-12 のインサート DNA に由来する 100 bp の塩基配列を 27,220,593 リード得た。取得した核酸配列を CLC genomic workbench software (CLC Bio) を用いて *de novo* アッセンブリーし、500 bp 以上の塩基配列のコンティグを 1,775 断片得た。さらに、Geneious assembler (Biomatters) により *de novo* アッセンブリーを行った結果、217 kb のコンティグを取得した。多数のギャップや不確定な塩基が認められたため、Ion PGM™ (Life Technologies) によりシーケンスの再解析を行った。フォスミド DNA pDCYE1-12 を抽出後、Plasmid safe ATP dependent DNase (Epicentre) で一晚処理し、DNA 抽出過程で残存した大腸菌由来のゲノム DNA を除去した。エタノール沈殿にて、分解した核酸を除き、Ion Xpress Library Kit (Life Technologies) を用いて、シーケンス解析用ライブラリーを作製した。Ion PGM 200 Sequencing Kit (Life Technologies) および Ion 314 Chip を用いて、シーケンスを解析した。方法は、マニュアルに従った。解析の結果、200 bp の塩基配列を 453,503 リード取得し、Geneious assembler を用いて先に得られた 217 kb の核酸配列に対して reference アッセンブリーを行った結果、217 kb の遺伝子配列中に 26 カ所の不確定塩基が残った。これらの不確定塩基をキャピラリーシーケンサーにて決定し、最終的に 217,478 bp の核酸配列を取得した。FramePlot 2.3.2²⁰⁰ および Glimmer 3.02 により protein-coding sequences (CDSs) を決定し、さらに、NCBI Protein BLAST および PKS/NRPS analysis²⁰¹ により既知タンパク質との相同性を解析した。

逆転写 PCR による *cal* 遺伝子のトランスクリプトーム解析

採取後直ちに RNA later に浸し、-80 °C にて保存しておいた *D. calyx* 3 g (湿重量) を液体窒素下で、乳鉢および乳棒を用いて粉状になるまですり潰した。破碎後の試料から RNeasy mini kit および QIAshredder (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。方法は、添付のマニュアルに従った。さらに、Transcriptor high fidelity cDNA synthesis kit (Roche) を用いて、得られた total RNA 3 µg を鋳型とし、逆転写反応を行った。プライマーは random hexamer を用い、その他の方法および反応条件は添付のマニュアルに従った。逆転写反応後の cDNA を用いて PCR を行った。PCR は 20 µL スケールで行い、反応液の組成は 1.75 mM MgCl₂、0.4 µM プライマー、0.3 mM dNTP mixture、1.25 U KAPATaq Extra DNA polymerase とした。プライマーは、DCKS4F/DCKS4R および CalTEF/CalTER を用いた。また、反応条件は 95 °C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 °C で 30 秒、アニーリング 60 °C で 30 秒、伸長 72 °C で 30 秒を 25 サイクル行った。なお、ネガティブコントロールとして、逆転写反応に供していない total RNA を鋳型 DNA として用いた。得られた PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動にて確認した。増幅後の遺伝子断片を TA クローニングにより pT7Blue vector へ導入し、そのシーケンスを確認した。

第 2 章 Calyculin 生産菌の特定

D. calyx メタゲノム DNA の 16S rRNA 解析

海綿 *D. calyx* メタゲノム DNA に含まれる 16S rRNA 解析を行った。PCR は 50 μ L スケールで行い、反応液の組成は 1.75 mM $MgCl_2$ 、0.4 μ M プライマー、0.3 mM dNTP mixture、1.25 U KAPATaq Extra DNA polymerase とした。プライマーは 16S rRNA ユニバーサルプライマー-27f および 1492r¹⁶⁶⁾ を、また、第 1 章において抽出した *D. calyx* メタゲノム DNA を鋳型 DNA として用いた。反応条件は 95 °C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 °C で 30 秒、アニーリング 54 °C で 30 秒、伸長 72 °C で 90 秒を 30 サイクル行った。PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動に付した後、約 1,500 bp の遺伝子断片を切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) を用いて精製した。精製後の DNA 断片を KS ドメイン遺伝子断片と同様の方法で TA クローニングした。TA クローニングにおいて陽性であったクローンについて、無作為に 30 クローンを選択し、KS ドメイン遺伝子断片と同様の方法でプラスミド DNA 抽出後、シーケンス解析した。取得した DNA 配列を NCBI Nucleotide BLAST で相同性解析し、さらに、MEGA 5.10²⁰²⁾ を用いて Neighbor-joining 法²⁰³⁾ により系統樹解析した。

光学顕微鏡下における共生微生物の観察

採集した海綿 *D. calyx* をナイフで細かく砕き、 Ca^{2+} and Mg^{2+} free-artificial sea water (CMF-ASW) に懸濁し、室温にて 15 分間静置した。その間、5 分毎に転倒混和した。上清を光学顕微鏡にて観察した。

CARD-FISH による calyculin 生産菌の検出

前項において調製した共生微生物を含む *D. calyx* 懸濁液に終濃度 4%の paraformaldehyde を加え、細胞を固定した。98 °C の湯上で顕微鏡観察用スライドガラスに細胞懸濁液を熱固定し、50%、70% および 96% EtOH に 3 分間ずつ浸し、脱水した。さらに、60 °C にて一晩ハードニングした。翌日、5 μ g/mL proteinase K で 37 °C、30 分間処理し、CARD-FISH 用試料とした。BioNick™ DNA Labeling System (Life Technologies) を用いて、biotin 化 DNA プローブを作製した。方法は添付のマニュアルに従い、プローブ作製には PKS-NRPS の領域をコードしているフォスミド pDCYE3-10 を用いた。バクテリアを固定したスライドガラスを 46 °C にて 1 時間、ハイブリダイゼーション用緩衝液 (0.9 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.01% SDS, 30% formamide) 中インキュベーションした。プレハイブリダイゼーション後、終濃度 2 ng/ μ L のビオチン化プローブを加え、46 °C にて 4 時間インキュベーションした。その後、48 °C にて 10 分間洗浄用緩衝液 (0.7 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 50 mM EDTA, 0.01% SDS) 中でインキュベーションする操作を 3 回繰り返した。さらに、TSA™ Plus Fluorescein System (PerkinElmer) を用いてハイブリダイズしたプローブを可視化した。方法は添付のマニュアルに従った。細胞を室温下、TNB buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.5% blocking reagent) で 30 分間インキュベーションすることでブロッキングし、100 倍希釈した

streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP) を加え、さらに 1 時間インキュベートした。その後、TNT buffer (0.15 M NaCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.05% Tween 20) 中で 5 分間インキュベートする洗浄操作を 3 回繰り返し、fluorophore tyramide working solution を加え 10 分間インキュベートした。再度、TNT buffer による 3 回の洗浄の後、蛍光顕微鏡 (Lieca) にて測定した。なお、ネガティブコントロールとして、プローブを加えず同様の操作を行った。

レーザーマイクロダイセクションを用いたシングルセル解析

顕微鏡下における共生微生物の観察において調製した *D. calyx* 細胞懸濁液をレーザーマイクロダイセクション専用 Membrane slides (PEN-Membrane 2.0 μ m, Leica) に塗布し、風乾した後、50%、70%および 96% ethanol に 3 分間ずつ浸し、脱水した。再度風乾し、ダイセクション用試料とした。バクテリアの単菌には LMD7000 (Leica) を用いた。顕微鏡下で試料を観察後、目的のバクテリアをレーザーで切り取り、直接 PCR チューブへ回収した。この方法で、バクテリア **F** を 1 および 4 フィラメント、また、バクテリア **S** を 4 および 8 フィラメント分離した。単菌した PCR チューブに LMD 用 lysis buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 mM EDTA, 0.1% Tween 20) 5 μ L を加え、ボルテックスにより混和した。-80 $^{\circ}$ C で 10 分間および 50 $^{\circ}$ C で 5 分間の凍結融解を 3 回繰り返し、98 $^{\circ}$ C で 10 分間インキュベートすることで細胞を融解した。調製した細胞融解液に 2x PCR premix を 5 μ L 加え、終濃度 1.75 mM $MgCl_2$ 、0.4 μ M プライマー-DCKS8F/DCKS8R、0.3 mM dNTPs、0.25 U KAPATaq Extra DNA polymerase とした。PCR の反応条件、は 95 $^{\circ}$ C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 $^{\circ}$ C で 30 秒、アニーリング 60 $^{\circ}$ C で 30 秒、伸長 72 $^{\circ}$ C で 30 秒を 40 サイクル行った。得られた PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動に付し、目的の遺伝子断片の増幅の有無を確認した。

Calyculin 生産菌の 16S rRNA 解析

レーザーマイクロダイセクションを用いたシングルセル解析と同様の方法にて、calyculin 合成遺伝子陽性バクテリア **F** をレーザーマイクロダイセクションにて単菌し、細胞融解後、16S rRNA ユニバーサルプライマー 27f および 1492r を用いて、PCR を行った。しかしながら、目的の約 1500 bp の遺伝子断片の増幅は確認されなかった。目的の PCR 産物の大きさに対して、鋳型 DNA の濃度が不十分である可能性が考えられたため、レーザーマイクロダイセクションによりバクテリア **F** を 300-1000 フィラメント単菌し、同様に PCR を行ったが、結果は改善されなかった。また、鋳型 DNA の純度を高めるため、単菌したバクテリア **F** から DNA を抽出して PCR に用いたが、依然として目的の PCR 産物を得ることができなかった。そこで、パラオ産海綿 *T. swinhoei* に特徴的な共生微生物として過去に報告されている '*Candidatus Entotheonella palauensis*' に形状が類似していることに注目した。海綿 *D. calyx* metagenome DNA の 16S rRNA 解析において、*D. calyx* にも '*Candidatus Entotheonella*' sp. の共生が示唆されたことから、この 16S rRNA に特異的なプライマーを設計し、PCR をおこなった。なお、プライマーは、海綿 *D. calyx* metagenome DNA の 16S rRNA 解析で得られた *D. calyx* 由来 16S rRNA をアライメントした後に、'*Candidatus Entotheonella*' sp. に特異的な配列を見だし、PCR 産物の大きさが約 200 bp となるように設計した。レーザーマイ

クロダイセクションによりバクテリア **F** を 10 フィラメントおよび 100 フィラメント、また、ネガティブコントロールとしてバクテリア **F** を含まない *D. calyx* 細胞懸濁液塗布領域を 50 画分回収し、Genomic DNA Buffer Set および QIAGEN® Genomic-tip 20/G (QIAGEN) を用いて DNA を抽出した。抽出後の精製 DNA を鋳型とし、*D. calyx* 由来 '*Candidatus Entothoonella*' sp. (DCEnto2F/DCEnto2R) および DCKS8 (DCKS8F/DCKS8R) に特異的なプライマーを用いて PCR を行った。反応条件はレーザーマイクロダイセクションを用いたシングルセル解析と同様とした。PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動に付し、目的の遺伝子断片の増幅の有無を確認した。

第 3 章 Calyculin 推定生合成修飾酵素の機能解析

CalM、CalP および CalQ の異種発現用プラスミド DNA の構築

リン酸基転移酵素と高い相同性を示す 3 つの ORF、*calM*、*calP* および *calQ* の異種発現用プラスミドを構築するため、それぞれの DNA 配列に特異的なプライマーを設計した。なお、Forward プライマー、Reverse プライマーにはそれぞれ *NdeI* と *HindIII* の制限酵素サイトを組み込んだ。PCR は 50 μ L スケールで行い、反応液の組成は 1.75 mM $MgCl_2$ 、0.4 μ M プライマー (CalMF/CalMR、CalPF/CalPR、CalQF/CalQR)、0.3 mM dNTPs、1.25 U PrimeSTAR HS DNA polymerase (Takara)、pDCYE1 10 μ g とした。また、反応条件は 95 °C で 5 分間の初変性を行った後、変性 95 °C で 30 秒、アニーリング 60 °C で 30 秒、伸長 72 °C で 90 秒を 25 サイクル行った。PCR 産物を 1%アガロースゲル電気泳動後、目的の断片を切り出し Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (プロメガ) を用いて精製した。精製後の DNA 断片およびプラスミド pColdII (Takara)、pET22b (+) (Novagen) を 37 °C で 3 時間、*NdeI* および *HindIII* で制限酵素処理した。制限酵素処理後の DNA を Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (プロメガ) で精製し、ライゲーションした。ライゲーション反応液の組成はインサート DNA 50 ng、ベクター DNA 50 ng および等量の ligase を含む Ligation Kit Ver.2.1 Solution I (Takara) とし、16 °C で 3 時間インキュベートした。反応後のライゲーション産物を熱ショックにより大腸菌 BL21 pLys (DE3) および BLR へ形質転換後、100 μ g/mL アンピシリン含有 LB 寒天培地へプレーティングし、37 °C にて一晚静置培養した。翌日、寒天培地上に形成された大腸菌の単一コロニーを採取し、コロニーPCR でインサート DNA が挿入されていることを確認した。コロニーPCR において陽性であったクローンについて、プラスミド DNA を抽出し、キャピラリーシーケンサーABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でインサート DNA の配列を確認した。

CalM、CalP および CalQ の異種発現の条件検討

CalM/CalP/CalQ 発現用プラスミドを形質転換した BL21 pLys (DE3) および BLR を 100 µg/mL アンピシリンおよび 20 µg/mL クロラムフェニコール含有 LB 培地 10 mL に植菌し、37 °C、180 rpm で一晩振とう培養した。翌日、同様の抗生物質を含む LB 培地 20 mL に前培養液 200 µL (1/100 量) を加え、OD₆₀₀ 値が 0.6 に達するまで約 3 時間、37 °C、180 rpm で振とう培養した。培養液を氷上で 30 分間冷やし、終濃度 0.1-0.5-1.0 mM の IPTG を添加し、15 °C、20 °C、30 °C で 5 時間または 16 時間、振とう培養した。培養液を 4 °C、10,000g、10 分間遠心し、得られた沈殿を buffer A (50 mM Tris-HCl (pH8.0)、300 mM NaCl、10% glycerol) 1 mL で再懸濁後、氷上で超音波にて菌体を破碎した。4 °C、10,000g、20 分間遠心し、上清を可溶性タンパク質画分、沈殿を不溶性タンパク質画分として回収した。各サンプルを 10% アクリルアミド SDS-PAGE に供した結果、各条件下において発現した CalM、CalP および CalQ は全て不溶性タンパク質であった。そこで、分子シャペロンタンパク質 GroEL-GroES との共発現を試した。pGro7 (Takara) を導入した BL21 (DE3) に pColdII-*calM/calP/calQ* をそれぞれ形質転換し、上と同様の方法で発現条件を検討した。その結果、0.5 mM IPTG 添加後、15 °C にて 16 時間培養することでそれぞれ目的のタンパク質を可溶性画分に得ることを確認した。

CalM、CalP および CalQ の異種発現と精製

pColdII-*calM/calP/calQ* および pGro7 を導入した BL21 (DE3) を 100 µg/mL アンピシリンおよび 20 µg/mL クロラムフェニコール含有 LB 培地 10 mL に植菌し、37 °C、180 rpm で一晩振とう培養した。翌日、同様の抗生物質および 500 µg/mL L-アラビノースを含む LB 培地 1 L に前培養液 10 mL (1/100 量) を加え、OD₆₀₀ 値が 0.6 に達するまで、37 °C、180 rpm で振とう培養した。培養液を氷上で 30 分間冷やし、0.5 mM IPTG を添加後、15 °C にて 16 時間振とう培養した。培養液を 4 °C、10,000g で 10 分間遠心し、得られた沈殿を 5 mM イミダゾールを含む buffer A 10 mL で再懸濁後、超音波にて菌体を破碎した。4 °C、10,000g で 20 分間遠心し、上清を COSMOGEL His-Accept (Nacalai Tesque) 2 mL にアプライした。10 mM イミダゾールを含む buffer A 40 mL で洗浄したのち、300 mM イミダゾールを含む buffer A 10 mL で Nhis-CalM、Nhis-CalP および Nhis-CalQ を溶出した。溶出したタンパク質画分を Amicon Ultra 10K (Merck Millipore) で限外ろ過し、溶液を buffer A で置換および濃縮した。濃縮後の Nhis-CalM、Nhis-CalP および Nhis-CalQ を精製タンパク質として *in vitro* における酵素反応に用いた。

in vitro における酵素反応

精製後の Nhis-CalM、Nhis-CalP および Nhis-CalQ を用いて、*in vitro* 酵素反応を行った。基質として、calyculinamide A、dephosphonocalyculin A および calyculin A を用いた。酵素反応は 50 µL スケールで行い、組成は 100 mM 各種緩衝液、10 mM 2 価の金属塩、1 mM ATP または GTP、各基質 10 µg および精製酵素 Nhis-CalM/Nhis-CalP/Nhis-CalQ とした。なお、緩衝液として Citrate-NaOH (pH5.0、5.5)、MES (pH6.0、6.5)、HEPES (pH7.0)、Tris-HCl (pH7.5、8.0、8.5、9.0) を

用いた。また、2 価の金属塩として MgCl_2 、 CaCl_2 、 MnCl_2 、 FeCl_2 、 CoCl_2 、 NiCl_2 、 CuCl_2 、 ZnCl_2 を用いた。20 °C で 1 時間インキュベートした後、ODS-HPLC で分析した。カラムは Cosmosil MS-II C18; 4.6 x 250 nm (Nacalai Tesque) を用い、流速 0.8 mL/min、0.05% TFA を含むアセトニトリル水溶液 30-100-100% (0-20-30 min) のグラジエント、検出波長 340 nm で分析した。

海綿 *D. calyx* 抽出物の再精査

海綿 *D. calyx* について、採集後、保存状態の異なる 3 種類の試料を用いて、それぞれの抽出物を分析した。採集後、-30 °C において保存しておいた海綿 *D. calyx* 10 g (湿重量) を MeOH 50 mL に浸し、室温にて抽出した。また、採集後の新鮮な海綿 *D. calyx* 10 g (湿重量) を 99.5% EtOH、50 mM Tris-HCl (pH8.0)、CMF-ASW および DMSO それぞれ 50 mL に浸し、室温で抽出した。さらに、採集後、液体窒素下で瞬時に凍結し、そのまま凍結乾燥した後、-30 °C において保存しておいた海綿 *D. calyx* 3 g (乾燥重量) を MeOH 50 mL に浸し、室温にて抽出した。各溶媒または緩衝液に浸して 3 時間後、それぞれの上清を ODS-HPLC にて分析した。分析条件は、前項の *in vitro* における酵素反応と同様とした。

Phosphocalyculin 類の単離

2013 年 5 月静岡県南伊豆中木にて採集した *D. calyx* を液体窒素下にて瞬間凍結し、そのまま凍結乾燥した。乾燥した海綿 80 g (乾燥重量) を MeOH 500 mL で抽出した。ひだ折りろ紙を用いてろ過し、ろ液の MeOH をエバポレーターでとばした。得られた残渣を約 5 mL の MeOH に再溶解し、ゲルろ過 Sephadex LH-20 ($\phi 2.5 \times 79$ cm) に供した。流速 0.66 mL/min で 5 mL ずつ分画し、Fr. 150 ($K_d=3.3$) まで溶出した。Phosphocalyculin A および C を含む Fr.30-40 ($K_d=0-0.3$) を、ODS-HPLC (Cosmosil MS-II C18; 10 x 250 mm (Nacalai Tesque)、流速 3.0 mL/min、0.05% TFA を含む 80% MeOH) で 2 種類の化合物を分取した。得られた化合物を再度、HPLC (Cosmosil Hilic; 10 x 250 mm (Nacalai Tesque)、流速 3.0 mL/min、50 mM 酢酸アンモニウムを含む 50% MeCN) で精製し、最終的に無色粉末の phosphocalyculin A (17.4 mg) と phosphocalyculin C (6.8 mg) を得た。精製後の phosphocalyculin A および C を用いて旋光度および HRMS を測定した。Phosphocalyculin A: $[\alpha]_D^{25} = -65$ ($c = 0.05$ in CH_3OH), HRESIMS (m/z), $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd. for $\text{C}_{50}\text{H}_{83}\text{N}_4\text{O}_{18}\text{P}_2$, 1,089.5178; found 1,089.5174, phosphocalyculin C: $[\alpha]_D^{23} = -49$ ($c 0.25$ in CH_3OH), HRFABMS (m/z), $[\text{M}+\text{Na}]^+$ calcd for $\text{C}_{51}\text{H}_{85}\text{N}_4\text{O}_{18}\text{P}_2$, 1125.5154; found, 1125.5145

第 4 章 海綿 *Discodermia calyx* における phosphocalyculin A の意義の解明

細胞毒性試験

Phosphocalyculin A のマウス白血病細胞 P388 およびヒト子宮頸癌細胞 HeLa に対する細胞毒性を MTT アッセイにより評価した。細胞は 10 µg/mL ペニシリンおよびストレプトマイシン、10% ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地を用い、5% CO₂ 存在下 37 °C で培養した。100 µL の 5 x 10⁵ cells/mL の P388 細胞および 1 x 10⁵ cells/mL の HeLa 細胞を滅菌済みの 96 穴マイクロプレートに撚き、培地で段階希釈した phosphocalyculin A および calyculin A 100 µL を加え、同一条件下で 24 時間培養した。1 mg/mL の 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) 50 µL を加え、さらに 4 時間インキュベートした。室温下、4000g で 20 分間遠心し、上清を除去した。残った沈殿を DMSO 100 µL で溶解し、プレートリーダーを用いて 570 nm の吸光度を測定した。式(1)により、生存率を算出し、生存率 50%のときの化合物の濃度を IC₅₀ として算出した。なお、同様のアッセイを 3 回行い (n=3)、IC₅₀ 値はその平均値より算出した。

$$\text{生存率(\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{S570}}}{\text{Abs}_{\text{N570}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots(1)$$

Abs_{S570}；サンプルを与えた細胞の Abs₅₇₀、Abs_{N570}；サンプルを与えていない細胞の Abs₅₇₀

抗菌活性試験

Phosphocalyculin A のペーパーディスク法による抗菌活性試験を行った。*E. coli*、*B. cereus*、*S. cerevisiae*、*C. albicans* を各液体培地 10 mL に植菌し、一晚 180 rpm で振とう培養した。翌日、前培養液 1 mL を各寒天培地 100 mL に混合してシャーレに撚き、抗菌試験用プレートとして用いた。Phosphocalyculin A または calyculin A MeOH 溶液を所定量 (500、50、5、0.5、0.05 µg) 6 mm のペーパーディスクにのせ、乾燥させた。乾燥後のペーパーディスクを抗菌試験用プレートにのせ、各培養温度にて一晚静置培養し、翌日、抗菌活性の有無を判定した。なお、用いた液体培地と培養温度は Table 8 に示す。

Table 8 各微生物培養に用いた培地と培養温度

	Medium	Temperature (°C)
<i>E. coli</i>	LB	37
<i>B. cereus</i>	LB	37
<i>S. cerevisiae</i>	YPD	30
<i>C. albicans</i>	Sabouraud	37

脱リン酸化酵素阻害活性試験

Phosphocalyculin A のタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A に対する阻害活性を評価した。40 mM Tris-HCl (pH8.0)、20 mM KCl、30 mM MgCl₂、2 mM DTT、*p*-nitrophenylphosphate (pNPP) および PP2A を含む酵素反応溶液に段階希釈した phosphocalyculin A または calyculin A を加えた。20 °C で 20 分間インキュベートした後、400 nm の吸光度を測定した。式 (2) により、酵素阻害率を算出し、阻害率が 50% のときの化合物の濃度を IC₅₀ として算出した。

$$\text{酵素阻害率 (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{S400}}}{\text{Abs}_{\text{N400}}} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

Abs_{S400}；サンプルを添加した酵素反応液の Abs₄₀₀、Abs_{N400}；サンプルを添加していない酵素反応液の Abs₄₀₀

凍結乾燥海綿 *D. calyx* 抽出物の分析

2013 年 12 月静岡県伊豆半島中木にて採集した *D. calyx* を液体窒素中で凍結し、さらに凍結乾燥した試料約 0.5 g (乾燥重量) を H₂O、50% MeOH、100% MeOH に浸した。3 時間後その上清を ODS-HPLC にて分析した。分析条件は、第 3 章の *in vitro* における酵素反応と同様とした。50% MeOH 抽出物については 14 日後まで継続して HPLC 分析した。

海綿粗酵素液による phosphocalyculin 類の脱リン酸化

湿重量 10 g の海綿 *D. calyx*、*D. kiiensis* および *T. swinhoei* をそれぞれ乳鉢および乳棒を用いて細かく砕き、50 mM Tris-HCl (pH8.0) 10 mL で懸濁した。氷上で 10 分毎に転倒混和しながら、1 時間インキュベートし、4 °C、20,000*g* で 1 時間遠心した。遠心後の上清を回収し、海綿粗酵素液とした。Phosphocalyculin 類を主に含む凍結乾燥 *D. calyx* の MeOH 抽出物を、phosphocalyculin 類約 10 µg/tube となるようにサンプルチューブに分注し、遠心エバポレーターによって MeOH を除去したものを酵素反応の基質として用いた。基質を含むサンプルチューブに海綿粗酵素液 50 µL を加え、20 °C にて 3 時間インキュベート後、ODS-HPLC で分析した。なお、*D. calyx* 粗酵素液を 90 °C にて 20 分間加熱したものを熱変性後 *D. calyx* 粗酵素液とし、同様の酵素反応を行った。

Activated chemical defense の再現

2013 年 12 月静岡県伊豆半島中木にて採集した約 1 cm³ の *D. calyx* をナイフで 2 分間切り刻んだ。その後、15、60、120、180、240、300 秒後に液体窒素中で瞬間的に凍結させ、そのまま凍結乾燥した¹⁹⁶⁾。なお、物理的な刺激を与えていない *D. calyx* をコントロールとして用いた。乾燥後の試料を MeOH 1 mL に浸し、その上清を ODS-HPLC にて分析した。HPLC 分析後、式 (3)、(4) によって各試料に含まれる calyculin および phosphocalyculin の割合を算出した。なお、同様の実験を 3 回行い (n=3)、その平均値を結果として用いた。

$$\text{Calyculin 類の含量(\%)} = \frac{\text{PA}_{\text{Caly}}}{\text{PA}_{\text{Caly}} + \text{PA}_{\text{Pcaly}}} \times 100 \quad \cdots \cdots (3)$$

$$\text{Phosphocalyculin 類の含量(\%)} = \frac{\text{PA}_{\text{Pcaly}}}{\text{PA}_{\text{Caly}} + \text{PA}_{\text{Pcaly}}} \times 100 \quad \cdots \cdots (4)$$

PA_{Caly}: calyculin 類のピーク面積、PA_{Pcaly}: phosphocalyculin 類のピーク面積

Supplementary data

Sequence data

■; A、■; ACP or PCP、■; C or HC、■; DH、■; ER、■; KR、■; KS、■; MT、■; Ox

CalA (A-MT-PCP-MT-KS⁰-ACP-KS-KR-ACP)

MMGRGSSFYVQSENGPPDNWNTDVGYPNIKCIHQLVETQARKTPDAIALVYGKQQLTYEELNRRSSCLARYLQIQIOP
DQPVGLCVERSLEMVVGILGILRAGGAYLPLEPOYPGERLQYMLQDSRVEWVLTQSRFTASLSPLDDSVHLLSLDREWES
ITEGAQRQPALKRQVRLHHLAYILYTSGSTGRPKGVMLEHRALCNRIIWMEDGYGLSPEDRVLQKTPFSFDVSGWEFFWPL
ITGARLVLAAPKHKDPYYLRDTICRSGITVLHFVPSMFHSFLGIAEVERCNSIRKVFCSGEALTVQHTTRFFETFGDREL
HNLGYPTEAAIDVSYACRKEASVVPICKPIANIRLYILDSRMNPSPIGSEGELCIAGIGLARGYLNRPDLTADRFFPDPF
ASTPGAHLRYTGDLARWLPDGNIEYLGRIDNQIKLRGNRIEPGEIEVAFREHEAVSECAVVVQODERGERRLVAFSPDAR
HARAILKHEMEMEAQGLLADRKRHTLPNGMEIIHLNPGETDFLYQEIEFEDNGYLKHGLAVLPGDCVFDVGANIGLFSLCMAR
EQVQVHAFEPMEVYEVMLNTRMYSDTIRTYPGCLSDAPGQETFTYYPNVITILSGAHADLEEIGVVRSYLSGENDGHEH
QVNDAEVDELLRARLETREVRCLRTISEIIAEQGIKTIDLLKIDVEKMEHKVIEGIAAKDWPKIRQMVIEVHDENRAQQ
MQALLAAKGFTVVVEQDDALRNTPISLYARRTSVRTDQPHVNTDRQWYNRAGLVRDIELHLASRLPEYMQPSAIIPLVEI
PLTTSGKLDRGQLTTREIERTRTKQISLPQSEVEEQMLEIWEDLLGIMDISLEDGFLEAGGNSLLAISLIERINKTFGCSL
TTTTLTKYPSIKELSAHIAATTTPTVAVAAAPTVLPAVATATPETPVSQAFSDIEAALAEHPSVAQSVVFARENKGQQTIV
AYVRPNWTYFRQKKADQDAELLKNWIPWEQNYEPIIDGEESEETLNSIGYVTSDSGDQIPEAEVRECVDLAVGQVMDH
RPTKMLEIGCGSGMLLFQLAGRVEHYATDLSENAIEHIHASLVSKPYRDRVTCFRCDASDLKDVPLEEVDTVMIHNSVIQY
FPGIDYLTNLIRTLAERLPARARIFIGDVRDLRLKAFHAAVLAHQCPPETSRRERFAQMLSDRVRLEKELVIDPLYFKNLT
RTLPRIKQVRIAPKKQYHNEFIKYRFDTLLYLDEPCKEGALPQITPWEQSPGDMLDWVTANPQSRLTGVPNRRVWREQ
AILDWMNRPEGELSLGAALARIDATPDHDKGVDPFTVLSTCNTEAVAATIHWEHPHEDGRFEIYLQPAKSGVGELPHRLAY
KQDEPMELDGANFPGFVSVWQDNPLPKRHLDERLAKGRIPARFIFQTSPLTTADGQVDRAAVTGEQPAPPTVPTAIGTE
PMLAAPVAHRAAKTVLPAYYADSFATIGISCHVPGAQDHHYFQWNLNGHESVALLSAEELAAAGIAEELRQNPYVPAR
LTIEDKDCFDPAFFNISPRNAAYMDPOARLLLLHSWKAMEDAGLAVGDTPETGVFMSATTNFYQLPLGLPVHALQGADGHA
AGIQAOGGMIPNTISYHLGLKGPSMFVQSLCSSSLVGLKLACQSLQAGEAKMALIGGANLFAFSRVGHLYEPEMNLSDDGH
CRTFDAAATGVVEGEGVCVIVLKKALDAVADRDIYALLRGISLNNDGADKAGFHAPGVKGQAAAAARAVLTATGVDPTTIR
YVEAHGTGTPSGDAIEVAALSEAYPNGTHRCAIGSLKPNLGNLDTAGGLAGVIKVALGLYHGAIPPQINFNEPAPDIDFTD
SPFYVPTQAEFPQDDKAPRRAAQNHYSLGGTNVHAIYEAVAPASPSAAAAGPFIVPLSARDNRLHEMVQNLI AFLQGEPA
TDLSELAYTLQVGRVAMKQVAFVLRDNEALSALMHDFLAGRENSACLRTAERREQRLFENDEDAKELMQGWLKGRLEK
LAELWVKGRVDWRCLHATPYPRRISMPTYPFARERYWIPETAPDAPAPMALRTTPQPVAVPVAELASRTHGSLLSDQVAV
VLKGIISDLLMVGIDDLDPISPFNEFCFDSVSLISFANRLNQEYDLDLKPMVLFENPTIQSFTTYLVETYGDILAAQLQAP
APGSKDMSRADSQPPQGLVPPSPSPVMASPTAVRAVAMPQPSSESARHDAPIAIIIGMSGSFPAAPDLDTFWENLRDGRDC
ISEIPPDRWDWRAIEGDPSEDGNKTKVRWGGFIDGVAEFDPLFFGISPREAESMDPONRLLMTHVWLAMEDAGHSAQSLSG
SDTGIFVGTGDTGYASLMGRAAGTENYAFGLGIFPFGGPNRMSFFLNHGPSEPINTGCSSSLVAIHKAHTAIRDGSCTMAF
AGGVNTVPTPDGHISFSRAGMLCEDGRCKAFAANANGFVRGEGVGILVLKPLADAEQGDHIIYAVIRGSAQNHGGRSNSFT
APNPKAQAALLTEAYTRTGVDPAHVGYIETHGTGTHLGDPIEIEGLKTAFRQLNGSQTENKGHCGLGAVKSNIGHSEMAAG
IAGLIKVVVLQKNKTLAKNLHCQEIINPYIQIEDSPFYIVQETRDWSPIRDAQGRALPRLAGVSSFGIGGVNAHVIVEEYIP
PVAAATPASPEPALIVLSAKNGERLREMAANLHRFVAHQAVQSDVEPAQLLANLAYTLQVGREPLEERLAFTVTSLDMLRD
KLA AFLNKGSGNTTDTTFFHGRIKQFREALTIFMSDDDMQTAVDAAWAKKYYAQLLQLWVRGMHFDWNRLYTTEWPRRMSL

PTYPFARERYWVETEPAAQPASTFFPASPSSARPETQARRLLTPGLAEDASSGESSGQSRQYIENRWTPVPLAGDIDWQARL
KQOEGTAITVIYSEEKRKDELFFALLRNLEGAANLARPLMLDAVHVQDLARALGRADVVLFLGPGPELPPQPPSTVATHVDA
LVEHLREPAWDRPVHIYCLYEGDATRPRPDCEALAGVMNAIAKNPRHAWTLIGHCDPESDITGYQRLLEGEWLAEPANAP
AKPTRTREIRYEASQRLVRQTATVAKTENVLAKVWEQKNLPTGDARPLAGKILVIVNPESIHGQTLFAATNEVVLADGDL
SDRITYHFDPNDVNSGRSAAQRIILSEVGELTLILDLSLYTTTPRERAESSLGKVSFYQILVGAFSPYQLVYVTLGLQHFR
ERMSLAGAKFAGLVKMSAEYRHLARSARCIDIDRALCNDPRAFEAVILGECHMPLEETEICYRHGDRFVPTLEVGEPARYDR
DEVNRRFSITADGVYVISGGTSGIGLEIARYLVSRGARRLVLMGITPLPPRDQWVSTIREGENARLAALNALAAELERLDI
YTGTLSNAAALANFFNRIRRESGPIKGVVHSAGVYSIDIKNSAFVTRDIEDMRQILEPKVNGMEHLAECFADDPLDFFVSFS
SLTSFIPLLAGISDYAMANAFDFFSAWQHHRQORTHYRAITWVDWNETGVAQRMTPPEEFALVEKNLERVGLSSFSNEEGR
HFFEQAMLLPNQHHLVPCFIDAARLNAARAELLHGISRNLAESVPETPHPVVKAAPMGAALPAVSNMDRRDDLSPDWQLK
ARVTQWEQQGEALSFETLTRYVSFDQLKQODPTLIQRVYQLLYPDEPAAIGNDSVSPKPSSEDGEPISEIVYRALLDLVKI
DGIDEHESFANYGLDSISAMVFSTRLEKRLDMEIPPHWLIDFPTIQTLEQIQONQVLA

CalB (KS⁰-ACP-C-A-PCP-KS-DH-KR-MT-ACP-ACP-ER-KS-ACP-KS⁰-HC-HC)

MNIDEQLERMKAGFDAAQKTQIHAGTLLNRIERGKNNVPSSEKRDGALASAANGDRMTMRAEAQNSRSLPLKADIEPIAI
TGLSGYLPGCASVHAFWEALDQDRSLIEEVPASRFDWRTMYEPGEKSVSRWGGFIPDIRGFDHFFGILPAEAKRLDPRQR
LLMSVYQTLLEDAGYASDSLKKSRTGVFVALEENEYAQLLQEHGVAQDGPDQAASLLPNRISYFFDFRGPSEFVDTMCSGA
AVALHRAVTSLRMGEIDRAIVAGANLILRPDAYITLSRAGQLSPCDTVHSFGAASGHVRAEGVASLLLTPLSQAVANGDA
IYAVIRNTAINYNRGGTSMAAPNPAHADLIRDCYEQAGIDVRRVGYIESQCMCNPVADLAEWQAYNRALTTLAREQOVE
LPAGNCRISTLKPMMSGHMEASALGALLKIIRAFHTHTVHQILNFTNAHPDMEIHGTPCRLLSDEAWPSEDVPRMAGLHA
YGTGGNNAHILLEEYREDDRAPSVTPPGGPFICPLSAANEAPLRQVRDDLHRFLVRHESVDLANLAFTLQTRTAMAYRVA
FVVGTRQELIRALEQFQSGDEPQONDVPIFSGRAEPNIQSFAPPESEPAQARFWVQGGRFDPARRDAVHRISLPIYPFE
TLDYWFGETRELATVTPDQDETSEQAIRSHLISALAMALRLPPEKINCCKHLQDYGIDSLMGTDLIRGLEKAFCKVYGRD
LLAHP SINALSFAQLQNLTVDPAMHEGGAPAEQETALASEPFPLSANQQGLWILQKVAPEMCAYNFPLAVRLVHKMDAAC
FKQACQFLLQQHPILTHTFEEIDAQLQORSKPLGQITIVQEDISHLEADQVSAYLQDRARIPFALDRDPLIRFHLLRRGEQ
EWIVLLVHHIIVDGFSLHPLYTALLDAYQQLLRGATPVIAPPSGNSFRDFVAWERHLLQGDGERLRTWWHQNLSGRWPT
LNLPTDRPRTETTFHFRGRVHQVSMSPDLRQLFSFAQDARVNLAPFFLALYQLLLYRYTGQODILVGMPTRSRPEGFETTI
GYFTNLIPIRTSDFAAGGSFADLLQVQVTVLDSLDRHALPFPEIVRDMTAERTELTPVFQALYEQNFFSSNGLDELQNR
QDFSINFIRDLHQEGEAELVLEVRQDDQVRLHFKNPDLFSDGAIITMAQHLYTLAEQAVAEPDRPIETLNLSSQTERQT
LLNDWNQSETDYPRDWCVDLFRQAAQTPTAVALRCGDTTLTYSELDRRSTILACYLQSHGVSPGTRVAIFTDRSVNTHI
GLMGVLKAGSTYIPLDPDFPVNRLVYMLEDSQALMALTVSQLQDKIAGLLSQSGRDIPIVCLDTEWQPIAEQAAGRTVRRV
RGAELHAYIITYSGSSGRPKGVMIPHRAITNLLSMAQTPGITASDITLLAVTTTSFDMSVLDLYLPLVCGATIAFCPSGIA
RDVEMLKAEIRRHKPTIMQGTPTWAMLFHSGWQNEEKVRIICGGESLPESLRQRFADVANCEVWHTYGPTETTTVWSSVCRL
NDEGPISIGKPIANTEIYILDRHLAPLPVGIAGELCIAGDGLAHGYLNRPDLTADRFAHPFRSGARLYRTGDLARWLPDG
TLEHLGRMDFQVKVRGYRIELSEITRLAQFPNIRECVVAREDESGQLIAYYLPDADTAVGSRELVDHLAADLPGYMI
PALFFPLTEFPLNNNGKIDRKVLMNRPLTAVSRTHEPTEPVLPOEQAVLEIWKSVLSDAISTTDGFFEVGGDSLRAVLLA
ERIGKRFGVSFTTTEVFRHASVQAMAQKIASLSTGTHDMSSQDRGERQKPTANPQTDKVDQHPDYRDSLAIVGISCHFPD
AEDHATFWQNLREGHDSAVFLSEEQLRDAQAGESLINDPNFIPFLTADKNRFDNAFFNISHKNAGYMDPQLRRLLOHAW
LAVEDAGYVTEDIPDTGVFIATSNSFYQAPLYQGEVDLYDADAYVAWVLAQPGSVATMIAYQLGLKGPFAFVHNSCSSLIV
GLNSAWQSLRMHETRQALVGAASLMPSNKLGYVHQPLNFAAGDGRCKTFDADADGMVGGEGLAUVMLKRAEDAIDGDHIY
ALLRGVAVNNDGRDKAGFYAPGIGGQADVIRKALDKTGIDPESIGYVEAHGTGTRLGDPVEVAALTEAYRQTTEKROYCGI
GSVKSNIHMDTAAGLAGLIKIALSLNHGEIPPTLHYKTANPEIDFAASPFYVADRLHAWPQTAQPRRAALSSFGLGGTNT

HAIFEAYPPLPEALDRPKKKVLVLLSAANAEQLRVYAERLHHFLQHAPADLNLDLAYTLQVGRKAMRARLAFVVKNRASL
LARLEQFLAGEEPKGCYQGTAAQDAQRVPEALISGRKFGLSRLWVAGARVWVKQLYHDSRPRRMSLPAYPFAGDVFTLPQ
TPAAVAPKATVARLHPLLHRSTATSDGLQFSSRFTHGEFFLSDHVVNGRRILPGVAYLEMARVAMEQATKISDPARVRLRN
VVWVRPLVLEEQPETVHTRLVKDGNRMQYEIVSEPRDGEATPTQILHGQGVIELMEHPGSRPRDLGALRTRMEQHRFSA
DQCYTAFATYGISYGPAFRALDTVYADGNPTQLLACLRLPEGVRNLSEFVLHPSMLDAAIQSSIGFIIIGSQEETPSLPFA
LEEVGIYGPCSSEMVALVRRTHGHSQERLDIDLCDQQGRVCVELRGFSNRPFHSGPLQAGQAEQNGVSRGFLHIETPVWN
EMVPAEAEIWPPLAEKTLVGG SARQKGQLRALHQPWPSLHEITLDPLTDDL AGAGDLADLSSPVGHVIWIAPDEETADG
EAIIEAQERGVQLFHLVKLTLLATGYGVRPLGLTLITQAVAVVRHERIRPAHA AVHGFAGSLAQEYTHWKIRLLDLESSS
EWPAQM FNLPDVEAGAYAWRGGTPTTPLWFQQALRPVRDLDRGPSRYRHGGVYVVI GGAGGIGEAWSRSLIETYQAHIIW
IGRRPLDDEIRSRCDALAHFGPAPRYIQADASERGDLERARAEIRQHHPCHGLVHAALVLDGSLANLDENRFRAVLKAR
IDVSVRLSQVFQEPLDFVLFHSSMTSFDRAAGQSNYAAGCTFEDAFAHQLSQTPVSPNGDRPLIRVVNWGYWGSVGAVSA
PVYRERMEKAGVGSIEVTEGLTIIDHLLSGSLAQMAVFKTLSNASGETPD AVSVYPESIPAVLDHLSFPVAIAVPSNRHAA
AIDEAQVGLLWALLQPLCGNNTFSPADLVTVPDNTLTQWAQESCRILAAHDFLEPVGNAYRISNKH PANTDPWQAWTRQKA
VWLEEPSLRAQIELVEITLKALPDILAGRQ RATEVLPNASMERVEGIYKDNPIADYFNDILSDALMACLQQRVLVQAECLG
CTSPQCTACNGVSPIRILEIGAGTG GTTAGLLPRLQPYEDHLEEYGYTDL SQAFLIHARKHYAPGRPWLTTTRIFNVSEPLA
DQDIQAGSYDLVIATNVLHATADIRRTLNRNKAALKKNGILFLNEISRHGLFDHLTFGLLDGWWLHEDEALRIPGCPGLTP
RNWEMVLRQEGFSSVRFP AEADHDLGQQIVLAQSDGLVRQAVAAKNEPRPRPVRTSNPVRTNPPVTATVTGRMIEDHVQEI
IRESLAEALAMAPSQIH DERSFAALGVDSITAVRIVNQINQOCDLLLPTTILFDHTSVDQLTAHILA EHRQSLQTSLQEDM
VSQEDQMPSPEVNEPEVSPLTEH MVEDHVRDI IRESLGLSLHMP EEQIRDDRPFSEYGVDSIIAVQLVNRINQGFGLLLQT
TVLFDYNSVNDLTTHILEAFGPALNGALSVD MAPSVDITPRAVAREKQVPVERQVLPRTYAQSGSDSNYRHLQIRGPGDID
DLSLAASPLPELGKNEVRIAVCAFSLNFADLLCVRGLYPNMPYPFPTGDEAAGIVLAVGDAVTRFQVGDAVVCMTPGCHT
ELLTCPEGQVYAKSANLSFEEACSLPIVTLTMLHAFRKADLQGERILIQTAAGGVGLAAVOLAQHAGAEIYATAGSQAKL
DYLRLDGLVPHLINYRESDFEALLRLTGGEVDVINTLSGDSIQKGLNCLRQGGRYIEIAMAALKSTRSVDISVLNRNQ
FFSIDLGLLGSEQPERIRRAWEDMSHLL EQGVIRPTVSKVPFEAFRDAYSRLDHRDNIGKVVVQLPPVTGAEVISPSRPR
RETVPQQVRTSATPEPIAIIIGMSARFAQSENVQAFWEHLAAGHHLVEEVNRWDLGNAEGDGRCRYGSFLEHFDHFDAAFFN
ISEEEATFMDPQORLFLEECWKALEDAGHGGEAVRGSRCSVYVGCCRGDYPQLFPETPPAHAFWGNEASVIPARISYVLDL
HGPAAVDTA CSSSLVAVHDACRDLWSHDCDMALAGGVFVQPTPEFYRASNDAGMLSPTGKCHSFDKRADGFVPGEVGV
LLKRLADAEADGDHVYAVIRGSGVNQDGSTNGLTAPGARSQERLIREVYDRFQIDPEEITMMEAHGTGTHLGD AIEFEALS
RSFRKDTDKVGYCALGSVKTNIGHASTAAGISGVIKILQSLQHGOIPPSLHFESSVALETSPFFLNQQLRNWVAPQGS
CAAISSFGFSGTNAHLVIAEAPPMPRVHEQKPSYPIVLSAQ TALQLEARVTDLLNHLRRED CADDLGNISYTLTGRKHH
HRLACVVRSTGELANLLERWLQGRTPQIAVAELSEDGSRRHGSLEKLGNCIQACLAADSPESYLEHLATVTDLYLQCGG
LAYEQLFKSGYARVPLPTYPFQRKRYMVAAMPEPTVAMTQPHEPQSHEPQSHEAVTDAGGDEDTAHLREW IADRLQOPAG
RISTSHRFELGLDSVOLTELARELQKHTGDFPATLLFEHIT IADLASYL AQHHPGLTDLGHGVTRPDINRTVENAPLPRP
ATVPNERATYLASAGSAPSTNASAQKLAI AVVGISGQFPQAKDLNEFWSNIEAGRNSITTIPAERQELRNGSHADNHWGGF
LEDIDRFDPLFFGISPT EATFMDPQORILLIHVWRALEDAAITSKTLAQRPTGVFTALASEEYEQRVAQSDQSALAQASAG
ASTMPNRISQILDLCGPSANYESACSSSILALHHA VQAMRNGECEQAI VAAANLILSPDGFAGSDVMGNLSSTGRVRSFQA
EADGYVRAEGVGAVLLKPLHHA VQDRDHVHAMIRGTGVAHGGSRMSLTAPNANGMQRAMVQAFRGTDIDPCTLSYIEAHGT
GTPLGDGIEVRALQNGYREL VNAQARDAAPHHPTPIHLGSIKPCIGNCEI ASGMAQLLKVILAIRHQIVPGIPGFI TLHEQ
ISLQDGPFI SAHNROWDRQTD AEGKALPRRAGINSYGISGVNAHV VVEEYLPRAGADQAI PSGHIKDKPQIIVLSARNPQ
RLKVAATD LLEFFLLQESA EVTYQAHLLRHEL CRILARLLGVAQDEI EADQSFEDHGVDPLQ RARLHEELSEVLAI PLASES
FORALSPVALIGELLADERVAQSIPOHEL SNAAISTARAASPLADLAYTLQVGRVAMEYRLALVVESRTALIEGLKTWLD
GGSGSLIFSGNTEAEEARPLLSDGPE SRLGMAEARLANAWAWGEEVPWETLHQSAHRVSLPGYPFEDDRYWDPPDHTRHA

RPGRQIAEPSIGIPTQNRMVRLKQMIGEILGIEPAQLPTRKPLSDLGFSSLCALSLKSMLEQEFNREIPLVGIDVYATLEQ
LTVELEAVFPSDHSATIPLETAEALFPEIVPNPEARFEPFPLSDIQEAFLLGRRLGVEGDQVGCHVYLEMEFGDLDIYRL
NRAWQRLIDQHDMRLRVFMRSDGSQQVQAETPAYRFRVVDLRRKPAKVRSERLEDIRERMSHKVYEAKQWPLFEIRVSVCPD
RQIVHFSIDELILDASGIDLLFQQWQMLYDDADAKLPQADITFRDYILAVKKFETTRRYRDDLDKLEKLNLPKGPALPL
KTHLEKPGNRYRRLAESLDPSLWRVLKGRAEQCSVSPTALMLGIFSAVLHAHCGPDAFSLILTRANRDAIHPHLLRVVGF
ISTSFITPGQRELKDLILLTQQLRFEDLDRSSASGIRILRELRSRRWIDKKHFLPVVFTSLLGHQPISDNEGFNQQLSCF
LTQTPQVFLDHQLYEHDGKLRFSDVINNYFEPGSIDALFRDYCQVLRRLAADINLWDDALEVTKVSSSPFPLTDQQQAYA
FGRTPYGAGTNTLVYLEYDAEELDIPRLEQAWRKLMETHDMLVTSILSDGTAQHLKQVPDYAIVVADLRTYAVSLRQAELO
KIEQEMMSRVCPLDDWPYFELRVSRIDGKSRIHLAIDMIADGPSIDLLCQLFDFYRDPQMQRPPAYTFRDYIMALEAH
KQSPDYGESLDYWKQKFSHMPSGPELPSRTSIIHETERFTVTIKGWTGLRETAERLSVSPGMILLTAYAEVLAAWSSPSF
TIVIPCWQRPQLHPAINEVVGDFTAMSWLVVDQTAQSFARVIRNHRMVQEDLAHMKVSGKLVLRRVMARQNASFPVVFTD
LSPQPNPALPPGFAAGRSLSRTPQVHMDNTSTEFGDCELNWDVQDRYPQGMVARMFVGYQRLDCLRRDPKSWTWMDFD
SFIDAEPEKYQQTAAIRALPVEVGMKGIGMKGVMKKESTE

CalC (A-PCP-Ox-Ox-KS⁰-ACP-KS-DH-KR-ACP-KS-KR-ACP)

MSMNLPAYPYPRSLHELSCHELIEARLLAAPTAMALSFAGETLSAGETNRRANQCAHYLRGLGVGPDVVAVLMERSLEAM
SAFLGILKAGGAYLPLDPEHPGERLHLILEDAGVSIILTQAHLEDSVAMFDGTLALDRDRYVLDGELETGPEQIALPEDL
AYVIYTSGSTGKPKGCMVPHRAICNRLLMREQYNVGEHDIRLQKTPFTFDVSVWEIFLPMLTGACMVIARPGGHKNAYL
IKTIRAEAITICHFVPSMLRFFLNQOEAGACVLSRIFTSGEALGNELMSRCLNTLOAELHNLGYPTAAVDVITYWPCAPR
PDHKVPIGRPIANVTIHLDAAGNEQPAGEAGELYIGGIGLARGYLNQPALTREKFIPDRFSDAPNAHLKYTGDKARLLPD
GNIEFLGRLDFOVKLRGFRIELGEIESVLRNHEAIREAVVLVREPDEDPRLVAYIETHGQPVTPQARAYAKTSLPEYMV
PNLFVPMSALPVTQHGKVDRAALPWPINGRVVEVPPVLPVAPAPLATEPAPPDRIVKTLALLFGALNVPDLTVSDDLFD
VGATSFTMVRMVEQVDEHFGISVPIDVFLDQPTVAIAEYLIAQRPDLLPDGAQRMVNGTARVEPESQEKAFALPEIRFTA
RSGVMRHFSGLLRREPFRFLSLLKCHDGKYLASAGGLNPTRTYVYIQAVEGIPQGVYYLHPLEHALYPICRPAIDA
FAERDRPLFAKADFAVFLIAQMDAIEPIYQDAAPTIVVLEAGYMGQLLSRAVDGFLNVVPAATGVDFANIRDLFDGP
FIHCLLGGVADSHIGEQEQRAGDFASSADLFAHCQDGFAAFLTQVGGSAFPTPEVSERLHREQPIRQFDENVVPI
NEPVDPPQYRIRACORDYLEQPVPLASFSGFLSLLRPLGDQDTFLYPSLMCSLANTPGLNCRYVVRPDGVAGVPGGIYHYN
PVRHELT'TVRPGLSHELHCYTPFNRKHAQQARFALFLVAPLAALRPLYGENSLYLALLESYMGQLLLLDRQAEFSIGVCP
IGGMLFDKIRDDFRLAQDDTLVHSFVCGSYETQMPRHQYLSPPPSAAQNGSVEMARDSRMYDIAITGISGRYPGAPDIKT
FGRNLMGRDSFRTLHFSADHYHLEDDGGYSHHGGFLEDIDQFDSLFFGITPVEARHMDPQERLMLEVAQACLEDAGYTG
EALNHGGRGVYIGAMWDDYQHHSACWQADDDEQASSSHASIANRISYFFDFKGPSVSFDTS CSSAMTALHHACVAINS
HIQAALVGGVNLMSHPYHQGLLQQLDMLSPDAHCHAFGRDADGWVAGEGVGAILIKARANAERDGTIRALIRGTTIGHSG
RTFRFGAPSAHAQEAIRDALGHSGVTPDSINYVEAAAPCAAIADAAEFNALAAVFADSATRVGSVKPNIGHLESASAM
LTKVLLQLKDHRIFFTITHVTTLNPMIKLVDGGLSIATSLQPWDRCDDRGSPLPRLALINAFGATGSNGHAVLEEYVTAPL
PEIRIPVLIVLSAETTEQLTSVARQLHDFLDTPPLPRLVDMGHTLRIGRVALTERLVVAETHDELREKLERFISTGGGPD
LYRGHANQGSTAAHTDASPEDLHGLAQQWVDGAAVSWDLLSRHGERRVPLPTYPFAGPRHRLAGRMPQLHALAPISR
KSA AAGALVPHLKTIAQVSEIPISRLNERATFDTYGLTSAMITKLTALLEKDLGECSTMTFFEYQSIQDLADYLAANHADQLO
RLGDPPAVTEPARPMRRPGTRPAPVSRTPSSEPIAVIIGLSGRYPGAPSPFVWENLKNVDSISEIPRERWDYRTL
PDGA IARWGGFIDVDVCFDPLFFNISPREAERMDPQERLLETVWHAVEDAGYSREALEAAAFAGRVGFTGAMYGEYQFFSAPLS
ESGFAISTSYGSIANRVSYIFNLHGPSLAIDSLCSSSITALHLAVESIRRGECALAIAGGVNLSLHPNKKYLLLAEMQMASA
DGRCRSFGAGGTGMVPGEGVGAVLLKPLAQAEERDGRYGMIRASAINHDGRNTGYTVPNPNAQAEMIESALARAGTCPEW
ISYVEAHGTTGTPLGDPIEIAGLTRAFATDKTGICALGSVKS NIGHPEAAAGIAGLTKILLQMQHCQLVPSLHAEETNPSID

FARTPFTLQRECEWKRPITIDGREIPRLACISSFGAGGANAHAVIEEYRETASEPRGEQRPVVIVLSARDDERLHQVGENL
 LRFLEMEGRETCGCLNDLAFITLQVGREAMEERLAFIANDLDGVRESLTVFLNQTDASAGLFRDRINTRQDGIALLTDDEDSR
 DLIDKWIAGRLDKIAELWVRGFAIDWPRPVGARRIALPLYPFARERYAPPAGAAMAPVPTNVSAGLLHPLLHRNTSDFSE
 QRYTSSFHGQAFFLADHVVVLHDREQQVLPAYAYLEMAARAAITQASGMPTANELLSLQFHNIWVWQPLVVADRAQDVHISL
 ALEEGAEADRLGPIHFEVYTDNGQRAVHSQGIATFADFEESTLDLTALQAEIDRPGPDCESEFYRAFRDAGLHHGPAYRGLS
 QLHSSAKESVILARLELPAMVSETLTTPPTDAGADRFLLHPSMMDAALQASAALYTDSHHPALPFDALDELQIHGRCTQTM
 WAVVRPAAGVASDKIRKCDIDLCEEGRVVRVMKGFSSRLLETNATAPTGTLLYQPVWRSAPIVDEPFSPAYATRELLVGN
 GLELDIAGTRLDTSRGEEGYVDIAAQTFETIKTLLARKRQGNMLLQILLPGPPSAFSGLIGLLRTAHLENPRFIGQLIEID
 AATACSGNALNDILDACAALPDQDHIRYRDNGRELADWEEIEGPEGQPHLPWKDGGIYLLITGGAGGLGRLLVREIANHCEH
 ATVILSGRSARQETS DIPSGIRVEYRQTDITSREAVADLLGSIVRNHGNLHGIIHAAGVLDDDFIIRKSAEAFRAVLEPKV
 LGTSWLAREASDLDFLVLFSSSTSGVFGNVAQADYAAANGFLDAVATAHPEIPFLSVNWPLWQEGGMRPDAATEQELAQSTG
 AMAMSEHDGFAALYRGLELENPRLLVLSGQRQLRHTMDATAQEAETEAPPSAPVRPSVETTPAALTEQAHLYFKSLLCDT
 LRLPTHRIRAEPLERYGIDSIMVMQMTNQLETVFGSLSKTLFFEYQTLAELTEYFLGQYGDMMRQLLGGKKELDSPIRRP
 AANGLRRHSAMKDMPPPQAAPPQTTPPPQAKTVGIAVIGLTGRYPEAADLDTFWQNLAEGRNSISEVPAERWDWDHDFSQ
 DATRTGVHLSRWGGFLDDVDKFDPLFFNIAPRDARFMDPOERLFLGAWSAMEDAGYRRSDLPARTGVYAGVMYGEYQLLG
 LEASPNGRETATSNLYASIANRISYALNLHGSPMTIDTMCSSSLTCLDLALRDLQOGRDLDLAFAGGVNLTIIHPNKYTILSD
 SRFISNRYCESFGEEDGYIPGEGVGVAVLKRLDDALRDHDHIYGVIIIGSAVNHDGKTNGYTPNPRAQOMAIADALAES
 GVHAEDISYIEAHGTGTKLGDPIEMTGLTRAFSEHTSKTAYCRIGSAKSNIGHCESAAGIAGVTKVLLQMOKGLIAPSLHS
 EKLNPNDIFAATPFVVNQTLRPWDRPASGAPRMAGISSFGAGGSNAHLIIREHIDAAPRSTGTHHSHLHPIVLSALNEERL
 KVIYAGQLLAWLEKHONSATPTVPMARDRFENEVRTILAEELLOVDVAEIEETNASLEEYGIEPVHLNLTFLERLRESFPHSVPE
 TVPSVRSIAAICDLLLLQQVPAETTPLLLLTDLAYTLLVGREHLEERLGLIVTSAEELRRKLGAFLGEGTETDLFRGNTKEKTT
 LFEADEALAGVVDTWLQRRQYDRLLKLWVSGHDLEWQKLWQDEDPSSHPHRISLPSYPFARQRYWLPDKKPNTGPDITRPP
 VAPQAEKHLAPQAEKTLAPRAETSLSMSQSGKQWLCVAETWHDHSLPEDLDWQEALQHNDGKHIAIIYQDEAKATALQSLE
 QLQALPKGLHIDTVPVDALTNDKPCVESPDVVLFAFPQQAVELVAQPVEADLAADFVHLSQTLMOGAWNKPIRIYYLHSSG
 DGPRLDCEALSGFLKSAMVENSRRHWTCIDSDGDLVANQAQLMIQEWLADAAATPPPFVELRYRRGQRQLRRLEETYPQOP
 DAPVFRSGATYLLTGGFGPVGELLCRELAQRYRARLVILSRGALDEERRSLCRDLETGLASVHYHAVIDGDRDALQKTYAE
 VRREVGP IHGVIHLARLVEDGPILSKKWSSFOQVIRAKVOGTIYLDACADEPLDFFLLFSSMGAFGIRGSADYGYSAAFO
 NAFAAWRRQMQRGGRPGETTALCWGFWSVDYRMPANREQTITSGFDPIDMAAAFPMIEAGCSHQNPALGLMAVRDGDRA
 RRELGLTPSRAELLANQLPLWEQRQRQGIPLSIDDIELIDAEIISTLDPVELVTRLHRLLPQTNDLDTPTPLESVDPPO
 MSPPTAGPPTASLELTDITRATLAEILEIDDIDENQFPDYGLDSISGMRLTVSLEKKLAREIDAQWLIDFPTVKSLSQOL
 AKQOEPIMR

CalD (Ox)

MSVSVEELLGIKPKAASAEVDQKIAFSFLFFSDVRKDISDAQKYDFMRDITLADREGFTSIYLPERHFYEFSGSIYANSA
 VMAAYLIPQTQQIRFRTAGVSLPLHHPAEVVEWWAMNDILSGGRVDLGFSGGWNKADFIYAPDNYDGRREICSERIEMVKQ
 LWRGEEISFPGPDGESYPVKVFPRIQKELNVLLVAKNTEAFIHAGRQGYNIFTMLYGNNEAMKEPIRLYRQAREEVSL
 DPKQGIITMLHHTLVHEDVDLVQREAEAPFKAYIASALDAHVKAAIVPGEVVTDEKQKILAYAYQRYFKTSGIFGSLAHG
 REIIIEAISVGVDIACLVDFGVQYQIVQOSLPYLKELIAPYIKKNRSTGC

CalE (KS⁰-DH-ACP-KS-ACP-KS-KR-MT-ACP-KS-KR-ACP-KS⁰-ACP-KS-MT-ACP-ACP-KS-KR-ACP)

MLSESEKSVRCRSIPPFGGSVMTIEEQKQLADLLRTKDSKHPPPKAELRPEPARHHAARQSMATIGLAGRYPNAPDLEAF
 WENLIENRNCIREVGNERYDTAAIFGDPKSEVGKTDIRHFGLLDDIYRFDARFFNVSNREAEVMDPHMRLLETFVWSCVEN

AGYRPRALAPKTGIFISFYNHEYSDLLRELEVEKSSEPYLGTGTVGAI FANRISYLLGLNGPSEVYDTACSTVLVALHRAI
QAI AAGDCEQALIGGV SLLLTPGRVLDLSKLGILNKGPICNPYSHPANQENIGEGVGALMIKPLEAAIAAGDYIYAVVSGT
DVNHGNGMSGHLTMP SARALTDLLNTTWTRLDLKPGELAYIEGHGAGSEADVVELVACQDSLKNRLSAGEKVPIGSVKSNH
GEGSGGVAQLTKCALSFHHGTLPATLHFDKTDPIFDLEASHLQILTQNTPLASNTAAYMSILAYGLGGANAHVVL SRYV
PEPVSNHQTPVSGFPFMLFSAGDRDTRLAYIERVFRHLERPSNLD RYRHLCADES YLLHSL SRTLMARERHESCRIVFLV
DSPADFLQCCATAFLADREL PQIIQPGEKSGGDERRNWVAGAEIAWPQQTYQTLPLPPVPFRGKVLRLQPKQQT LAIGERL
VTTRNGTLTTVAVTLRQDDYFISQHVVDGTPILPGAGYLALLTHIAHQVFQQSCTLRNVAWLLPFDPVESTANLLFEFDP
DGHFRVFRQGREPLYCKGQLLRDSVPQAGEFAAQIDGTADTAAAPLITKEAFWQWLNAPETRQQHGPDFRRINGLYHVDDR
IVALLEPHHHDLPLPEIPFFDSALAASGGFGLLEQATQSPAIPFAIERFHHLAPMEPTRPVYLAVRERPGKLLRYDISLED
GQGQIYAVFEGLFVKSFQALQTTPVIAESPQPEKQPVYEPAESSSVGRQTALVAELRRRIADFLKCELEEVP LDESLEPLG
LDSIAVNELTDQLGRKLNIEIPATTMFEYTNINDVATFLCDEFADALADSDLAPSDLPAPRPAPVSALSSHLVAARTDEA
RTDEAIAIVGVGGFFPGAENFDFWGKILAGQDLISEMPEPRRSSVYTVYEQEISDLNGLYGGFIKNADRF DADFFQYRHE
EVMAMDLOQRLFLEATWATLEDAGYHPLSLSEQQGVYVGAIGNDYRAFLEDCGYPIDMFYEGTGASLAGIANRTSYFYNF
NGPSQIVDTACSSSLYAVDMAVQAIRQSLCETAIAGGVSSICTATGFHMYAAMDYLSKDWCKTF SDEGDGWSKGEMVAAV
YLKPYDKALRDRDHIYGLIRSSG TNHGGRAFFYTQPNNSKHVALIKDVYRKAGVDPRDVAYIEAHGSGTKMGDALEYNGIS
RALKELAREADVGLDN GRCGIGSIKS NIGHTEAAAGIAGLLKALMILHDGQIPASLHIDRENENIAKASPLYLTRERQPLP
PARIAGRPRHAGVHSFNFSGATVHALLAEHIEPVEEKPHLPLTRYPICLSGETPETLAARCRELA AFLADRSELRDDFDRI
VVTLNRSRSFMQYRLGLIVTSYDDLQTLTALPSEFSDSDHTRYGRVDKKAPRIQPPELGDDTVPQLIDQWLNPRFDWAK
LLDPYGIEKIPLPTYPPFAHEVSYPGTTGAALVRKPPPRVTMAETATPLTVGVEPVPPAPAVADVATGDIDGELRRIFAQL
LEVSVDIDLDDES VSEFGFDSLKITS LSEAINARFGLHTHPPDIFEFATPGELAA FIRKEADPSTMAATPVETPVEMTGOT
PPVIAAKSPGTAPIPREARATTAGGHRPIEIAVIGKSGRFPGAEDLDRFWENLVNGRDAISEIPADRWDWRATYGDPORED
NKTNIKWGGFINGVADFPLFFSISPREAEMMDPQORLLMTYVWLAIEDAGYSTASLSGSATGIFAGTADSGYFN LIMEAD
SVIEFGATGAIPSIGPNRMSHLLNFHGPSEPIETS CSSSLVAIHRAIAAIAMGDCDAAIAGGINTILT PENHIGFSRAGM
LCEDGRCKTFDDRANGYVRGEGVMVFLKQLEAAEADGDTILAVIRGSAENHGGRSNSLTAPNPNAQADLLVAAYKRAGID
PRTVTYIET HGTGTLKLGDP I EIKGLKQAF TTLC AATGEPRVAEPHCGLGAVKTHIGHLELAAGIAGVIKVL LQLEHGT LVR
NLHCDTVNPYIDL TGS PFYLLDQNRPWTRLKDEQGRDLPRRAGVSSFGFGGVNAHLVIEEYVGGSRPPPTASGPQMIVLSA
KKETVLR TYAATLLTFVKEKGSEL DLRDLAYTLQVGRDAMSERLALIAATPTALVAKLDGWLAKGTELFRGRATRS AELDD
LRDAILVWIDQKQYDRLLHHWVRGLALDWNVFYEADRPRRISLPPRPFASQRYWVGKPETKAAESAPDCDGLSYLP IWQEM
ASAAPAIEERAVETVLLVYHTSPYDFADSLSEHLLGAQPGSRVIRVRLADQTAAGDEHERCCGVDDVHGFAAC LADLTPD
RVFFLSTPPACENDELALLHQNQELQLLRLVRYLREKNHGKAGLPLYVLTLDNRPLDDAAANPIGGGLTGLTYAIAQGDHR
LHVRHLDLPHAE LANRAHHAALITMILAEP PCDRGEPTRLQDGIRHRQAF LRFPNP PQSGLREQGVYVIA GGS GTVGRAIT
RCLLRDHHAHVIWLGR TAPDDADLGERLA AFAGMGSSLYTLQADVIDPDALHAAGDRIRAQHPV IHGAIFSGIVFSLNNAV
ATTTEEEFRCILHVKT LGSVNFYNAFREPSLDFMCFSSAQNFASGAATLSAYATGITFSDTFVASLQDSAPFPVGCINW
GFWQTEGVADDFSRNASSLTHEEGYHCFARFTHLLREGYAWRLLCMRASEPVKLLMNIVADETARIAEPAAPVLVTQLQPV
THHAEPVLPDEPHAGPFD AWLAHFLLAQLQSLGILQAGDTPADAAELRTRAGILDVYARWWSETVRILENOGLVKMRAGQI
WLHVETTIDATTPALQKKAWLA EAEMQAQTDLVADCLEALPAILTGGTQATDVLFPNASMAKVEAIYGRHALSAYCNGIIA
DTVET YVRKRIELDPAARIRLIEIGAGTGGTTATILPRLAPLQDHIDTYGYTDL SQAFLMHAESTFAPDHPYLGKGIWNIE
QPPQVQDIEVGSYDLVIAANVLHATCRMRDTRLHAKAALRPNGLLLLNEISDHS LFAHLTFGLLDGWWRYEDAALRIPGSP
GLYPATWQRL LSEEGFAPVLF PARVAHPHGLQIVVAQSNGMIRESVGRSTPTAAPPRTQTAPVAEVKQAKTTVKGSNPRE
TVAALILDSLSQTIKIEPDEIERDVAFSDY GIDSILGVGFVN RIGDTLGVS LNTAILFDYVNTTEL TSHLAEVYADKVALA
TEPTSPPADPIHIETQ RSPVQSKPEIHTTRVDHTGDEIAVIGISGQFPGARDVQTFWHNLVNGIDGVAELSGPYLGPNGDG
QTLHGGMLED RACFPVFFHISPREAESMNPHQRLVMQEGWKCLE DAGYNPKALSGERVGVFIGAEPGGYAHETFTGSSDA

LVASRLSYLNFKGPAMVVNTG**CSSSA**SAIHLACESLRSGESELVLAGGVFAVL DHLLRTLGDLEMLSSFGRCRTFDAAA
DGTVFSEGI AVVALKRLSDALSDEDP IHGIIMASAMNQDGASNGLTAPAGPAQESLIADLYRRRQINPEAISYVEAH**HGTGT**
RLGDPVEANALSRAFKQFTDKKAFCAVGSAKAH**HIGH**ASAAAGVIGLVKILLSMRHHQLPGLLHFNLQNLPMFDDSAFYIN
KPLSAWRSERPLIAAMNAFGHSGTNVHIVVREATTTARPPAPEQPQLIVLSAADETLLRDMANLRDHLRADHRLQDIAYT
LQVGREAMKQRLALVVSTTVVDLKQCLDDFIRGEATADVYRGLAANGQSLAANGQGLAANRQDVAPEIAAGTASPTQALEQL
AAPWVQGAPVDWEQCHQGTTPPRRTHLPTYAFAREHYWRPEEGEVQAPVRSDDSQASKALVLCQPVWRSRPTSQIMTPAPA
IGRHIVMICEPDAGTAHAVDGAIRLHVSGDDLADDYQNLVVQVFTTVRDCLENRVNGVTLVQILLVTDRAFHPFSGLSGLL
KTAHLEDPSFVGQLIQIDPANLDRWAENTAHPQDDQIRYHNGQREVLRWEKVQAPATPASVWKHGGVYLLT**GGMGGLGSIC**
AREIAARTHGATLILVGRSQVEQRDIEQLGLANARIVRSVDVSNGSAVSELVRDIRKAFGRLDGILHTAGLIQGDFIIGK
DLESFPAILAAKVAGTINLDRATDDLDFVLFSSIAGAMGTPGLADYAAANAFMDAYAESRVLEGRLIRSINWPHWQEGG
MQMGAASEAMTEVTGLLPMQTRSGIQALTFLGLARDDARLMVLEGDSNMIEQNYLQDDASQQLQAKQLQAPVATTTTPVATT
AVNPATLQAQTLTLLIRLFAEVTRLAETRINPHEPLETY**GIDSL**VVTWINRSLEKALGPVSKTMFYEFQTLDALAQHLTEA
YPDGCAAWTGLGPASVTAAALTAESQSPRVARDEAHPDAN**NAVAI**IGLSGRYPQADDLETFWQNLIEARNCIGEIPGERWD
WRAYFLADPKHAGRLKKSYSRWGAFLNPYDFDPLFFNMAPREAESID**PQERL**FLMEAWKAMEDAGYAASRLPDEVRRTG
VFAGITKQGFQLYNRDNDALPRTSFSSLVNRVSYLDLQGPSMPVDTM**CSSGL**VAVHEACEYLRSGRGKLAAGGVNLYL
HPATYVALSADQVISDTDRCPAFEEGGRGFVPGEVGVALVLKPYRQAVRDGDIYAIIRGSAVNHHGKTNGYTPVNLNQQA
EVIREALDMAGCDPREINYIES**AANGS**OMGDAIEMTALTRVFADRQNTTGDYRIGSLKP**AIGH**GESVSGIAQITRTVFALR
HRLLPPIPRRERLNSDIQFDHLPFQLHQEPTPWTAVTVDGQTVPLRAGITSIGAGGVNAHLVLEEAPARPPRQKETASPM
VFTLSARRRDRLEAYADRWLRYLETHEELDLEQVLYTLQVGREAMACRLAIVCPDRAALIAALQSWRQHHDTPGCYENRLD
GGPPAESVAISLSSDPHQIARAWVDGHPITWEVPGKSRLNRLPGYPFAERRCWIHPEPDHGAEMNPENMTRQNPDSYKPK
RETVRAADRGFTRNRGLRAELAQMFSRILGLATAEIEEIGSFQEM**GIN**SVNALELLEAINTRFHLELPTSLVDCPTLEAL
AVHLENVLPAAEAMMAHLAPVSGPVSHSAPPPATAPSHADTPAAHLD**DDVAIV**GLSCRCAGANDSEAFWKLISEGRDCITDV
DKPDWLDFFRONGESNFPFRYGAMSDLDYFDSLFFRISPKEAESMD**LTQRI**VLEESYRALENAGAPTALAGKRVGTYIGT
CGESAPVYDDFSHFALLGTDMSILAAFLNLKGPALAINTA**CSSSL**VAMDLAYKAVRHGEVDLALAGGISIWGTPALF
LSMHNAGMLSPQGTCTRPFDADRADGIVVGDGVGIVVLKRLRDAERDRNPIYGVIRASDTNQDQTSGITVPSYLAQSQQLQTS
VYRQAGIDVEEIGLIEAH**HGTGT**RLGDPVEIHGLTESFAGAARKQFCAISSVKAN**NIGHT**TAAAGVLSVIKVLSSLQHRQIPP
SINFQENQHIDFTKSPVYVNTLKDWPNTNARGTRMAAVSSFGFSGTNAHNVLESHRPPRTGTADQGPFLFVLSARDKTR
LKEVAANLQRFIEERQSDVACIEANDTEPPCLPLQQHICGLLCETLHLEPETLPFEQRFQYEGIEPIHRILLLEQLQDLFG
TDISTLDFLEQDSIVALAQLLNRDERVRVFFGSEPVRLQPPGGLSLSDLAYTLQVGREAMAERFAIVAGDHDTLAALATF
GQDHIWENSYSGHVSKGLKNVELLQDDAESQALIDRWIAGGQLTTLAELWVQGAVIDWEKIYRGMDPGSLPRRITLPSYFF
AREYCRFHQSSILTSTIRKHDGSLLAELNRNMAVYEQKLNLTALQTRDPEIVNGFNEWIVRLLFVQLRERGI FRDFHPQNPT
SLRQQAGILDKFDRWWQALAIL EEHGLLYADADGIRPTQMVTWKPADELWLEWASLAPFFNRVPELQTAVVLANDSLRQ
LPEILTGVKLVTDVLFPSASMEKMAALYKNEIPDTLNRIAEAAKTYIEERIAADPGARIRLIEIGAGTGGTTAIVLHHL
KPLQDHIETYCYTDL SKAFLKHAEKQYGPDPNYLDYQICNIAKPLEDQGITIGSYDIAIAANVLHATQDLRQTLRHARSAL
KHNGILILNEAIEKTI FNTLIFGLFDGWSYYHADLRLPGSPLLPVASWERILSEELGPVLFVPVAAEATGLQII VAENAA
EIPTSPVAVSRAASASLPEPRQAHTTRTMPAMPDAMTDRMLEDHVRDTIIANLSAALELATSRIDEESFADY**GVDS**ITGS
NLINNINQALQIDLNTTSLYDHNSVRRMTDHILSTHREVLKTSKAAQTKKEQAAAAPDRVPSPTATATVTGRMIEDHVRN
AIVGELAEALGLAPGRIDHDESFADY**GVDS**ITGSNLINKINRALAIDLNTTTLFDYNSVNQLAEHILARHGDVLAINQNGI
DPAGDRERERPPAKIEAQEKIEAQEKIETPEAKRI PPQPSGQT**WEPIAVI**GMSGRFAQSPSLAAFWEHLAAGDDLVEITR
WDLSGEPLQEGRPVCLYGSFLDDIASFDPLFFQISGTEALYT**DPQORL**FLEESWKALEDAGYAGSGLRGQLCGVYVCGGAS
DYLDQFQENLPPQAFWGNANSITSARIAYHLDLQGPAAVETAC**CSSSL**VATHLACQGLWSRETDMALAGGVFVQTTPEFQ
MATKAGMLSPTGRCHTFDSRADGFVPGEVGVVVLKRLQEA VADGDHIYGVILGSGINQDGTNGITAPSARSQERLERYV

YDRFGIDPREIQMVEAHGTTILGDPIEYEALTKAFRRYTNDFAFCALGSVKTNIHVATGAGIAGVLKILLSLQHRQIPP
 SLHFQOQGNPNIQFANSPFDVNTEL RDWSVDAGVRRQAAVSAFGFSGTNAH MVIGEPPLNTRTHAENPGYLVVLSARTESQL
 HDVAANLLTWCROSNQFDLGNLSFTLVVGRKHWHHRMVCVVHSEMELMETLETWLERDQAPQAQVASLAETGLREQAALKG
 YGNQCIDTCLDSDDPVRYLES LDAIAELYLQGYRLKFERLYRGDYSRIALPTYPFARERYWPDQDTQTTTSPVPAAPKAV
 SGGPAEWLFFKEEWVPRVPD SLDWASALDRYRQONIMLLYTDEADKTAFC SLLQOQVEQAVNATDHLPIRCLHIAEMEAAQ
 FAEMPDVVLFLTPEPQESPEATPDMERVSHIFNLSRDLMRQGWEDVVEIYFLYQGN SRGPRLDHEALSGFLRSAMLENERH
 VWEVIRYDDPVPDLTSYQVLLREWLLTEPFLIGSRKNLEIRYRGLQRSIKRLAEAPLLPVGGTTHFKRHGTYLIA GATGYI
 GEQFCRELASRYQATLVILARRLAEQAGALCRELEAAGAI VHYHAVDITDRDALES LWPDIKQVGTIDGVANLTRTHENR
 MIAMKSWDAFTRVIQTKVHGS IYLDLSTRKEPLDFFMLFSSLSGSGISGSSDYAYATAFQNAFARYRNKLS SRGQSRGVS I
 TQCWGPWLQDQLFPESRAQLQDAGYSLIEVDAGFAAIEASLTSSDPVVGMLGVHDERVAREFGICLSAFPQEEKPQITDR
 SDDAWDTDSLSSKISGWEQQORNGEDVTDQIAAALSPTDLEHVEPDLVERIEALLFADTAEVGARPTLASGQTEQEQADLAA
 LVRSTFSEVMRVAEVDPKTDFSSYGLDSVGAMQFATRLQKRLKQEI EPQWLIDHPTIDSFSAF LKKQQAPEPAGI

CalF (KS⁰-ACP-KS-KR-ACP-KS⁰-MT-ACP-KS-KR-MT-ACP-KS-KR)

MSTRDKRERIAARLHELAVRNQAPAQARGPEHKSINERVAARLRELSVRNGAPVATPAPTHVPETGVPSEATREPIAII GL
 SGYLPGCCSVREFWQALDREVSLIEEIPRSRFDWRACYDPEGKDPNRMATRWGGFIPNIRGFDP TFFRTVPROADYLDPRL
 RL LMSVYQTL EDAGHAPSS LKGQKGVGF IGVEDDEYQE QIKADGLPQDIDPVPSSLIANYLSYLYDFRG PSEFINTL CSS
 GAVALHRAVSALRSGEADQAVVGAANLILRPDPFIQLSRSGQMSRSATVHSFGRDAAGFLRAEGVASVLLKPLSQAERDGD
 AIYAVIRNSAVNYNGGGVSIASPNISTHAALIADCYRQAGIDPRLDYIEA QCMCNPVADIAEWGACNQALRTLAE EQHV
 SLAPGSCRISTLKP FCGHMAASALGALFKIIHALQSEHIPKILDFDQMSPDLD DPGQPCRIAQKREAWPDGSRPRLAGLH
 SYGAGGSNAHLLIEEYARRSSEVDSRSSEVDNKT VILPVSAATEAACRTKIELLLVAVEQTDAPLVAIAGTLQLGRDAMTC
 RVAFTQDREAWLRQVRSYLS TVDGESLPDGVFAGRATDEGRDKHIAQQA PAILAREWTLGAAVTWPSLKQHTRLHLP THP
 FNLVDCWYDEPSETTPQSESANQPVGEDLRKRAEHLRHLAPQLKIEAGELNLDMPFEQWGFDS ILVRLAEATLHRDHG
 FAVEAAHFFETTPRSLAAYLAEQLAEQAQPAERPCVQRRPTRVPRTVADEPIAII IGLAGTYPHAPNLETFWQN LLEG
 RDCIDEIPAERWSLDFD PDKAAQNGRSYSGKWGGFIENLYHF DPLFFGISPREAVIMNPKEPLVMQCAWHVLEDAGYSP
 DGLSDKTVGVF IGVTTRAGTDPYPGTFASMTNRI SYAFDFQGSPFIDTM CSSSLVAIHEACRHLRDGECSVALAGGVNAYV
 DPSHYAVLAAGQFLSPDGRCSRFGADANGMVPGEVGVLLKPLSRAEQDGDHIYAVIRGSATNHGGRTNGFTVPNPKAHR
 DLIRLALDRAGVDARQVSYVEAHGTTILGDPIEIRGLAQAFAYDTEDTGFC SIGSVKS NIGHLEAAAGISGITKILLQMK
 HGSLVPSLHSDSLNRQIDFPSTPFFVQDVEPWNPTDENGDPKARIACVSSFGAGGSNAHVLEAYTKLTHRLPAIGEKPH
 AIVLSARDETRLGEQAAQLLSFLGREVAAPVQSSDCEPROPLTARLCQMLADIIGVDADDIDIDEPFSDYGEPLHQEVLL
 EKTGDAFQTPALKNVLSYATVAELADALIRSNMPLFHVNCFCLOEDEPRLEDIAFTLQVGREAMSERFACVVT SKAGLTDC
 LRGLIDHPDGPFDGKTTFRGRTOAHGGQPAGAPREADGLAAVLESWVAGHWVDWHLNREHEARRISLPGYPFAREYHRMD
 DTIVATTS DAAAA TPAPMVHPSQIASRETHMLAYRPVKDAP IPSQRVTDDISRQVFLCGLPEGGPEPEVS YRHLHSDQL
 TPDARYTDLAIQLFEQIRALFEARERGRVLVQVLVPGETEDGYSGLAALLKTAHQENPRCLFQ LIELDEQALQEIPRI LRE
 DRHPEETHIRYCNQRRERLHWQEIPTFSQAPQKDESPWKNKGTYLIT GGLGALGLIFAREIAATTTGATLILTGRSRLTAT
 RREQLAKLERLGAQVRYERVDVGQRDQVEALITELRNEVSGAAKSLNGILHCAGLIRDSF ILKKTGEEFRSVLAPKVAGTA
 HLDQVTRDMALDFFALFSSGAGAFGNTGQADYAAANGFMDACAARDGHRFTAINWPLWQEGGMKMDTEAERILRRHTGATP
 LQTGN GIAALVRALSTHETRLMVVEGDPDVIRHNLSGRTAVDVKMPVSAPVAPDV DNLGEQTLDRLCQLLGSTIGLDAED
 IDAQEPLESYGIDS VLIMQLTDALEAVFGALSKTFLFYQYLNADLADFLVEAYPDGCQKWCKALSTAADGAEQGP EGCGDE
 SEVEPIQISEPASRVAHPAEADPWRNAVAIIGISARHPLADDLESFWQNLLDGRECIREIPEERWDWREAERNGNASRWGA
 FLEDCTFDPMFFKIPPREADNIDPOERLFLEASWKAMEDAGYAPSQLPDGLRRRTGVFAGITKQGFNLYSQTVDNVFPM T
 SFSSMVNRVSYQLNLQGPSIPFDTMCASSLVALHEACDYLRRGDGMALAGGVNLYLHAATYTALTGQILSSGSHCAAFG

TEGDGFVPGEAVGAVVLKRYQDAVADGDDIYAVIRGSAVNHGGKTNGYTVPNPNQAAAAIRQALDMGGIDAETVSYIEAAA
NCS PMGDAIEMTALTEVFGSAGPRAGYHIGSIKP NIGH GESASGISQLTRVLLAMRHKTLPPTVLHGELNGNIQFDQLPFA
LVREATPWTA PILAGKTAPRRAGITNVSSGGVNAHLILEEYLPKPKVDRPHGQVLFVLSARNEERLEAYMAQWLDYLKRHP
LADLAAIAYTLQVGRDAMPCLAIIVANDVETLKHGLSDKAACVHSTVAKVKGDRREAVRQASAAGDLEQLAELWVAGHTIP
WPELHCNMSRINGLPTYPFARKRCWILPPNQIKPFQEQEELMSDQEYENKAAEYYTHATRGADENFQEEYLTFAPFEKIP
GFSSSRVWLDPVKNAADHELMKSKQVEMRQVLFCSSEDFORIESLIDIGCGHGTDVIVQVAGLYPHITTHGFTITKAQAE LGN
HRIASRN LAPRARIFHKNSAVAPFPGRYDVAIGIEVTFHIRDKDALFGNIVAGLKDNGRILLMDYIANLRGQIVDHDVEVS
ILTRQNWLDLLARHRLRITELIDVSPQVANFLYDPECEENIKGLPKVTQDLWLNHANQAI ALEKGWITYCLMKFQKEPQLD
EAALRQHNLEKVTHQTPYPEALRAMLQSGHIPYPQQRLOTPEPEGASVPEPAAIDPAPAQTPASTPDRSRIRARLITIF
SRVLGFKEKREIEENDNFEDL GISS INAVELLEAINTAFDLYLPTSIVFECNDLDSLSEHVQASLPTIPSPPEVLAEVVPVE
APLRQAPVGSEPA PPRAGISIPATVPAQRAPVAEPVARPQVRER DDIAAI GIACRCAGANDKEAFWKL VSEGLDGLERVGD
RRVLDDFSSHSENEAVLRYGIMSEPDLPDLPFFHISPKEAEMMDYTQRIL LEESYKAWEDAGCAPSSLKKQSVGTYIGVTG
EQHPVSQASHLAILGADPSILAAIAFFLDLKGPA LAINTA CSSSL VAMDLAYRALQOGDIDLAI VGGITISGSIDTYASM
NNAGMISPSGTCRPFDAADGIVVG DGVG VILKRLRDAQRDHHTIYGVIRGSGTNQDGR TSGITVPSYLAQSELECAVYR
GAGINAADIQYVEAHGTATKL GDPVEVHALTHSFAQFTPKR FCAIGSLKANIGHT AAAAGVLSAIKVL LSLKHGQIPPSI
NFTSENEHIDFQNSPVVYNTELVDWPHNEHGYRLAAVSSFGYSGTNAHMLLS DVAQTAESVAPFGDNH L FVLSATSE DQLR
EQARNLLAWLQAHPCNLTDVAYS LQVGRDAMAERLGLIVSSQADLC AKLTAYLAGDEDDDALYRDRVRNDTLALFDTDE
ALQEATEKWLWSGRLGSL LALWVKGLAFDWNRLYTGRPR L ISLPTYPFKRDHYPLGGTVETQSAPRATSVPLSDAPTALQ
AVWDGFSFLPQWQEAPLA IATAAGSGTYRSILVSSGDADHLVTALGNRCRREQPDAALFRIRLGEQTRQISEHEWSCGAD
PNGLATCLEASPVF DAVFFISCD EGMENLGASECQLRLRIQRLRHQMTDLYLLTADNFRVGLGSPVA GGGGLTGLAC SIAQ
GDHRLVRNLDLAREDLRDPDQCRILADHIMDEPASERGEVFCLPHGRRYQRHFLKLNVASLPTTGLRQNGVYVIVGSGT
VGRIVTEHLMRVYQAKVIWIGRRPRQELDLNES PQPSLYVQADLTRPETMQAALQRIKQAYATIHGAIFAGLVFHLENAVD
KTSEREFKEI IDVKIAGSLNFYQTFVPEPLDFMCWFSSVQAFSFLSSGDSAGYATGITLADTLVAALQDKAPFPIGMINWG
YWQASVAGTVLEQRLKNHFETI ADEDGCRFFERFAAALRAGLFHQALYLGASPAVRQLMNCPE TETVSLAPVGAPALLHDL
ROYHNERPFAQLLKNDPWPELNTWMARLLFVQMRRL EIFSDDGLEDSETLRKRAGVIDKYARWWHECCLSILED SGYLACN
GTLVALSDSGRRMEDGETVWK TWETYQORYRDNPD LKTSVNLVDACLRLPEILRGTLQATEVIFPRSSMENVENIYKRN
LSDYFNAMVAEVVARYIRGLAEDANARIRIIEIGAGTGGTTAIVLPALMPLQEHIDEYCYTDL SKAFLMHAEQHYGPDCP
FLSODLWNVEQSPASQIGKTFDIAIATNV LHATRDRIQTLRNAKAALKHNGILVLNENIAKTMLGTLTFGLLDGWLYED
ESLRIPGCPLLTPQSWQVLAEEGWT TALLQEDAARTLGQQIIVAQNGIIRQOPEQARPESIIRPVQOSVT THESEGEFK
GNIGNIVKAAIRQSLSQSLNLP TGDIDGRIPFSDY GIDS ILGVSFINQANESLDISMNTTILFDQTTVDDL TDFILNAHGE
EIAGR LAKEGGQKEEPTLTPVPSEPV RQTRQPRATQRPVRRPAATGTDRPV RGT SI AVIGLSGQFP GAKDPAAFWQNLVEG
IDGIRELSAEYSGPDSCRWGMLED RHCFDPLFFHIAPREAEVM NVHQRLVLQESWKSLEDAGYNPRSLTNTKAGIYIGA
EPSGQINASLTGSSDAI IASRLSYHLNLKGPA MVVNTG CSSSGVAIHLACESLRSHETEMALAGGVFATMVANGLNTLADV
EMLSPTGACHTFDKTANGTVLSEGVGIVVLKRLEDAIAGDPIYGVIEGSGVNQDGASNGITAPNGAAQEALMTDVYRRFD
IDPGEISYFEAHGTGTRL GDPVEANAMVRAFTRF TDRKASCAIGSAKS YIGHTSAAAGVIGLIQILLSLKYRQLPKLLHFH
ELNPLIEFDDSPFYVNTELREWASADGKPRMAALNSFGHSGTNAHLVVREYIAAPSAPAAPGPYLI ALSARDEQRLREYAG
RLLD FVRGETPHPADLAYTLQVGRDAMEERLGLQVASLAELEDKLVAFL ETKPGSPPGD GFCRGQVRPNRETIDLLAEDED
THHTIDAWMQKRKYTPLLALWVRGLPLDWDWLYDDAARPRRIHLPTYPFARNHYGVDGEETQPGDQPAVALSAPVKPATSM
PAVADEIPPE SFGYLPRWEEAETLFDGEAAALSHRDILLVHGSSEFHFETTIRAFYQERYPQARVRQIRLADHTRHIAEDE
WLCVDADPEGLVTCLQDAPVPDALYFIASFQERSEMME TETLNQSLETNEIQLLRLIKLLRERMQPGDGLDCYLLTVDNHA
VMEASNYPYAGVSGLAYAIAQGDHRI RVRNLDLAREEMENTVEQEELPAAILAEPPSDRGEAIRLOYGTRQRRHFFRLDWN
RIEGSGLKQGGVYVIL GSGVVGQIMTRYLIREYAAHVWVWIGROPESAPVLHERLAPFREAGSEPFYIQADVT DADAMMAA

VRIRERYETINGAIFSGLVFDHENSVAQTSEADYRAILDVKTGRSLNFYNAFRSEPLDFMCWFSSIQTFSSFLSARDSCGY
ATGISFADTFVRSIEDAPFPLGIVNWGYWAASVLGSPLEERLKNHFAFIEDECGFRYFEKYTAVLRQGVROMLCLGPRATM
RELMHCNDKEIISIYESSVLLELELP

CalG (MT-ACP-KS-DH-KR-MT-ACP-KS-ACP-ACP-KS-DH-KR-ACP-KS)

MSREDIDKLINNSLWEELETWMGRLLFAQMRTMGAFENAETHDASWRAAGVLEKYARWWRECGLDILEQNGHLRPMPSGLL
AADATAASPAAVWQAWEPRLQAFLOEPEVQAAVQLVDACLRRLPEILRGTVPATEVLFPRSSMSQVEHIYRRNTLADYFNG
LVADAVSSHVEQRIAADRGTRIRLIEIGAGTGGTTAVVLPALQSRDFIETCYTDISKAFLIHAQTHFLPDYPYLERQLW
NVEEPLPDTIPSGFFDIAIATNVLHATRNIETRLRHTKAALKSGGLLILNEGIQKTTLNSLTFGLLDGWRRFEDPNLRIPG
SPLLNARNWRRVLAQEGFRNRPLPAKATRGLGQQVFVAESDGIVRRTVALTTPPTIAEAVATPVQPEEANVSVPVTPVSVAT
DAVDVRAFATDTIREALHSLKIDEAVETDIPFSDYGLDSILGVRFVDQINEGLGLSLNTAILFDYTTVDRLAGYLAEFS
DRIRLPQVTEEQTDAAPAAAMAPPTAATIPTPVAAAPVAATMVAPAPTSPVRSAAKPTAPIPVDEPDGIAVIGIAGQFPGA
SDTETFWRNLIEGRDGVSQLPEEYLDLDKLVGLDEEGNPYYQSGGFLENRNCFDPLFFSIAPREAESMNPQRLLIQESWK
ALEDAGYNPRGLDGEVGIFFIGSEPTYFYFESFTGASEAIVASRLSYHLNLRGPALVVNTGCSSSGVAVHLACESLRHES
NLALAGVSAVMKQSGNLTLAEAGMLSPTGACHTFDASNGTTLVSEGTVVVLKRLCEAIADEDPIYGVILASGMNQDGT
NGITAPNGLAQEALIRNVYRRSHIDPEQITYVEAHGTGTQLGDPVEGNALVRAFRHFTKRKHCKVGSAKAHIGHTSAAAG
VIGLIKILLSLKHRRQOPGLLHFEQLNPQIDFEDSPFLIDHRAAAWEAQGPVPLMAALNSFGHSGTNVHLVSEARVPAAPA
ATDNRAHLVAVSAADEDRLNEYVANLLAFIESATATTEKPIAKTARPSEALIRKTLAGIIHVDETEIEVEERFDEYGVGP
LHQNVLLEQLGEILDVLTYLRESSIATLAARLDAHPQPATGDLVPLHPLRLCDLAYTLQVGREAMSERVIFLVHNLAE
LQTRLKEYLQSGKTTDCWSGRVTGTRNKMQUALSMDEDTREMIARWTAKEKLNKLAELWIEGVKIDWELLRDGYARRISLPS
YPFAKEYYDAPGKTSTDNLKRDDSVSVLHPLVHRNTSNFGEQRFTSTFTGDEFFFQDHQVHGRVLPGVAYLELARVAVAL
TLDCAAVDPPQVQLKNVWARPISIENTPLDVHIALTPQEDRNGNEEVHFQIYTEPSGERRVHAEGIAVIATPDAVTLDLA
ELQRAIQQGELEDAETCYDAFRQMGEYGPGRHGLTGLRFGTFRNNGTSVEPQILAKLQLPAGQHGHYLLHPGLMDSALQA
SIGFMLEADLETDEASKPSLPFALEELAILRPCVPAPVWVTRPSPGTSFRDRVQKLDIDLFDQGRVCVRLQRFSSRTL
GDIPSEIGNKARTGLMTLSPVWNVFRPEALPLAPAERVAVIGGEAPLLDQIRSIYPKTQSLSLAGTEAPEALSARLAALGP
IDHLVWIAPSAQPDLSLADEALITDQEQGVIQVFRVLKALLASGYGEREFAWSLITTQTLAIRQDDIVNPTHAGVHGLAGSL
AKEYPHWRIRLLDLEAGRLPSASWLFSLPPHEEGDALVIRGDACFTRALVPVAEPVLDNPNTRYRKGGVYVVIIGAGGIGEV
WSRYVIEQHGHAHVFWLGRRLDQEIIRDRLASFDAKGPVPEYIQADAGDPVALQQALEQIRQRHPRIHGVIHSAIVLLDKSL
ARMDEPRFRAGLSAKIDVSVHLAQVFQKEDLDFILFFSSLQSFTRGAGQSNYAAGCTFKDAFAHGLATSWPGADKPLIRI
MNWGYWGGVGIVTDEAYRERMAQGGLSIEPDEGMAALDTLLRGQLEQLILLKTLVPEVVEAMCAPETVTIHPAAIPACID
TFRRLHPPRRNDVEQIHVSMGPDFAEMNTLYVKLLGAVLHSLGLFGNNPRLPQLYDRWFAESINILKEHDHLSGEAQSGW
TVSAELDLARWREWEHCRPTWIEAENQKAQIILVEVCLRALPDILNGRRQATDVLFPNASMELVEGIIHKGNMAADLFNEV
LEDTVVAYLEERCKQPGTEIRILEIGAGTGGTTAGLLPRLQPYRDHIREYCFDTISRALLHAETNYASQNPFLTAMFDV
SLPLEGQNTIPDRYDLVIATNVLHATANIRQTLRNTKATMHRDGLLILNELCSNSLFAHLTFGLLEGWLYEDELRI
PGC
PGLHPETWASVLEDEGFAPVFFPAESMRDLGQQVIVAPSDGIVRQAWLGQEHPIVSVPVSVLEETEAGVKTS
PDGASLREK
SAAYIKRIVASTLRMSSRLDTAQPLEAYGLDSILVHLTNAMRKHFDNITSTLFFEVQTDALVDHLLLEYQKDALVKQVG
ETPKTAAPAPTVPVAAPTKKPVIKARSRLAPAPSAPVQEQAPPVPPGPPGAHGVCDVAIIIGLSGRYPKAKNVDEFWQRLKE
GTNCIEEIPADRWDWKRYHSDEKGVHGKVSRWGGFIDEHDFDPLFFQISPREARLMDPQERIIFLETAHACIEDAGYTPA
TVADERRRVGVYGVMMNSTYAPQPNFATISNRISYVDFHGPSMSLDTACSSSLTAIHLALESYAGTSDCALAGGVHLNL
HPIHYQGLCEVRMLSSDGRCKSFSEDADGFVPEGSGVVLLKPLDQAIADGDHIYAVIKGSTINAGGKTNGYTPVNPNAQY
RLIADTLERAGVDARTVGYIEAHGTGTSGLDPIEISALNRAFOQSPHHKVGETYCAIGSVKSNLGHCESAAGIAGLTKVLL
QMKHAQLVPSLHAQQLNSRIDFEATPFTVQRTLAEWPRPELNLDGVTQQIPRRAGVSSFGAGGANAHVLLEEFVSQKEPAS

AETERVHLIVLSARKEDRLKEMVGNLHHFLVSASQRSQPLSMASLAF^TLQIGREAMDERLALLARTPEELEAKLQRLLEQW
 AAGEPEEVEDFFRGSVPGGPGSQDDNALS^VFAADEELQEAIEKWIQRGKYARLLEVWVKGLSFDWFRLYEDASRPLPKCMS
 LPTYPFARDRYWMNGGDWVPALEDEGSSMGPRAVNLGVWQQAAPAGHEAEPAQAATPPTPVVPSPPAPVVVKPADPLPSG
 KPEGLVLLTSLSDIKPLGPEKVQPATPLVPAASAPAPARETLQHELTASLADALFMQVDDISLDKPFIE^{MGLDS}IIGVEW
 IQTINATYELSLPATRLYDSPNIRELADFLHEQLQDGSQPTAVVPPNVEPVAVLAKPRISLTP^TDMATAAPQEPPRPEGEP
 AVAKPAVAVEQPPFEPQEPEQTLRDRPLEILRVEVRDMLAEALFMQGEVDIDTPFIAM^GLDSIIGVEWMQSINERYGLEL
 QATRIYDFPTICEFAAFLOQVCPLPPADVPIPAVVAITATVPQETSADSVLEVDVATPVLAREAPLPVKAKATVSHTEPQ
 PSVSAPPAVARPQGGKRQREASPO^{EPIAI}IIGMSGRYPGAADLDQFWQNLTRGVDSVVEVPASRWNVADFYDPDPTKPGGIY
 CKWLGVLD^DVD^CDF^DPL^FFMISPAEAE^GID^{PQHRL}FLQEGWRAFEDAGLN^RDALGNTRCGVYL^GIMSNEYAYLVSKNPDDVS
 VSGNSFAIAAAARIAYALNLKGAIPIDTA^{CSSSL}VATHLACQALANREIDMALVGGVSLYL^GPEPYLGMCASGMLSPEGKC
 KTFDNSADGFVPGEGVGT^VVLKRLAEAEADGDRIEAVIIGSGINQDGKTNGITAPSTSSQIALEREVYRRNRIDSQSIGYV
 ETH^GTGT^KLGDP^IELEALATVFNETQPPGDHCAIGSVK^TNL^GHTSAAAGVASIHKVVLCRLERSLVP^SLHFK^EANAHLDLE
 NSPFYVNT^EFKPWEGGATLRRAAISSFGSGTNAHVVIEEYPQPAAVPQSDAPALTLVPLSAKDGDRLLEMADRL^LHYLQA
 GSEAVPVQPVRRDRVARALEERIGAMLSQILHVRE^QIDNEQDFIEYGVDP^IHQARLCDMVEKAFSVELDGR^EFMQKDSV
 TAI^VNDLLIDRVAVNAAVSGDEVERARPVRRPRELRLADLAHSLQNGRETMEERVAFIASSPAELIQLLREFIAQNGQPHS
 GSRIFRGSIRDYREVL^GIGSLEDLNAIVDLRIERRDLARLAGYWT^CGVALDWNRLFGGSRPQPLSLPTY^PFAKERYWAVA
 DSQPVETQGPVTGVLHPLLHRNTSNLEAQRFT^TTLTGREFFLED^{HVVRIDGLPAAHILPGVA}HLEMAWA^AVAHTLDATEPF
 RLANIVWLRPLIVNDTCDVHIRLFPENTDLASPLGFEIYEEVEGERI^IYSQGRVLRDRQPSSSDVKGSNAIDL^PALRADLS
 QRVYSGDECYRAFEAMGISYGPAQRALATVYS^DARSVLAELNLPDIIVGSAATYTLHPSLLDVALQASIALFLEDGEGTGE
 PPRAVGLPFALDEVAMLADTRPAWARIQPAQSDGELQRLD^VDLLDEEGRVCIRLKGFTSRTAAKPVAAELVCTR^VWQGET
 AAGEHAAYTAHL^LFVAEPLRLTAHACGWS^DNI^SVHTLASRETAPAQRYRALAGQVFAAVKPLLQDMPGGRVLVQ^LIFPATE
 EARLLRGLGALLKTAQLENPGLVGQVIEVAPDEQDL^PARLRECSRV^PQTEIRYRAGRREATLWEERSDSGSVSCPWQDRG
 VYLIT^{GGLGGLG}LVFARDIAERTEGAVLVLVGRSPLEADRRKQ^LAAIETLGARTVYRQVDISQAEAVDALVREIQ^TAFGGL
 NGILHSAGVHRDNFIINKSEAEF^DAVFAPKVAGTVNLDEATR^HLELDVFL^FSSSAGAAGSLGQADYAAANGFMDAYAAQR
 NECLRARGNHASRTLSINWPLWKEGGMQ^LDPQTEQRLWQETGMAAMETEAGIRALERGLATGQDQVMVLAGD^THLRRTLA
 GAAAE^PATAPTLVTAVAPANPPSEALPKRALAWFRQLSSVLKIPVERI^LGDEPFENY^{GIDS}IIVVKLSTGLEEV^FGPISK
 TIFFEYGNLKEITAYFLENHGEALQRL^LVEPPVLKPKQNLPAQKPSAPPERLPERL^PDI^AVI^IGLSGRYPCSRDLDAFWK
 NLSEGRDCITEIPEDRW^NWRDYTTADREEPGAHSRWGGFIEDADK^FDSLFFNISPNEARFL^DPQERL^FLEHVWAAMEDAG
 YRRQDL^LLAHEQ^RASQVG^VYAGV^MYGEYQFYGVEASLHGKRMGFAGTLAGIANRVSYVFN^LHG^SMTVETM^{CSSSL}TS^LHLA
 CQDLKYGVTDMAVAGGVNLSVHPNKYLM^LSSGQFISSHGRCESFEGGDGYIPGEGVGVA^ILKRLADAERDHDHIYGVIRG
 SAINHGK^TNGYSVPNPRAQ^QMAVTGALDCAGIDPRRISYIEAH^GTGT^RLGDP^IEITGLTWAFREHTPDTQFCRIGSAKSN
^IGHCEAAAGIAGFTK^VLLQLKHGYIVPSLSQVLNPNIDFATTPFIVNQE^LCPWERPVVDGETVARTAGISSFGAGGSNAH
 ILVEEYRESVREAPPGPYAIVISAKTEDRLQAIATNL^LHFLDKNPSVAMADVAYTLQVGREAL^TERLAFTVSDCDDMQERL
 RAFLAGPDAADGFVRGRVRRDREPP^EWSEMGADL^FDAIDHRRYAGLLDLWVQGLD^VDNRLWPEQPF^RISLPTYPFAGQH
 YWAERPSVEVKQTVAVNGFHSQPDND^AFEQFHSALLDRLSSEEIAID^DALQIIRGR

CalH (ECH-ECH-ACP-ACP-KS-ACP-C-A-PCP-KS-DH-KR-ACP-KS⁰)

MHEAIEEVYRKVAEKALSKAEALTLLKALRLKTAADVQGDRPVRLAKPENITLLDPASVPIIYPLAGPRKVHTLNPLHQAS
 SRETAVTLDDQGDGVFVIRARLQAGFGESVGDGLARCFEVINQOPQARVAILLGGAFLADLQODETAADPSLACNVPIAV
 MQGDAIGPALRYAARCDMLCSEEGRHAGETSAPERDLLVDRFGEHLADILGTVGTPPTGRMLRKEGAGFPILAKTEVEG
 HAFELAGELASSSRQALTLLKQHFRARPRLETSAGPRD^TQALLASLAHQ^SASVSDAPVTVTIDS^DVVNMAVYPDGVVLVT
 LHDROGKNAFSPGIAAGLFDVFERIRTPDYKVLVLTGYDHYFASGGTKAGLIGIQOQTTRYTDAP^IYKLILHCEIPVIAA

MQGHGIGAGWAMGYCDLPIFAEESVYSSRFMYGFTPGFGSTLIFPHRFGMDLGREILFTARDYKGRELKSRGLTMPVLP
RRAVLAHALDTAHRMALSPRETLVQDKDRNRSLRRLDDVVARELVMEQTFVGSGETLRRIEAEYGTGLVKDDRSSRPV
AETAAPDPSHEADMLEEVVQTLRTSLAEELGMERDMVDETIPLTELGLDSITGVTWVRRINRHYGLDIATARLYDFSNLNA
FARFVMEEGLQNGLFRTTSARPLAPATSPLAPARSRPVATPEPTLETSSVAILEETSETLRTMLAEELGMEPERVEDHAPL
TELGLDSITGVTWVRRINRHYDMDISAAKIYDHATLAFAQFVAEEGMRATTQTAPPTPKAAADVPTROQVAEPTPAETA
LRDAHRGTRVAAPQPI SMTPQEAARDVAVVGMSGRFPMADDIDQFWQNLLEGRHCIGEIPADRWQDYVPSPGGEEQMAGI
RWGGFIDGIDQFDPLCFGISPRDARFMDPQORL LLLFTRMALDHAGLTPADLQEDSTGVFIAAAPGNIAHIAAAAAAEKP
LELTSMAPSVIPNRISYVFNLRGPSECYETVCASAFVALHHAHQAIRSCEQAVVGGIHL LLSPMQFNSVASMGYLSPDG
RSRPFQEDASGFARSEGVGVII LRAFEKAKKDNNTIYALVRGTGVAHGGRLSLTSPSETGMKTAMTQAYRAAGTDPRTVA
YIEAHGTATPLGDGIEMEALKAGYREVAETCTQTQAEPTPCTISSLKPCIGHSEIASGMAALIKVIMAMRHEVLPGLPNFT
RLHEHVS LANSFPFHISPDNATWTP LQDETGWVLP RRASLNSYFGGVNAHVLEAYGDTSAVREDGSDPHVILLSAGSDEQ
LLKLAGNLHGELTRNREMDLTNLSYTLQLGREAMAYRLALLASSIDEVIRQLERYLTSPEVQLLERHRIYIGHLANGSGDR
LPRYIRKMYDRNQVEAKIQOREWDDLAMLWIGGIDIPWATLYRGQGVRRIALPGHPFDLQRYWIETPETAVPAVVIQAPAP
SEVPEPAEPSRQNPASPEEALVALIADLVLPQEIERDRPLQYLGWDSVLTLMQVRLDERFAVTL SNRELLEHDTVASL
VALLAEKLPLAPDAAVTQASAECSAETQPTPAVSALPTPPISFPLSEGQRLWLLQKGHPHMIAYNP IALGINEPIDED
LLRQACARMLRKHPALQTTFTITGDDGRPMQFYDSHKPLFFERRTMPSONEAEERLELLKATFKQPFHLDGDPLMRVHLFSAS
ENDHILLITLHHIIFDGTSM LFTTGDLLSAYQALREGRTPDSEDSGSYAEFVTWEQEQLESEGDNL LAWKERLSDFLPL
LELTPDKPRARHRSFAGASFIAHLSAEQSDALRQLAKSRGVSMFVAMLAIYKVMLFRHTHQEDLIVGTPTSGRPERRFDRT
VG YFINTITLRSTLDGERIFAEYLEQLKWLVAESLDHAVYFPRLVSELGITPSATHAPIYQTTFLQNF SVRAQEAFAA
RFPQWSSVNGLKQEGEDDLALHVFEKDACSLGFSYNPDLFHGETIERMAAHYIRLVEGVCRDPQOPIGSYDLLSETEK RK
LFVSWNDSAENFGEISCLHDLFAQKVRQRPDQVALAMMRGSE RDTLTFRQLADHVSL LASFLRTQGIGPDRLVPICFRRSF
DMVIAILATLEAGGAYVPMDDPHPEERIGYMVRDTSASLVLTSAELYEHVRGCGVETIALDRDQDMIRTNAGQAASAGVRP
DN LAYVIYTSGSTGNPKGV MVEHRQILNTLHFLEARYPLQERDAYLLKNTNYTFDVSLSSELFGWFI GNHVLVILPPGDEKSP
ERL TEVIEQHRITHLNFAPSALNAFIKVAQNRS AFLDACSLKYL MVAGEAFPKDLVAQSVATFPQARVENIYGPTEASIYG
SYFSCSGREIHSVNLPIGIPVNSRLYIVDEALRPVPIGVPGELCLSGAGLARGYLNRP ELTREKFVPNPFVNSGANPGDD
TG DYARLYRTGDLTRWLADGNVEYMGRI DHQIKVRGRMESGEIETQLDRHPMVRESVVVPREQTGQLACYYLPANPVQPP
APETLRQHLRAITLPDYMVP AFFIPLQDIPLSSSGKVNRKELMAREIVLDHSEPOAS PAPAQTL SREAITTIVLELWRTVLQ
IDNIALDDAFFEVGGDSLNAVILA EKIQERLGCDFTAALLLQYPKVA AVADYIADLTGADHGDVAVVKSTPEAIELTEERS
VELFDTRPASATVSVWSPQSDAGETEMPPDQADDGVAIIGISCLFPGAQDHQEFWNNMGLGNECGIRHTEAELRAARVPE
ALIRDPHFIPLOMGIEDRELF DHEFFNLSSRDALFMDPOFRLLLOHSWQAVEDAGYVAADIRETSVYMSASTTLYQTMLHN
AELVCPQDRYVSWILSQSGTIPTRISYHLGLTGPSMFVHTNCSSSLTGLHAAFQSIRNGDATYALVGGATVSPTPSLGYFH
QPGLNFGDGLCKTFDADADGMVGEGVAVVLLKRAREAIADGDPIYAILRGIAINNDGADKAGYAPS VSGQAAVINKVL
QSTGIDPESIGYIEAHGTGTLKGDPIEVAALSEIYRGYTDKKQFCGLGSVKTNIGHLD TASGLAGCIKVALSLHHGELPPS
LNYRRPNPAIDFANS PFYVVDQLTKWRREETPRRAALSSFGIGGTNVHAI FEEHVGRPDSDRRFLPVDEEQGQFLVLSAQ
NEERLKEMARNLHQFVLVPYGFRLVDLAYTLQVGRAAMEERVA FVVGNRRELIGALEAFLAGEPGAFQRGSTGSSATSTVF
SAEDLAGMLQKWRDRRLDKVATLWLQGSTVDWKQLYEVRPRRMSLPTYPFAKERFHVERPVKKQLHVLHPLVHENVSTLR
QOQYRSTFNGTEFFLADHVVRGQKLLPGAVYLEMARDAVVRAHGDVAEAGIQLRNIVWLRPFAVEDGENPIHISLEPGESG
DGVRF EYSEADSDEALVHCRGIAALAGQETD ATLDLAGLREQCDRMQVDAAH CYNMFRRVDVDYGP AFRTIEQLFTGDRQ
VLAQLTLPETPYPADGFMLHPSMLDGALQACIGLKLFPQDTTAQAADAPVRFSLPFALQTL EISRRCTDOMWAWIRHAEGT
TADDRMRKLDIDLCEQGRVCIRIRGFSSRVVAASENTPENMPEQSSLSQTLLFEPCWQAREAGDESSLFPQNRHVLLC
DPTQEHEDLRNHVDATVLT LRSGRPEMRYDDLAI RVFEEIRSLLDWTDGYTFVQVLLPSPFLSGLGGLLSAHAEQPRLV
GQLIELEGHETA AVLARYLATNTRRPEDTTVRYRAGRREVL SWEEQSTSEKOPPIPKNNGVWLITGGAGGLGMIFAEDIA

RKSDHPTLYLIGRSPATPVHQEKVATLEALGARVAYRQVDVCDAAAVQELVAEIGREQGTLDGVLHCAGIVKDSFILKKSAN
 NTFRDVLAPKVTGTLNLDTRATRELDPELFLVLCSSGVGALGSPGQADYAAANAFMNAFAEERQTHCPDRKTLVSGWPLWQDG
 GMRVTPAHERTMAESVGIRPMSTEKGLVALYRGLASFLPQVLVLEGLAERLRSFLKPATLVRETPTARPSSGISEAALAA
 ATLDLVSGVLADTTTRSAREKIRPEMSFEQLGVDSILQMSVIEALEKVTGELPKTLLFEYPNLNELVDHLIAAYAEPLOQRAF
 GPVAAVEAPAEKPPKALEPPVTSVDDQSATNGRFRFRQPDQKPVETEEKGDQQTGIAIIGISGRYPQSPNLEALWQHLLAG
 DNCITQADDFRWHHSLSTALGELGDDSPRYGGFLDDTDRFDHHLFGIPEEQVLNLSPELRLFLETTWLTTFEDAGYSRAALQ
 AFQEANETGVGVFAGIMYHQYAWSIPSPSTAVLSSNVSEWHIPNRTSHFFNLTGPSLAVNSACSSSSSAIHMACESLHQGT
 CSMAIAGGVNLTLDRSKYALLEKSRMLDSGDRSRSFNGSGYIPGEGVGTVLLKPLARAVSDGDHIAVIRGSAFHNSGGR
 QMYTAPDPKQQTQVIVDSLRRAAIDPATIGYVESAAANGSGLGDPLEVLALKKAFAAATDRRHFCALGSVKSNLGHLEAASG
 ISQLSKVLLQLRHRTLVPPTINAEPRNPKISLDGSIFYLQERCEDWPMHDPQSGPLPRRGMINSFAGAGSYTNLIIEEYV
 PTAPKPQSAPASPRDQLFLFAAASASGLAVYLKFRDFLDLSHLTADLGAVSAALWHRDHSLAHRVAIAAGSLSELAQKLAL
 VGAVPRTLPESDIYASHDAVAVSDVPNIRGDLQRHELVLQASCWAAGESLDLAPLYHDARAIELPAYAFDHSIVFKHGSVD
 PDMDYYDLAEKITNGELSEEQFEQLITG

Call (DH*-ACP-KS-ACP-C-A-PCP-TE)

MNLKSLYQQVRDDQIDHHEFARRMKRLKALYDQQKRVSSKALRQAFPGETYVFNEPYLRDHTIEGKQVLIGVTHASLAIDA
 FFRIHPQETAVHQLQRLNFVQPIEVAANQRAEVRIEPTPGPDVIEFQAVYRYAANETWQPSANGKLKKTALAFKSIDVAQLR
 EGLTPFADLDQLYAAGEPAFGVGDSYRVIRQLDCGEETALARVSLDPSPDHHLLNPLITYSAFTALMPLLQHSGLGGAF
 PFGIKDLYFARMEPLTDCLVFVRLVKNSGEIILFDVDVDDQNRQVAHYAGCSIKRLRQLQPQPKASATLPRTAAVRPEAS
 ETAANLESRIREHVRHQLADAVGIPAGTLAVDANLMDVGMASLTQVELAADLEREAKIELDPTLFFEYPNIRELAAYFAKE
 HQVAFQRLLGSENSASVTPAARAEVPAPTIDHRPAGEAASKAPGSPAAKAEASAPIPDRRPAKVFTSSDDGALAVIGMHGL
 FAGATDLDSFWEQLRDGRNLITEVPADHWDVDAWYDPSPGTADKTYCRWGSFIDVGGFDRDFNFNSEREQWMDPQVRLL
 LHTIYATAEDAGLINEIRGSNTGVFAGICFDDYASEIAALGLPISPYTLTSSSEGAANRVSFQFDLKGPSLVFNNTACSSSL
 SALHAARLALKNGECGMAFVAGANLVLSQHYRYFSALGSLSQGRCSSFDEAADGYVSGESVAAILLKPLAQAVADGDRI
 HAVIKGSAALHAGYTPSFTAPGVAGQENVLVKAWEDAGIDPESLSYIEAHGIGTRLGDSIEIASLKKAFSRFTTKNFCAV
 GTLKAHIGHTEGAAGIAGVLKVILQMKHREIPGLSHFNELNRYIRLDGSPFYTNREPTSWAVDAGPRRAGVSAGYSGTYA
 HVVLEEYVAPPGSRLQATASPEMIVLSARDETGLRASATQLLAFIERQTTMTGETAEQPHRAVRQHWAERLRAILAEELLQV
 DAAEIERDVCLEDYGVAPVFYAQLAERLARFDVELAPADFLDLKTPALIAKRLSQMADNSEPDTDLDGLNLADLAYTLQV
 GREAMPERLGLIAYSIDEVKQKLGHFLSASPCDGLFVDRADRHQETLALFADDEEMTGVDVTFARHRYAKLLALWVKGFA
 LDWFRFHAASGLNPRRIGLPTYPAKDRYWHPALKERQPAQSOAETPQVAVERTQEEQAAVWRFSAATANNETDQAHPE
 PRAKAELLLRQLVAIQLGQPIERIEAGHGYLEVGLDSRGLVALVQGVSHLLQENFSPGLLFEHTTIDAFADYLADQHGDRL
 RGLVATRQHREETEGESHLAAPRERLPLSEGQOGLWILQKVAPDMSAYNCQLCFRATLDVSRFEQACHLLLQHLPIILTTIC
 GEDCDGLPYQALRPKAVLELNHAVLAAGDEALELLRVSGRQPFDMAQGLFRVTLFRTDTAETVVLFTVHHLLIFDQSSFALL
 LNTLHRIYQTLVAGQQPVVEPPAITYQDYVAERQLLAGDAGARRLAYWRLQLENIPPRLEIPGDHPCCTAATFTGSTHTV
 RIPVEDSQIRAFANDHAVFLSTVFLSVFKGLLYCYSGRDDIIVGMPVNERTPAYRDVIGYFINMVPIRSRELDRTFAAS
 LKKCQVTMVDMSANSYPPALVRELKLPISDDAPVFQVAYEYQNFIPINNRDSDPDHPTLPLNIVEGLHQAGGYDLDL
 VYDRHDGFELNLKYKANLFGADTIANMMRHYQTFDAVLANPELHPDEINLLSPAEEQALHQTNWNTTESDESERICHAFF
 EQQAAATPDATAIVFNGASMSYAELEQRSRALACYLQQRGVGPEVRVGLCLERSFEMIIGLLGTLRAGGAYVPLDPDYPAE
 RLAYLVADAAPLLTLTVSRLADHLPASDAAHILLLDREAELLRAESDNTLIRSVGPGNLVYVLYTSGSTGRPKGVMLEHRA
 LVNRMRMWQAQYGLTAQDRILQKTPFSFDVSGWEFHWPLMVGATLVMAAPEKHKEPAYLKTIIREERITMLHFVPSMLQAF
 LAADGVAARTGLRKVFCSGEALDPSLKTRFFALFPRQELHNLGYPTAAIDVSYHHCLKQETTVPIGRPIANIQLDITNKR
 GRPVPSGIAGELCIAGIGLARGYLNRPDLTAERFVASPSEPTDGADAVGGTRMYRTGDLARRLPNGEIEYLGRIDNQVKIR

GLRIEPGEIEGTLQRQSGIREAVVEVREINGEKQLVAFYVTHGNQPLDHGSLRDALRSHLPSYMIPLSVFSALDSMPLTASG
KTDRLALATRPVALQSNRAFRPPRTETETKLAGIWQFVLGQVRIGVDDHFFELGGHSLGLQLLTKIDRIFGRNLPSTLL
EAPHLSELAARIEQPDMAEPEPFYLLPLQTNGARRPLYFVHGAGGNSLNYIPLSRALGQDQPLFVFQPPXLNGEQEPLNAI
EALAAFYVDQLLGQDLLEDFELGGWSIGGVIAYEMACRLEAMNKTVSRLIILVDSYLPEHFQRFSELLTNQGFSPSLLPNGN
DTSETELFRMLLKELGCDRVPDLQQGGEVDTFDLLLLHHPEIRQVLNMEPDTIRKLLKVQVRNQEAFKNYTAGRTFSGEVLY
FYATHRDLNQGDDDLVVAEAGLRTCLQDETRIIEWEYLNPNSTLHFFPIDSSHYAMIQEPHVSHIASEIHRMSEVMKNGIVT
N

CalJ (Unknown)

MGTVIQDMPPINPGRQPRWDRFERADRFEQYRELRTQGSSERQAAKELKVPRTTLQAWRAGHDTLDIGPHVAKFLQSGPGL
AFLHRLVIAFHRVCVEIGACGIRLVGLFLNLTGLNCFVAASSGAQQQVNRVVEEAMVDYRETETARLAQEMPRKDI TVTQD
ETCTGGLCLVTMDPESHCIILEQLAQTRDQHVHDLMAPALAQHGRVISTSEEAPGLLAYVEHYLEAHHSPLFQVQHE
LVKAVSGPIATKERAHKAHVTEAQEQLAQVQTHLQSTGDEPEKRGPGRPPEVPSLEQAEQALETAWREHERFAGQRPQVO
ANIRSIGHNYHFVDLERGVRRNGQLIASDIQGHIEQIRITIAQHEGLSQNCLERIEKAERVVPKMQATTDFVSSYVNPQVPD
LGLTPPVSFAMHAQLIPSYDLDRVAQTRTVEGGEPIRELAERLRAPWCERGGILSDLSPETRDQLHGEAKRLAAVFQRSSS
NVEGRNGYLSLRNHPLRGLDLPRKRECFTAIHNNFLTRPDGTTAAERFFGQKPRSMALAILDSVQLAPAPLRPPRKA

CalK (Transposase)

MCFSDINPLSETCPMDTPNAIDHMFYFAKVEDPRRPHATRLHSLEAILLITILGTICGAHNWVEIEQWQSSRAWLCEFL
HLPHGIPSHDTFGRVFALLDPESLHQAFVAMWSALAQLGQEIIMALDGKTIIRSLDRADGKGIHVVSASWASRNELVLAQFK
VDAKSNKITALPELLALLNLEGNVVTIDAMGCQVEIARQIIDQGGYVLSLKENQPNLYEDCVALFTWLKGPHTLDEKIVL
GADEQVDGGHGRVETRQVWCTSGLDGVVSCERWPLGRSLVMVEAPRHIGGQDEVEQRYSISSLPATDTDATRLNGVIRTH
WEIENRVHWVLDVAMAEDSNRTRKGEAQNLALIRKLALNLLRRETSVQTGLAAQKQKAGWDHNYLLKILAQT

CalL (Phosphoprotein phosphatase)

MQARSTTPPEGFDIRVCERELPAATKSVVFAKKPLPLAKRKPRRIVIGDTGCRVFTYKTMVDVQNCNGVEGYGPAWPFPK
IATAVAAARPDLIIHLGDYHYRETPCPKGNKGCAGSPSGFTWPSWEADFFAPARDLLTRAPWVFIGRNHESCARAWLGWFY
LLDPNPLPANPWQASQCPAISDPYPISLESLLQVQDSSGVHYSPKGHEASVALYTKVYNEVNKMVSASSENWSLTHEPIW
GIQPGATPQGTVLYPLQLTLQAALKKTSIGRFDPRIGFLLSGHVHLFESFNFTDGRPPMMVIGNSGTRSPSITNKVLEGS
KILQTLGVAPADFI SEDDFNYALAEAFGDGWEISLYKLNGDVSKKFVLKNKMMVSKSQLK

CalM (Phosphotransferase)

MNKQGEVIMLNGAHCAGKTTLAREVQKLAERPILATGYDYDLWMLALKYVGLDPEIRVDGWPGDPGLPQTQAGFEILREG
EGENATFRMMCGEIGWNVMYGMRRSFAAMANAGNDLVLGEVNTEIMLKDYCNAFKDLERVYMGVFCPLEELERREDVMPH
RRVGCARMQIDQVHMPGAYDFTVDTGKDDAEECARQVLNFVDNPPVVFQQLVERYGEIEEVNQFPVQWW

CalN (Hypothetical protein)

MPTTAGIDDIFRRRESLTVSEPRLCWDVSTVGSNVAQALAKSHPAVLSICEAIKEKGLPHPVRRGSMKNDFVVRPSGHGRA
FYIDLNTLGQDESTKNPEGCIAIKGSEAVATDFVPWMHRLRGHRMYWTFRAFHTLPLQLDTEINNLDWRVPVLERKVPGLT
QAEATNESSIAFEYQKAHLKRYGEFAHLPIPLLVYAWPDEVCAVRSDLLPLLSKRGADIVEHTLESIGIGIYVYFYPTVPT
RLLAEVDKYEGPGLTLDKDLQYIERMSTIKSGGLDVQRIIEGWTKVLVQMMAVGYLPKDPGSLLTADCMQPNVNCVDGGWV
DLDSVVPIESLLDEKEISDVVRRSVRALAINICYLMVGKAALSTGIRDRFVEIDWLMNEVSRRILEDREGRGVDDRLRKV

FATSGLYPGLDRLFSLAY

CalO (Glyoxalase)

MHLTYQHGHFMWHELITTDPGGAAAFYAHVVGWQTN SYYPAGSSTPYTTWLDERGPLGALLSLDDEAHESGISPHWFANVM
VWNLDVCLARVIESGGKLLSGPEAMGTVGRWAAIQDPQGIKLAVFAAKDPLEARHPAKHGGVTWNELMSTNHRAAFEFYCS
IFDWQVLRVTVNP GASDEYIVYGAYDEPLGGMFTRPSDHPLPIGWVYYIQVSELEVARARAEQGAQIVTLAVEIPGRGRTA
QIIDPQGASVALREAVAREDPKDLVT

CalP (Phosphotransferase)

MIKEGEIIIIINGTSCSGKTTLAREIQGAARKPYISTGHDDFLPMFPGRYVGIEKTVQPEIATWPEPGNALSSMGFEVILTR
PGDPPEFNFSCGPVGNM LAGMHRAFATMARAGNNLVIADVISEVPMYDYCAALKEIKTVYILIGIQCPLELERREATHAN
RTVGGARMQLKKINHPGDYDFTVDTGRDSPEACARQVLDYIDNNLPRAFAKLVERYGDFEVKQFPVALW

CalQ (Phosphotransferase)

MFPTQVGELSIVWLNQTLTDQENRQGARVVDFSTEPLADQGRTSAVYLLTLTYDQLTEMP TKLVLFAMDQDFVKDALQDQ
NVFEREVTFYRRFGDGAGIPVPRCYAAAYDAEKNACVLLLEYIENAHQPDFHGSVAEVDIAVEHLAPFHARWWQRQEELA
GIPCEYDRPDQHVQNVTRALEKIPEEHRDDVGRTVIEVLELWLKHSQIVVHCARGPLTLCHGSFHRQQLLCPTAENDPFR
VIDWQSATIDCGPIDLARLLVTGLLPAARRAHETRLVERYHALLVENG VADYPLEQVWQHYRLGIVRVLVLHIQVFAHFNV
KLMLEHWGRVAEEQSLWKVLFQWPEQALMEHAVPELLRQIARETPTIEAEEQG

CalR (ECH)

MVDLSEIEPGIVLLQMQDRIHKNAFTDDMTLALLNAFDTIAHHD RYKV VLTGFDSYFSTGGDQASLLRLHEGRGHFATTN
LYSLALNCRIPVISAMQGHGIGGGFVIGLFADVILSRESVYTTNFMRYGFTPGMGATYIVPLKLG TALGHEMLFLARNYR
GEELKQRGAPFTVLPRAEVLPEAMKMSRQLAEKPRVSLMTLKDHLVADQRRKLPDIIRSEVAMHEQTFHQDEVKQNILSLF
GK

CalS (ECH)

MGNLNVAFHTIRFRTDAGIAYLQFDRPEANNTINDLLVAECRQALADHGE GIRVLVLEGLPEVFCFGADFQAIHGASSEPO
LDNETQSADVLYDLWTDLATGPYVTIAHVRGKANAGGIGFVAACDIVLADERAVFSLSELLFGLFPACVLPFLIRRIGMQK
AHYMTLMTAPIPVEEAHRWGLV DAYAADSADLLRRHLLRLRLSKSGIRRYKQYRASIDAF LTASKMKAVAGNREVFSDPE
NLETIACFVETGQFPWERRHDASGG

CalT (HCS)

MTTPAGIELMNF FGGLAYLDVRKLAEHRELDTTTRFENLLMKQKAVAMPYEDPITLGINAAKPIIDRMSEA EKDRIELLVTC
TESAFDFGKSLSTYMH DYLG LNRNCR LFELKNACYSGVAGLQMACNFILSQTSPGARALVIATDL SRF AVETETQDIEGLK
GEWSFSEPSGGSGAVAMLVSEQPYVFRIDPGASGYGYEVM DACRPM PDGADADLSLLSYLDCCENAFLEYQKR VADSD
YATTFGYLAFHAPFGGMVKG AHRKMMRTMVKAQPPEI EADF KRRVMPSLTYCQRVGNILGATTALSLVSTIDNADFESPQR
IGCFSYSGGCCSEFFSGVATQEGQALLASFEMERQLDERYELDMEEYDMLLRGNAAVRFGTSNVILDPDLLPGVRQV LERS
NRLYLKEIRDYHRIYEWAT

CalU (ABC-transporter)

MKNGRVTSLLYCRSALPGRERWDVANLRGKPFLAQQLESELHCRMGIIEVKANAMTGRILLVFDQQVLNNTAELLREVIDH

FVARIDEKLLLEARHADPKNRQDFEHQDNESILDLIRSVESSTLRWKATGLTSLSTIFSLTPPITLGLIMATAVSGGLPFL
 SGLGLSQLGQIGLLSGVFGANMANTFSEYHAKMAWQQYASTIEHELVRKAYSHVQHLD MAYLDHESSGQILSVIHDDSVK
 IREFLGQLPDSVIDRLTTFFVLGGLFLIYISPVSFLLSLVPLPVMMFIYRRYHKQIAKRYMEQGEKQQAMRKLLSNNLSGMP
 TIKGFSREDYEQQRLMDSSSELQHSTTAAAFADAMRYADITKFAMVAGLGLPIIYAGSLMIMGKISVTVFMLQSFIMPKMIG
 AMGGLDHDYDLYQSSTAASKRLSQLSVQPKIRNGAQHIDLASVHGDLRFEEISFSYPGANELFENFHLHIPARSSVALVG
 TTGSGKSTLTRLLRFYEINGGRVLLDEMDICDLDFNDLRQVIGLVSQDVFLFHGTIYENIHYGRLDATMEEVMAAAKMAE
 ALHFIEALPDGFDITVGERGQMLSGGQRQRISIRVILKNPPILILDEATSSVDNETEAAIQHSISLLAKDRSTIVIAHRL
 STVRHLDQLYLIDHGQVIEAGTHEQLLEMDKTYAALWKLQMGERPEAQGLPTLASVHP

CalV (Hypothetical protein)

MQENGEQVVKNGVKIVDELLEPGTSLLLDGKIRPGMAHSAVGLLAGVALGVPGAMLVAAANALAQSVTGAGLIANLTNNSPK
 NPRDVNLAERVAVDVAEGMTYEEIREDILEDIEDLYHEATADKTPHQKDAV

CalW (K^{S0})

MINSLPSELVLSGLGVTSAGQGKTAFSAALMRGDHAFRVMQRHGRQRGDSAFGLGAEIGDLSIPDTLSKRLLQAATFSGKL
 ALVTLAEAWEEAHLEGVDPQRIGLVIGGSNVQOREQQQTQENYANRLHFLHPNYALNFLDSDLCGLCSEQFGVKGFAYTLG
 GASASGQAALIQAEEAVLANRVDVGIAMGAMMDLSFWECAGFRTL GAMGSDRYGQQPALACRPF DANRDGFIYGESCGVVV
 VEKAHSARERHLTPYAALAGWAMGMDGNRGNPSLEGEIHVIQTALAQAGLTPLDIDYVNPHTGSLIGDETERQAI AACG
 LGHAFINATKSITGHGLSSAGTVELIATLLQMRNARLHPSRNLETPIDPSLNWVREQALDHRMISALKLSLGGFGGINTAVC
 ISEL

CalX (ACP)

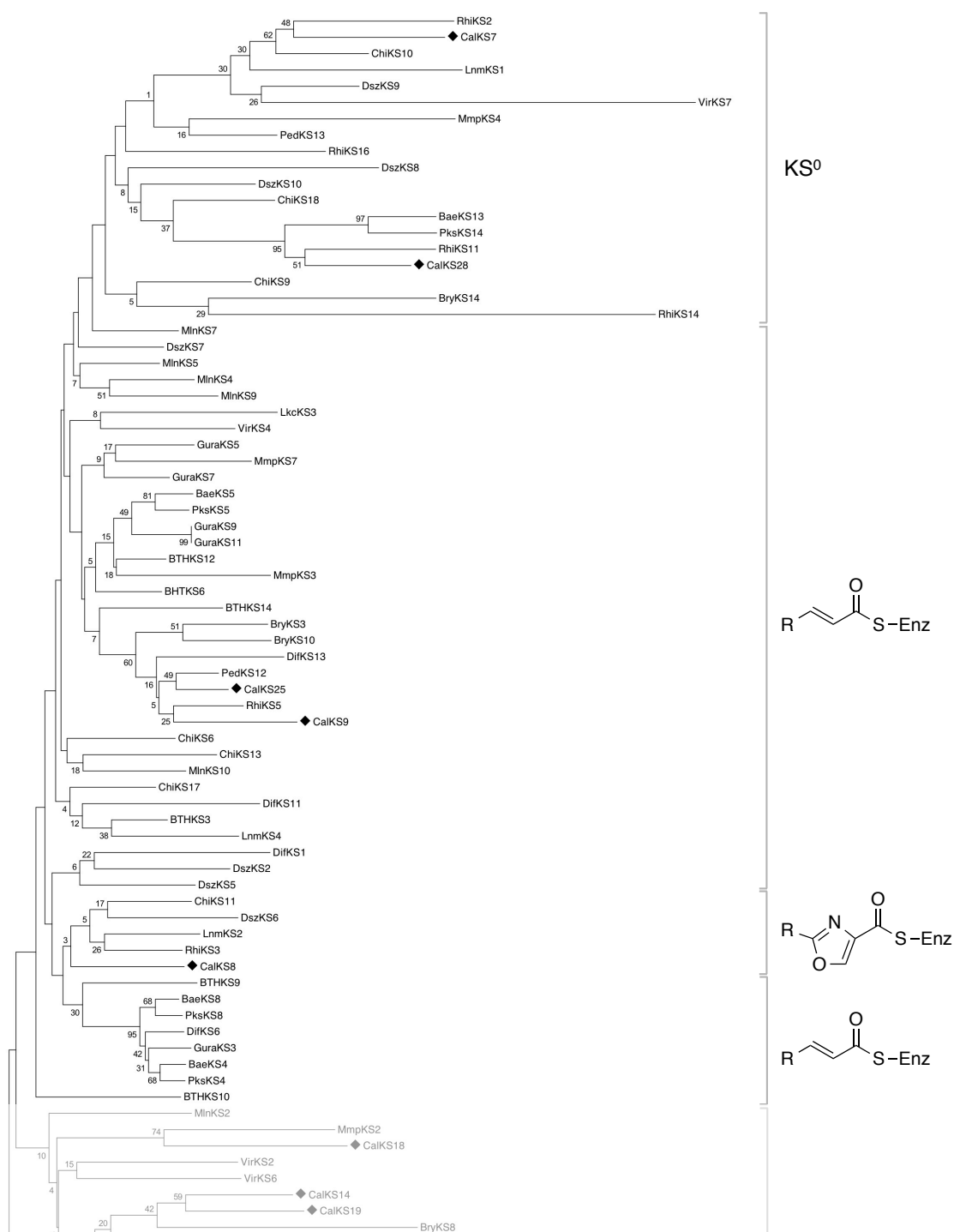
MDNEAIFKLIVDHTREILPELQDYPFORADSLKDLGANSIDRSEILMMTLEAINLKMPAVEFHGPENIGELTDMIYDKLVT
 V

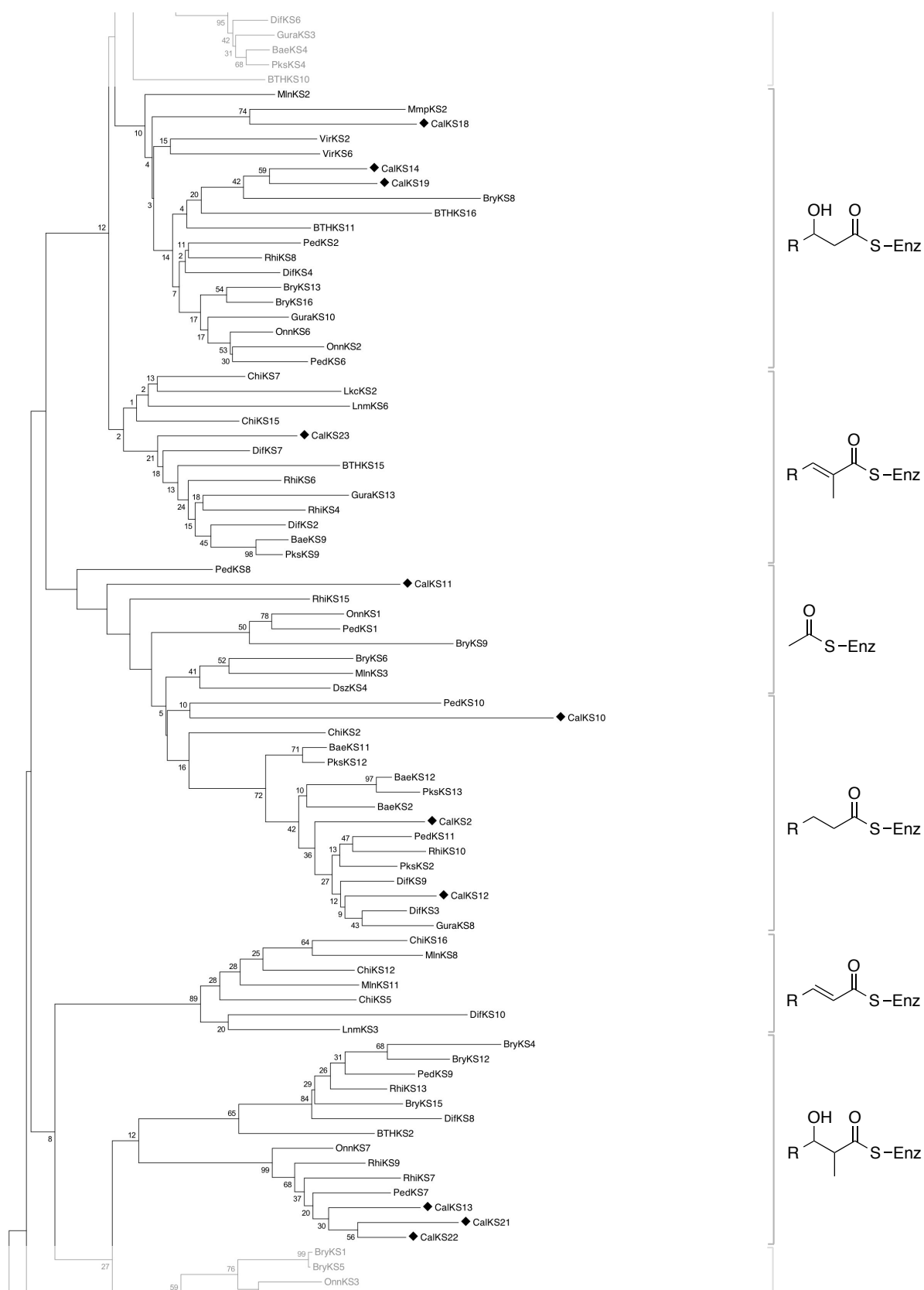
CalY (AT)

MKILLFPGQGSQRKGMGKALFDAFPELTQRANDLLGYSIQELCLEPLNQLGQTQFTQPAIYVVNCLSYLEQTRAEPKSDY
 VLGHVGEYSALFVAGIIDFETGLSMVQKRGALMSEAHGGGMAAVLGLDETKVSDILKAEFLVNLSIANFNNSPHQLVISGP
 KSDVEKAEPFFIEGGARHYRVLDVSGAFHTRFMAEAGMQFAEFVRDVHLGEMTIPIISNV TARPYRKDQMRRAHIIDQITTP
 VRWSESIRYLLAKGATDQDFVELGGSGVGVVKALALQTSREAGPLEPAVLWAEQQESRVHAEKQAKKRARAEPHGDWEQP
 VTAPVPMAQDLSAYPDFTADSLGCASFKAANLKYAYLAGAMYQGISSAEMVIRMARSGLLAFFGTAGLPLAQVEDSIRTI
 QSALTGEGYGVNLVADLEHPEQNEAMIDLFIRCNPVIVEASAFMQITPGLVRYRATGLARQPGEIRRAHRVIAKVTRPET
 ALVFLNPAPERVVNNLLACGAITPEQADLLGNLPMADALIVAADSGWQTDEGMPYAVVPTLRRLRDEVOHQHDDTQKVYIG
 AAGGIGTAESAAAIFILGTDFILTG SINQCTVEAGTSEATKDLLQNMNIQD TDYAPFGDV FELGMRAQVLKRGVFFPARAN
 KLYSLYRHCNSLDELDP TTAEQIQKRYFKRDF TAVFKEVQNRLSAAEIEKAERDPKYKMGLVFRWYFDYATQLALSGASDS
 RVDYQIHTGPALGAFNQVKGTDLEDWRNRHVDRIAEKIMTEAAEFLNQRFRLMAHQD

Fig. S1 Calyculin 推定生成酵素 CalA-CalY のアミノ酸配列

Phylogenetic tree





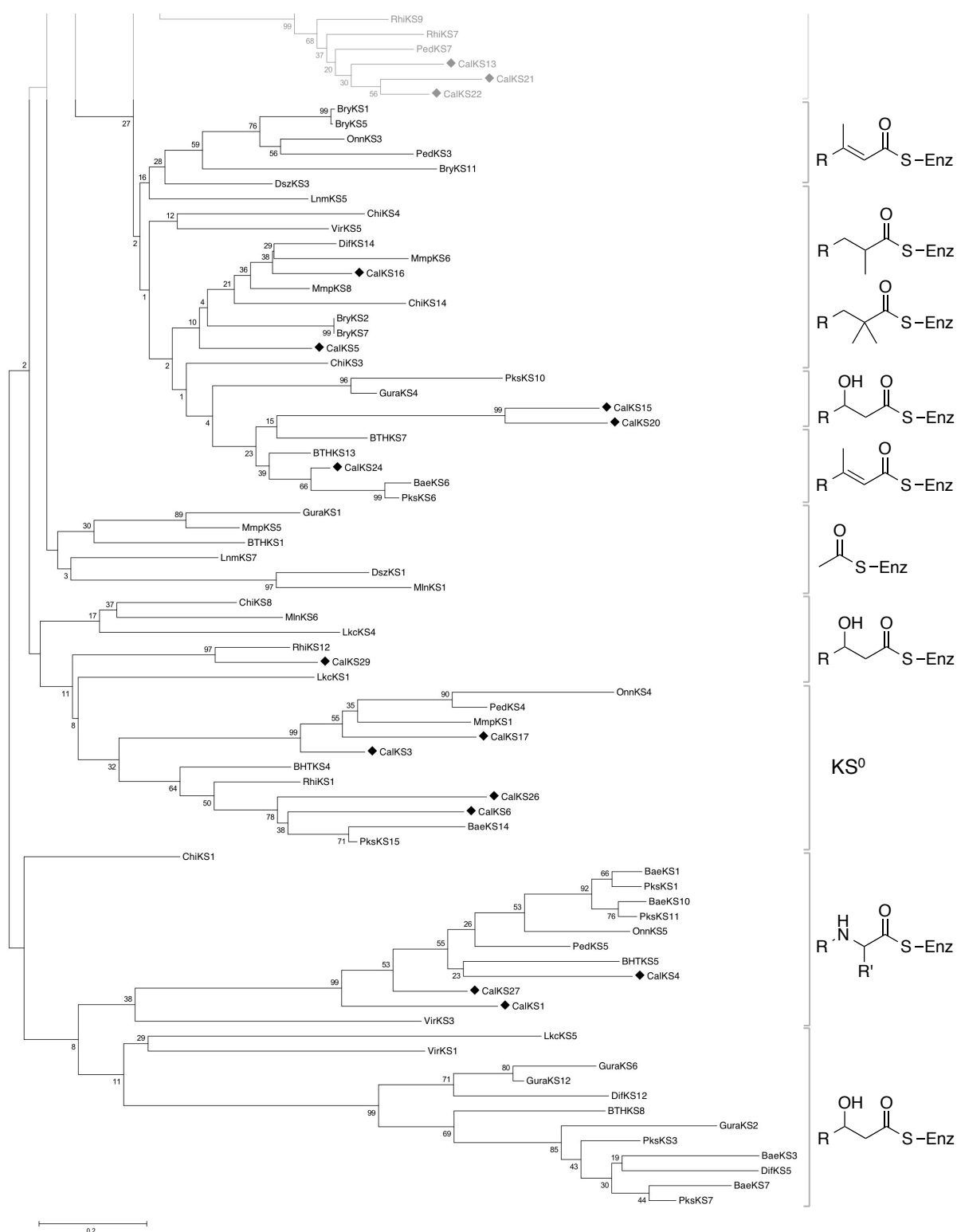


Fig. S2 Cal KS ドメインの系統樹解析

Bae; bacillaene, Bry; bryostatin, BTH; *Burkholderia thailandensis* polyketide, Chi; chivosazol, Cor; coralopyronin A, Dif; difficidin, Dsz; disorazol, Gura; *Geobacter uraniumreducens* polyketide, Lkc; lankacidin, Lnm; leinamycin, Mln; macrolactin, Mmp; mupirocin, Onn; onnamide, Ped; pederin, Rhi; rhizoxin, Sor; sorangicin, Ta; myxovirescin, Vir; virginiamycin

Spectrum data

Table S1 ^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR data for phosphocalyculin A in CD_3OD

position	^{13}C	^1H	^{31}P
	ppm (mult, J in Hz)	ppm (mult, J in Hz)	ppm (mult, J in Hz)
1	116.8	—	—
2	94.0	5.27 (1H, s)	—
3	157.9	—	—
4	128.1	6.76 (1H, d, 14.7)	—
5	134.0	7.13 (1H, dd, 11.3, 14.7)	—
6	124.1	6.36 (1H, d, 11.3)	—
7	144.5	—	—
8	135.4	—	—
9	131.2	5.97 (1H, d, 10.0)	—
10	35.7	2.73 (1H, ddq, 2.3, 10.0, 7.2)	—
11	77.6	3.39 (1H, dd, 2.3, 9.6)	—
12	43.4	1.53 (1H, m)	—
13	70.4	3.77 (1H, m)	—
14a	34.9	1.43 (1H, dd, 10.2, 13.0)	—
14b	—	1.65 (1H, m)	—
15	78.6	3.67 (1H, m)	—
16	84.3 (d, 7.2) ^a	4.09 (1H, ddd, 1.7 ^c , 4.2, 9.6)	—
17	84.6 (d, 6.0) ^b	4.52 (1H, dd, 4.2, 10.8 ^d)	—
18	50.4	—	—
19	108.4	—	—
20a	29.2	1.61 (1H, m)	—
20b	—	1.89 (1H, m)	—
21	71.0	3.87 (1H, m)	—
22	37.6	1.65 (1H, m)	—
23	67.3	4.45 (1H, dt, 11.9, 2.5)	—
24a	36.0	2.09 (1H, m)	—
24b	—	2.51 (1H, m)	—
25	136.5	6.97 (1H, ddd, 5.1, 10.2, 16.2)	—
26	114.5	6.33 (1H, d, 16.2)	—
27	133.6	—	—
28	136.5	8.00 (1H, s)	—
29	170.6	—	—
30	29.6	3.64 (1H, m)	—
31a	32.0	1.89 (1H, m)	—
31b	—	2.23 (1H, m)	—

32a	35.8	3.14 (1H, m)	—
32b	—	3.55 (1H, m)	—
33	173.9	—	—
34	72.6	4.04 (1H, d, 8.2)	—
35	68.8	4.35 (1H, dd, 2.3, 8.2)	—
36	65.8	3.72 (1H, m)	—
37a	66.1	3.88 (1H, m)	—
37b	—	3.91 (1H, m)	—
38	58.0	3.42 (3H, s)	—
39	39.9	2.93 (3H, s)	—
40	41.9	2.95 (3H, s)	—
41	17.2	1.35 (3H, d, 7.4)	—
42	9.6	0.91 (3H, d, 7.4)	—
43	21.6	0.97 (3H, s)	—
44	16.8	1.26 (3H, s)	—
45	59.5	3.55 (3H, s)	—
46	10.6	0.69 (3H, d, 6.8)	—
47	17.4	1.03 (3H, d, 7.2)	—
48	13.0	1.86 (3H, s)	—
49	13.7	2.01 (3H, s)	—
50	18.0	2.09 (3H, s)	—
P1	—	—	-11.42 (d, 16.0) ^e
P2	—	—	-10.41 (d, 16.0) ^e

^a, ³ $J_{C,P}$, ^b, ² $J_{C,P}$, ^c, ⁴ $J_{H,P}$, ^d, ³ $J_{H,P}$, ^e, ² $J_{P,P}$

Table S2 ¹H, ¹³C and ³¹P NMR data for calyculin A in CD₃OD

position	¹³ C	¹ H	³¹ P
	ppm (mult, <i>J</i> in Hz)	ppm (mult, <i>J</i> in Hz)	ppm (mult, <i>J</i> in Hz)
1	117.0	-	-
2	94.1	5.27 (1H, s)	-
3	157.4	-	-
4	128.2	6.76 (1H, d, 14.7)	-
5	134.0	7.13 (1H, dd, 11.3, 14.7)	-
6	124.1	6.37 (1H, d, 11.3)	-
7	144.4	-	-
8	136.0	-	-
9	131.0	5.99 (1H, d, 9.6)	-
10	35.9	2.78 (1H, ddq, 2.8, 9.6, 6.8)	-
11	78.0	3.39 (1H, m)	-
12	42.8	1.61 (1H, m)	-
13	70.7	3.97 (1H, m)	-
14a	34.2	1.50 (1H, ddd, 1.7, 9.6, 14.7)	-
14b	-	1.66 (1H, m)	-
15	78.4	3.74 (1H, t, 9.6)	-
16	84.0	4.14 (1H, ddd, 1.7 ^c , 4.5, 9.6)	-
17	84.2	4.40 (1H, dd, 4.5, 9.6 ^d)	-
18	50.2	-	-
19	108.4	-	-
20a	29.3	1.60 (1H, m)	-
20b	-	1.83 (1H, m)	-
21	70.8	3.87 (1H, m)	-
22	37.3	1.65 (1H, m)	-
23	67.1	4.42 (1H, m)	-
24a	36.0	2.10 (1H, m)	-
24b	-	2.44 (1H, m)	-
25	131.4	6.65 (1H, ddd, 4.5, 9.6, 15.9)	-
26	117.9	6.26 (1H, d, 16.4)	-
27	137.7	-	-
28	135.0	7.75 (1H, s)	-
29	169.1	-	-
30	30.8	3.14 (1H, q, 7.4)	-
31a	33.6	1.82 (1H, m)	-
31b	-	2.04 (1H, m)	-
32a	36.2	3.23 (1H, m)	-
32b	-	3.37 (1H, m)	-

33	173.6	-	-
34	72.2	3.98 (1H, m)	-
35	68.8	4.32 (1H, dd, 1.7, 6.8)	-
36	65.8	3.58 (1H, m)	-
37a	65.7	3.86 (1H, m)	-
37b	-	3.88 (1H, m)	-
38	58.1	3.41 (3H, s)	-
39	40.2	2.89 (3H, s)	-
40	40.4	2.89 (3H, s)	-
41	17.3	1.33 (3H, d, 6.8)	-
42	9.5	0.90 (3H, d, 7.4)	-
43	21.4	0.98 (3H, s)	-
44	16.7	1.21 (3H, s)	-
45	59.5	3.55 (3H, s)	-
46	10.3	0.73 (3H, d, 6.8)	-
47	17.3	1.04 (3H, d, 6.8)	-
48	13.0	1.88 (3H, s)	-
49	13.6	2.03 (3H, s)	-
50	18.0	2.09 (3H, s)	-
P1	-	-	-1.10 (s)
P2	-	-	-

a, ³*J*_{C,P}, *b*, ²*J*_{C,P}, *c*, ⁴*J*_{H,P}, *d*, ³*J*_{H,P}

Table S3 ^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR data for phosphocalyculin C in CD_3OD

position	^{13}C	^1H	^{31}P
	ppm (mult, J in Hz)	ppm (mult, J in Hz)	ppm (mult, J in Hz)
1	117.0	-	-
2	94.1	5.27 (1H, s)	-
3	157.4	-	-
4	128.2	6.75 (1H, d, 15.3)	-
5	133.9	7.12 (1H, dd, 10.8, 15.3)	-
6	124.1	6.34 (1H, d, 11.3)	-
7	144.5	-	-
8	135.5	-	-
9	131.0	6.02 (1H, d, 9.6)	-
10	35.8	2.73 (1H, ddq, 2.3, 9.6, 7.4)	-
11	77.5	3.35 (1H, dd, 2.3, 9.6)	-
12	43.6	1.56 (1H, m)	-
13	70.2	3.73 (1H, m)	-
14a	35.0	1.39 (1H, m)	-
14b	-	1.52 (1H, m)	-
15	78.7	3.64 (1H, m)	-
16	84.4 (d, 6.0) ^a	4.07 (1H, ddd, 1.9 ^c , 4.8, 9.1)	-
17	84.6 (d, 6.0) ^b	4.52 (1H, dd, 4.8, 10.2 ^d)	-
18	50.4	-	-
19	108.5	-	-
20a	29.4	1.59 (1H, m)	-
20b	-	1.88 (1H, m)	-
21	70.9	3.90 (1H, m)	-
22	37.7	1.64 (1H, m)	-
23	67.8	4.42 (1H, dt, 11.9, 2.3)	-
24a	35.9	2.05 (1H, m)	-
24b	-	2.52 (1H, m)	-
25	137.1	7.05 (1H, ddd, 4.5, 10.8, 16.2)	-
26	113.6	6.28 (1H, d, 16.2)	-
27	133.6	-	-
28	135.9	7.93 (1H, s)	-
29	171.0	-	-
30	29.1	3.60 (1H, m)	-
31a	38.2	1.73 (1H, m)	-
31b	-	2.22 (1H, m)	-
32	41.9	4.14 (1H, m)	-
32Me	20.6	1.12 (3H, d, 6.8)	-

33	174.3	-	-
34	72.0	4.00 (1H, d, 8.8)	-
35	69.9	4.46 (1H, dd, 2.3, 8.8)	-
36	65.7	3.93 (1H, m)	-
37a	65.8	3.96 (1H, m)	-
37b	-	3.97 (1H, m)	-
38	58.0	3.42 (3H, s)	-
39	39.2	2.96 (3H, s)	-
40	43.2	2.90 (3H, s)	-
41	16.4	1.33 (3H, d, 6.8)	-
42	9.6	0.91 (3H, d, 6.8)	-
43	21.8	0.96 (3H, s)	-
44	16.8	1.26 (3H, s)	-
45	59.7	3.53 (3H, s)	-
46	10.4	0.72 (3H, d, 7.4)	-
47	17.3	1.03 (3H, d, 7.4)	-
48	13.0	1.85 (3H, s)	-
49	13.7	2.02 (3H, s)	-
50	18.1	2.09 (3H, s)	-
P1	-	-	-10.47 (d, 16.1) ^e
P2	-	-	-10.74 (d, 16.1) ^e

^a, ³ $J_{C,P}$, ^b, ² $J_{C,P}$, ^c, ⁴ $J_{H,P}$, ^d, ³ $J_{H,P}$, ^e, ² $J_{P,P}$

Table S4 ^1H , ^{13}C and ^{31}P NMR data for calyculin C in CD_3OD

position	^{13}C	^1H	^{31}P
	ppm (mult, J in Hz)	ppm (mult, J in Hz)	ppm (mult, J in Hz)
1	116.9	-	-
2	94.1	5.27 (1H, s)	-
3	157.3	-	-
4	128.1	6.75 (1H, d, 15.3)	-
5	134.6	7.12 (1H, dd, 10.8, 15.3)	-
6	123.8	6.34 (1H, d, 11.3)	-
7	144.6	-	-
8	133.9	-	-
9	131.4	6.02 (1H, d, 9.6)	-
10	33.6	2.73 (1H, ddq, 2.3, 9.6, 7.4)	-
11	79.7	3.35 (1H, dd, 2.3, 9.6)	-
12	42.3	1.56 (1H, m)	-
13	73.2	3.73 (1H, m)	-
14a	36.4	1.39 (1H, m)	-
14b	-	1.52 (1H, m)	-
15	78.0	3.64 (1H, m)	-
16	84.21 (d, 6.0) ^a	4.07 (1H, ddd, 1.9 ^c , 4.8, 9.1)	-
17	82.5 (d, 6.0) ^b	4.52 (1H, dd, 4.8, 10.2 ^d)	-
18	50.3	-	-
19	108.5	-	-
20a	29.4	1.59 (1H, m)	-
20b	-	1.88 (1H, m)	-
21	71.2	3.90 (1H, m)	-
22	37.5	1.64 (1H, m)	-
23	67.1	4.42 (1H, dt, 11.9, 2.3)	-
24a	35.8	2.05 (1H, m)	-
24b	-	2.52 (1H, m)	-
25	132.3	7.05 (1H, ddd, 4.5, 10.8, 16.2)	-
26	116.6	6.28 (1H, d, 16.2)	-
27	137.6	-	-
28	135.3	7.93 (1H, s)	-
29	169.7	-	-
30	29.8	3.60 (1H, m)	-
31a	37.9	1.73 (1H, m)	-
31b	-	2.22 (1H, m)	-
32	41.5	4.14 (1H, m)	-
32Me	20.1	1.12 (3H, d, 6.8)	-

33	174.9	-	-
34	70.2	4.00 (1H, d, 8.8)	-
35	71.9	4.46 (1H, dd, 2.3, 8.8)	-
36	65.0	3.93 (1H, m)	-
37a	64.7	3.96 (1H, m)	-
37b	-	3.97 (1H, m)	-
38	58.0	3.42 (3H, s)	-
39	39.6	2.96 (3H, s)	-
40	42.9	2.90 (3H, s)	-
41	17.2	1.33 (3H, d, 6.8)	-
42	9.7	0.91 (3H, d, 6.8)	-
43	21.4	0.96 (3H, s)	-
44	16.8	1.26 (3H, s)	-
45	59.8	3.53 (3H, s)	-
46	11.1	0.72 (3H, d, 7.4)	-
47	17.4	1.03 (3H, d, 7.4)	-
48	12.1	1.85 (3H, s)	-
49	13.6	2.02 (3H, s)	-
50	18.0	2.09 (3H, s)	-
P1	-	-	-0.62 (s)
P2	-	-	-

a, ³*J*_{C,P}, *b*, ²*J*_{C,P}, *c*, ⁴*J*_{H,P}, *d*, ³*J*_{H,P}

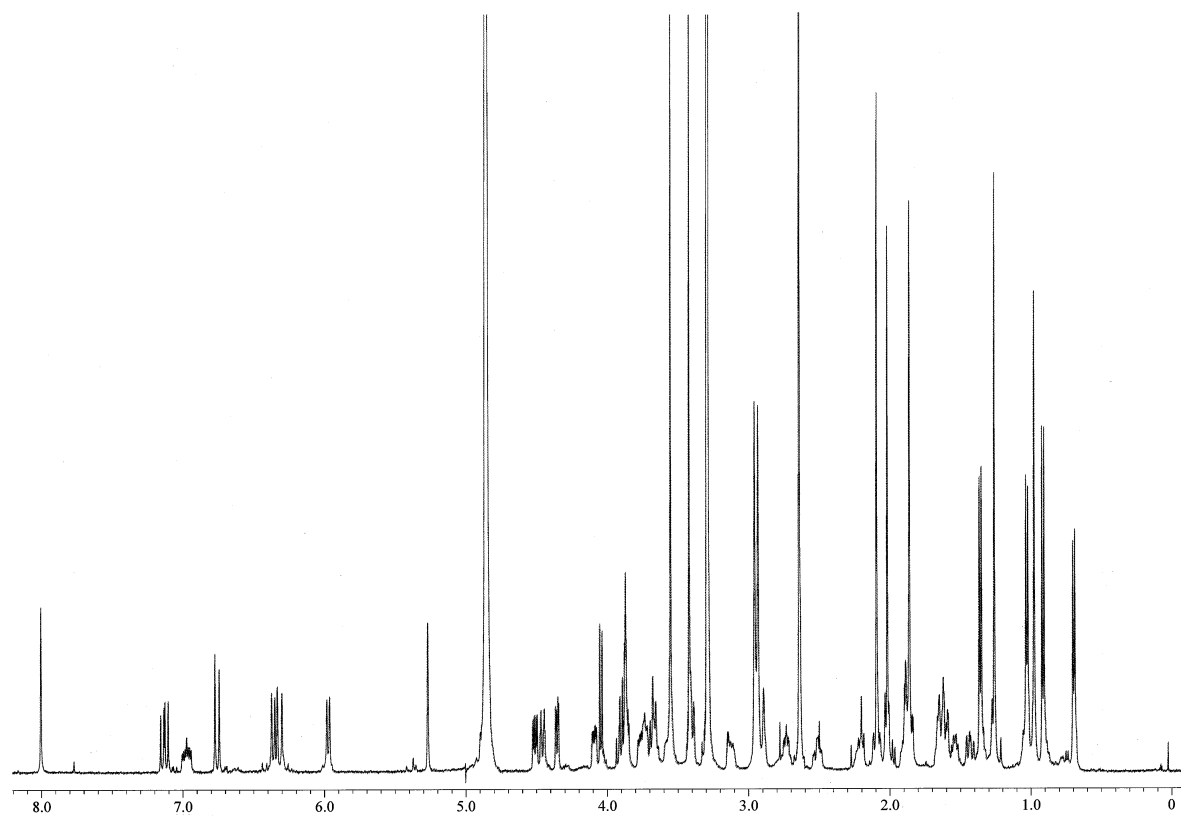


Fig. S3 ^1H -NMR spectrum of phosphocalyculin A in CD_3OD

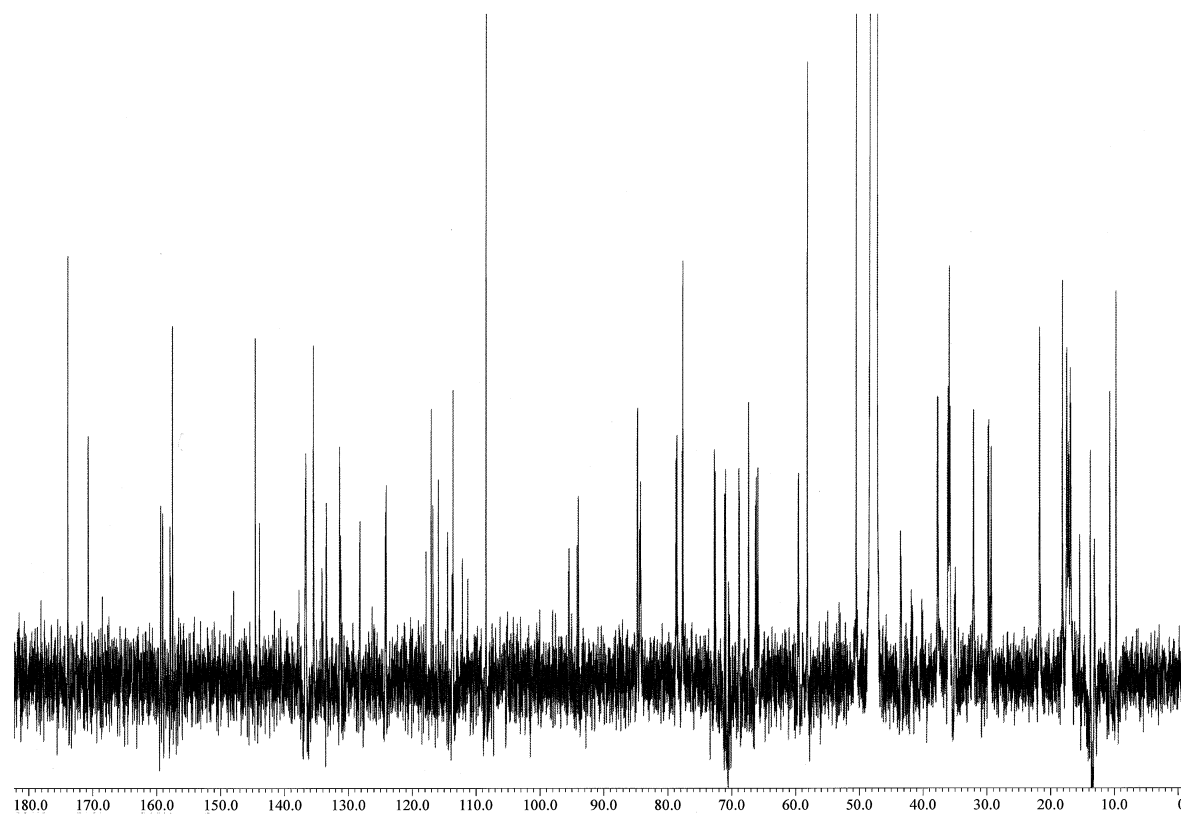


Fig. S4 ^{13}C -NMR spectrum of phosphocalyculin A in CD_3OD

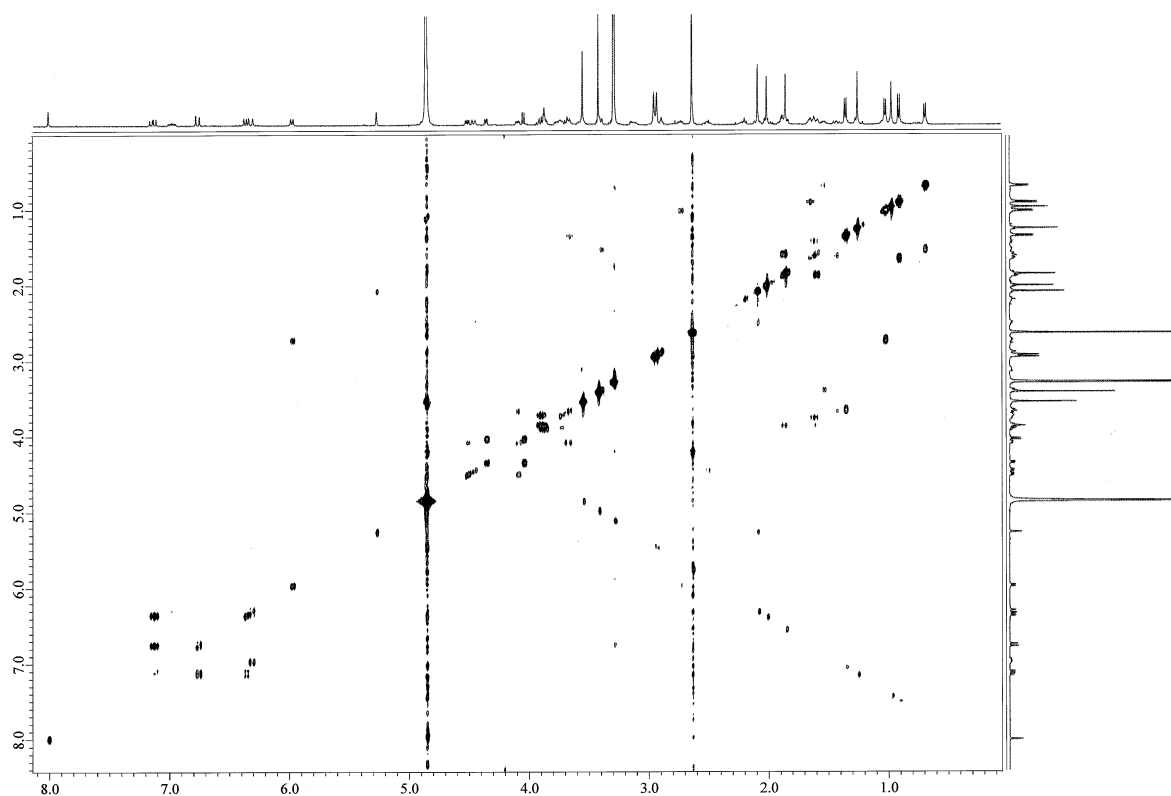


Fig. S5 COSY spectrum of phosphocalyculin A in CD₃OD

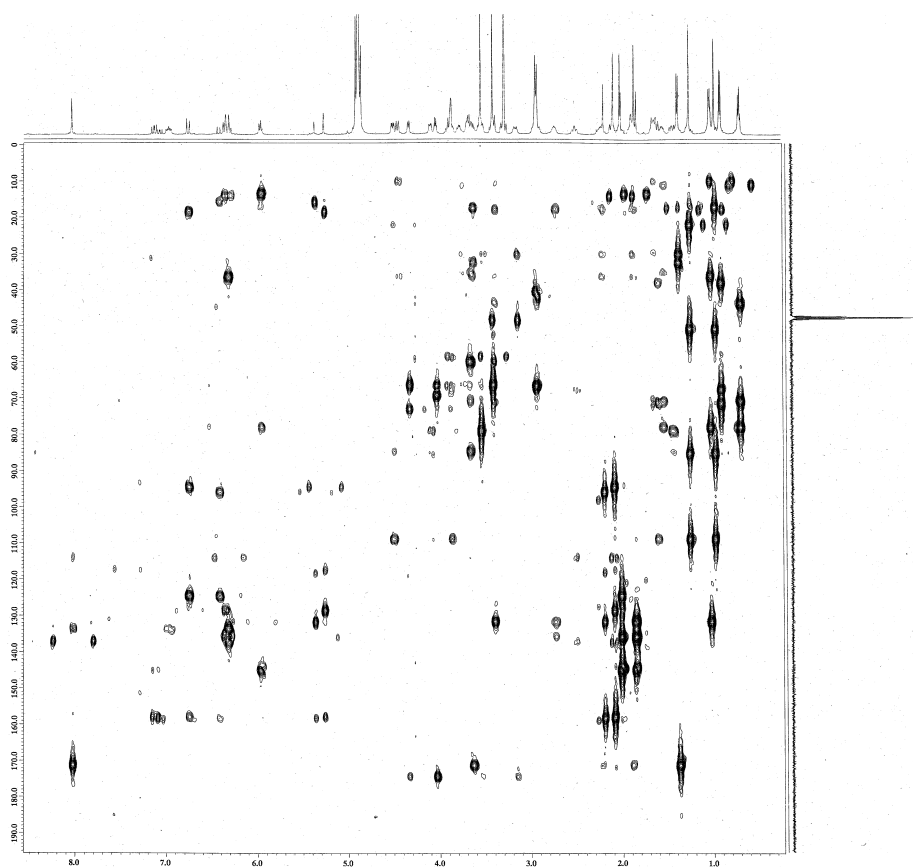


Fig. S6 HMBC spectrum of phosphocalyculin A in CD₃OD

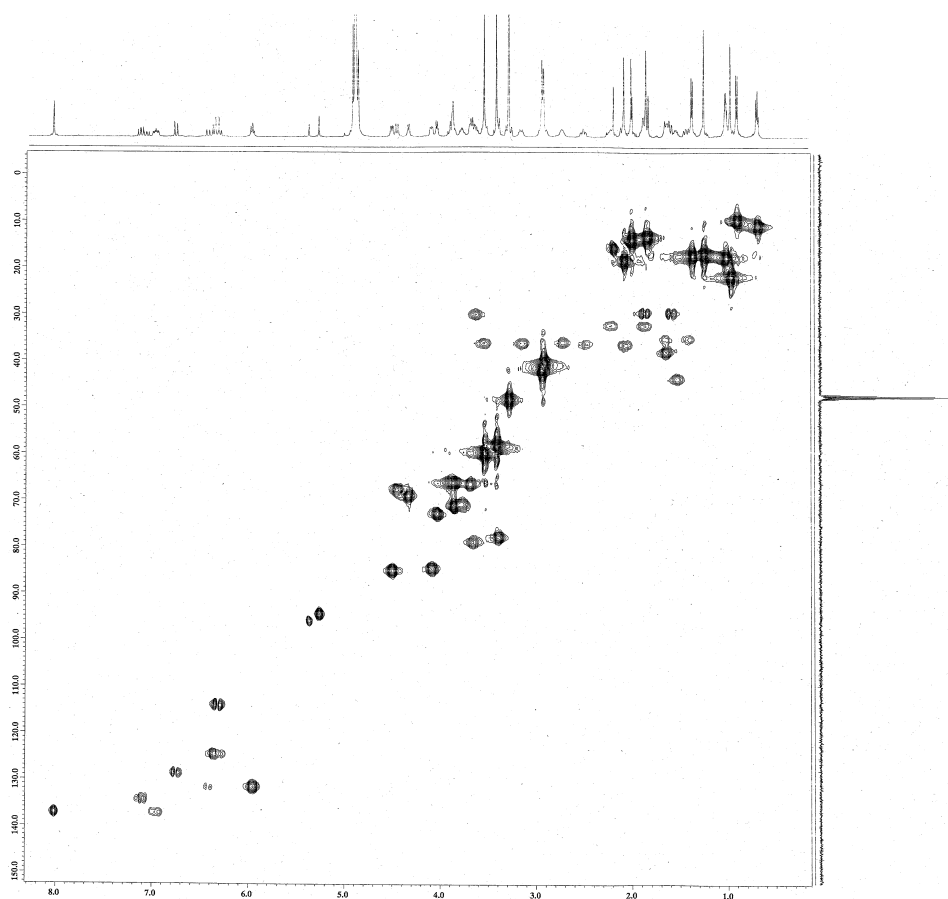


Fig. S7 HMQC spectrum of phosphocalyculin A in CD_3OD

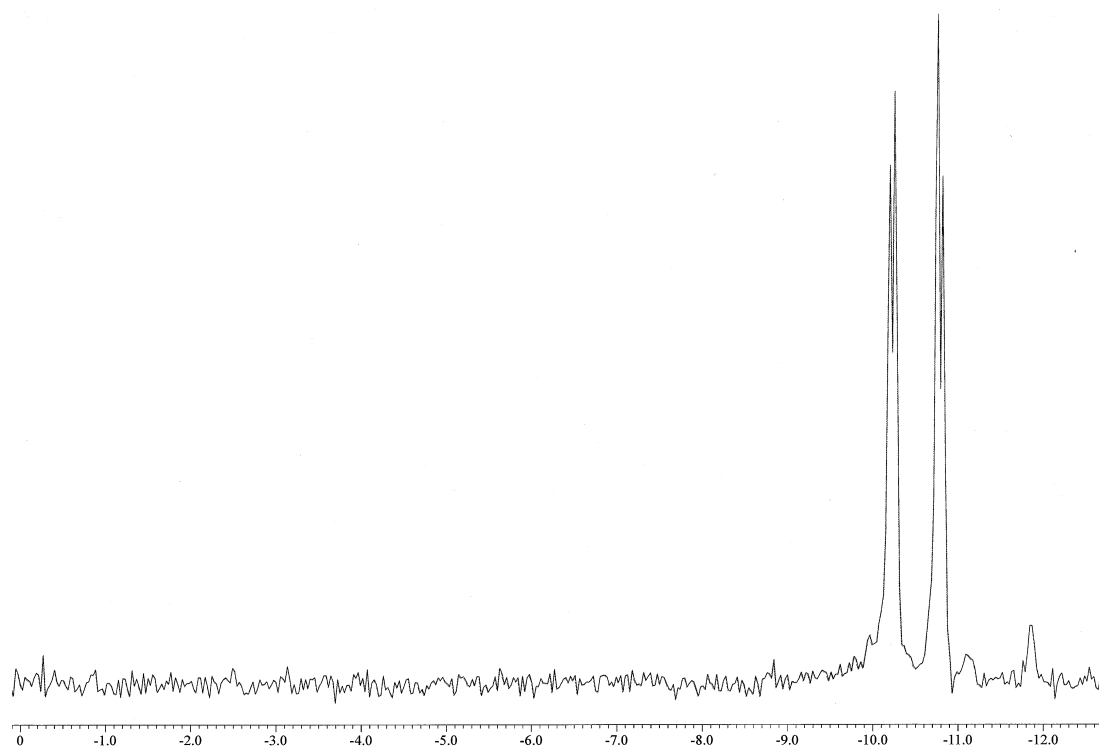


Fig. S8 ^{31}P -NMR spectrum of phosphocalyculin A in CD_3OD

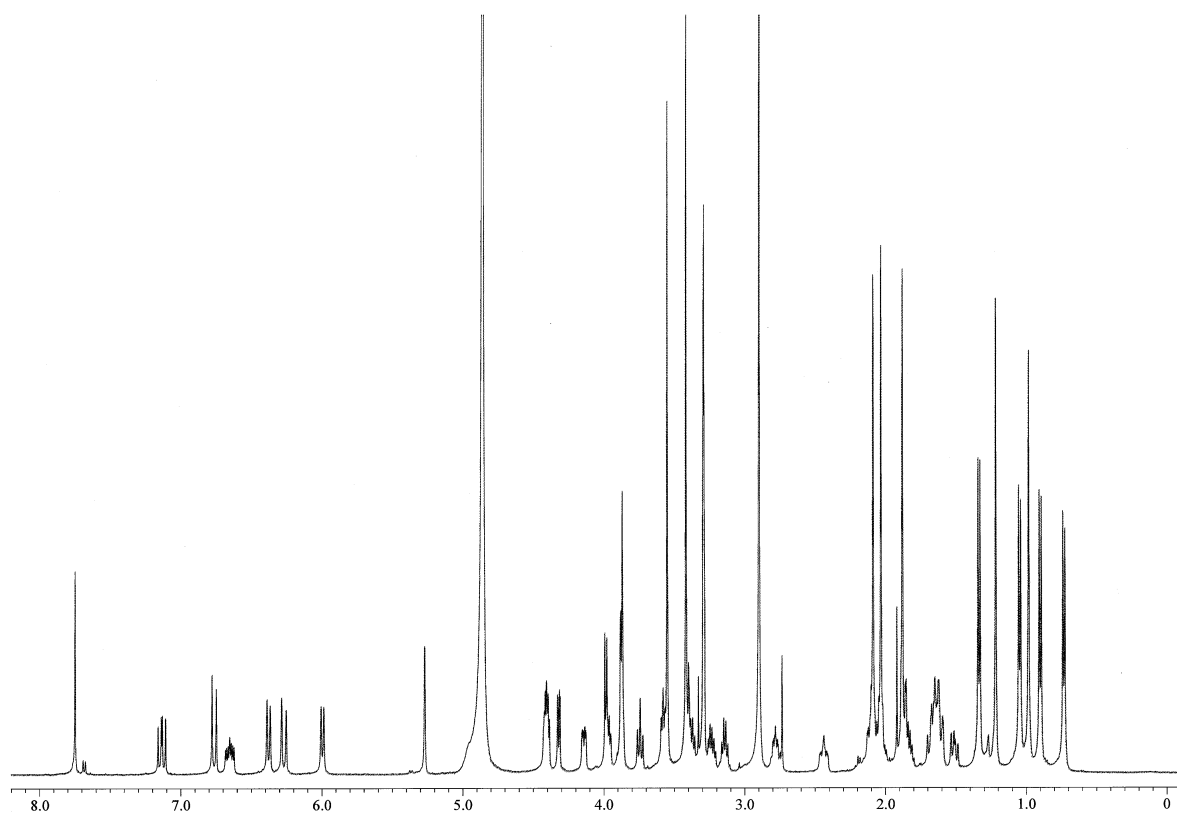


Fig. S9 ^1H -NMR spectrum of calyculin A in CD_3OD

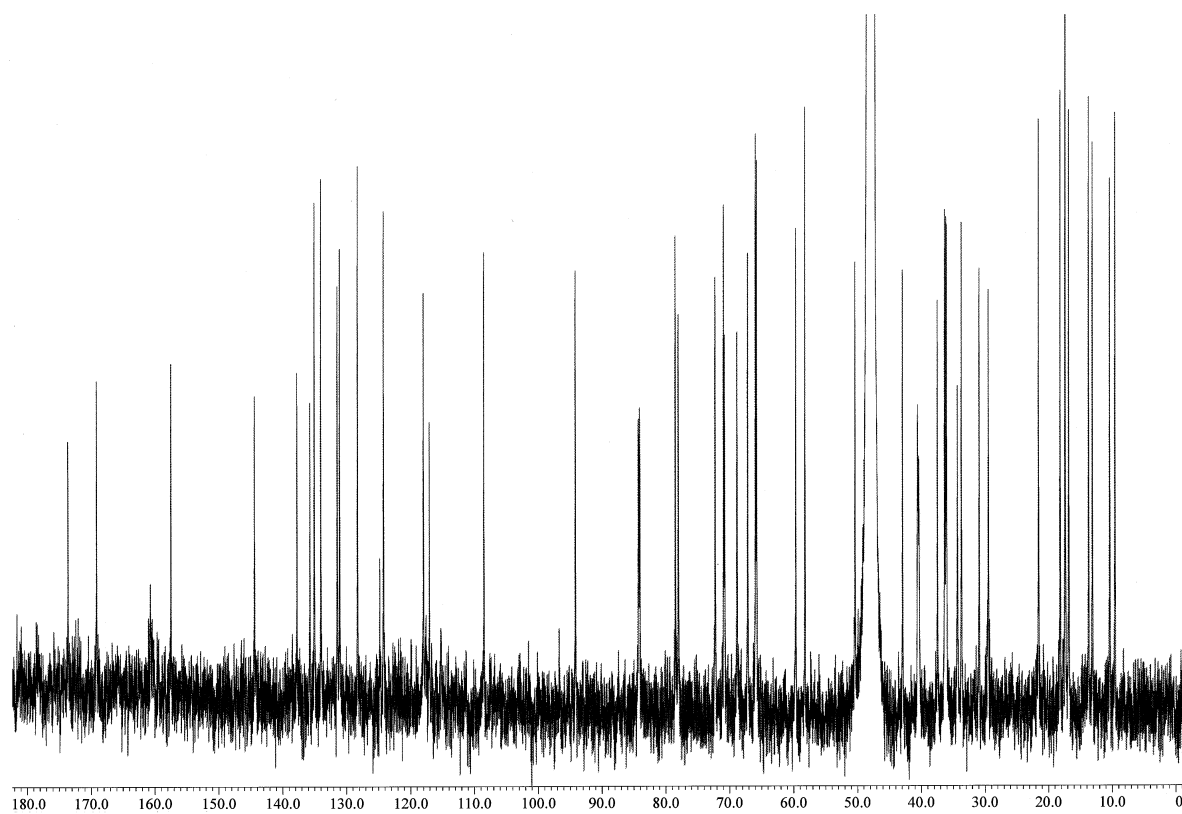
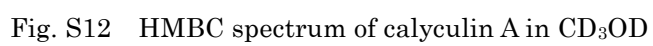
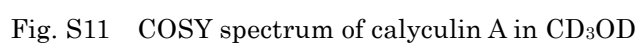


Fig. S10 ^{13}C -NMR spectrum of calyculin A in CD_3OD



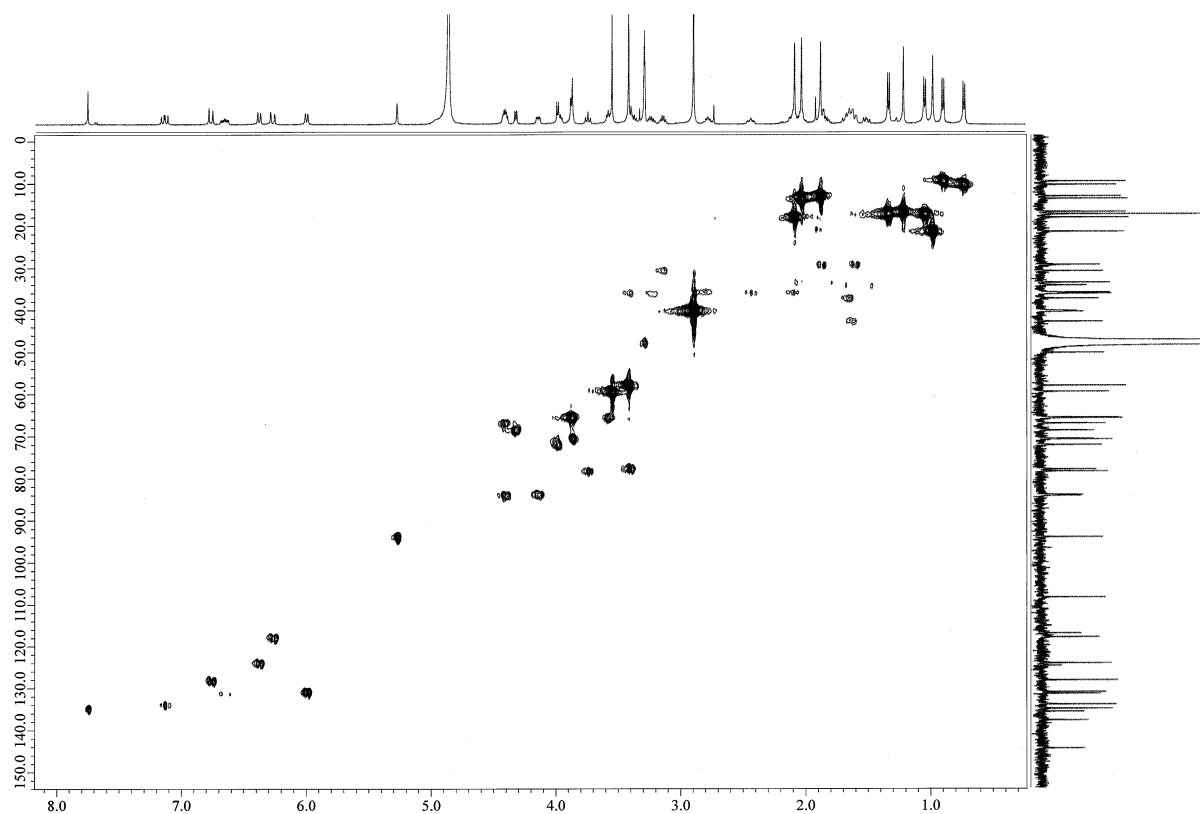


Fig. S13 HMQC spectrum of calyculin A in CD₃OD

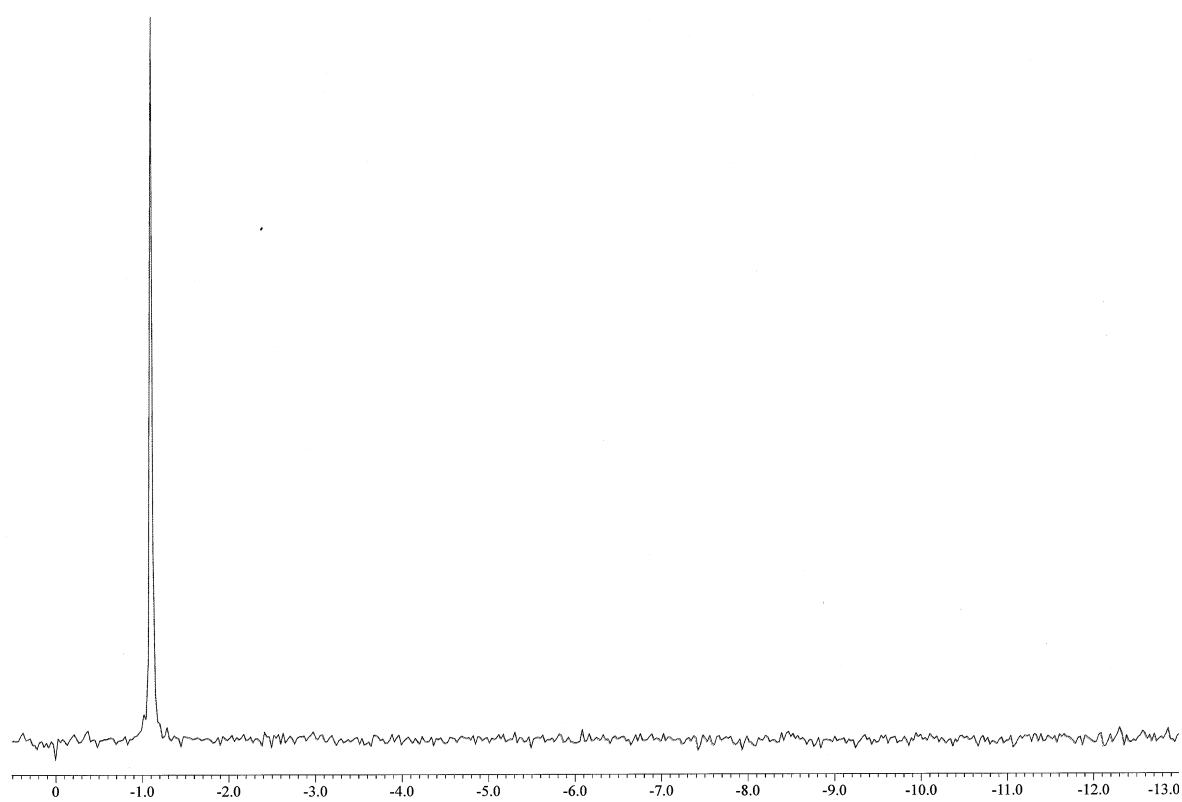


Fig. S14 ³¹P-NMR spectrum of calyculin A in CD₃OD

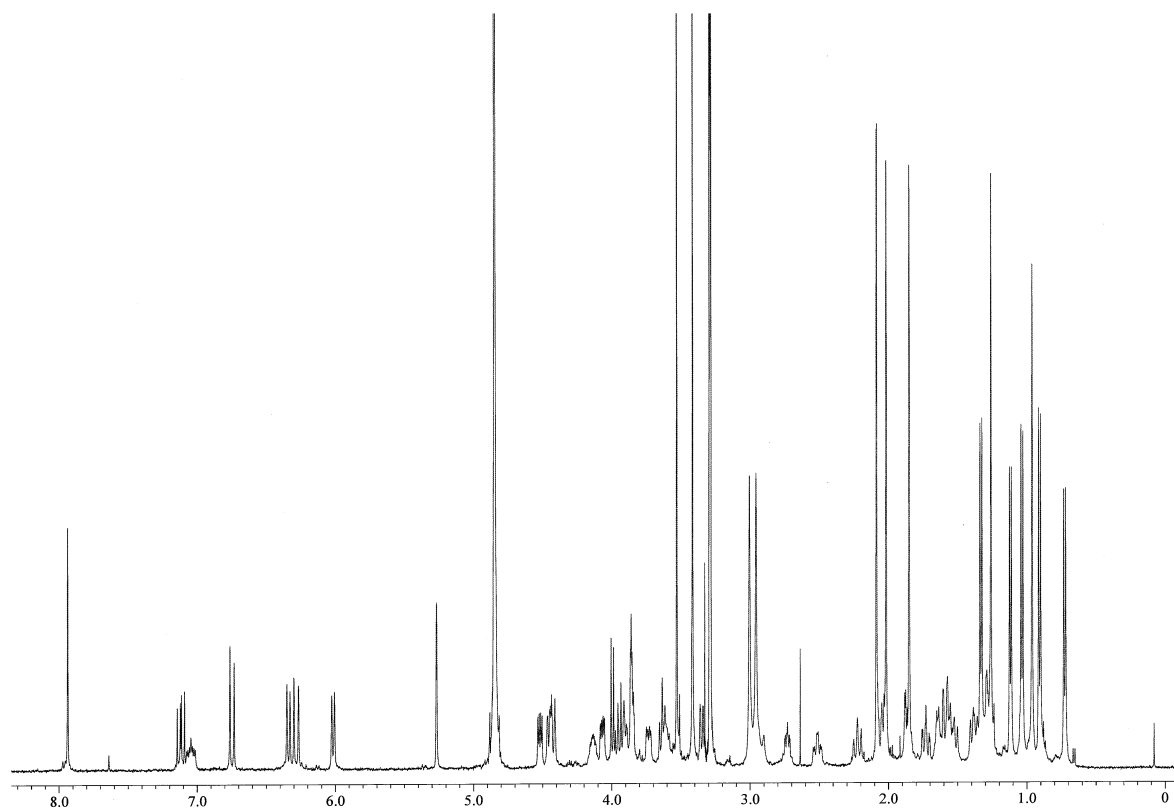


Fig. S15 ^1H -NMR spectrum of phosphocalyculin C in CD_3OD

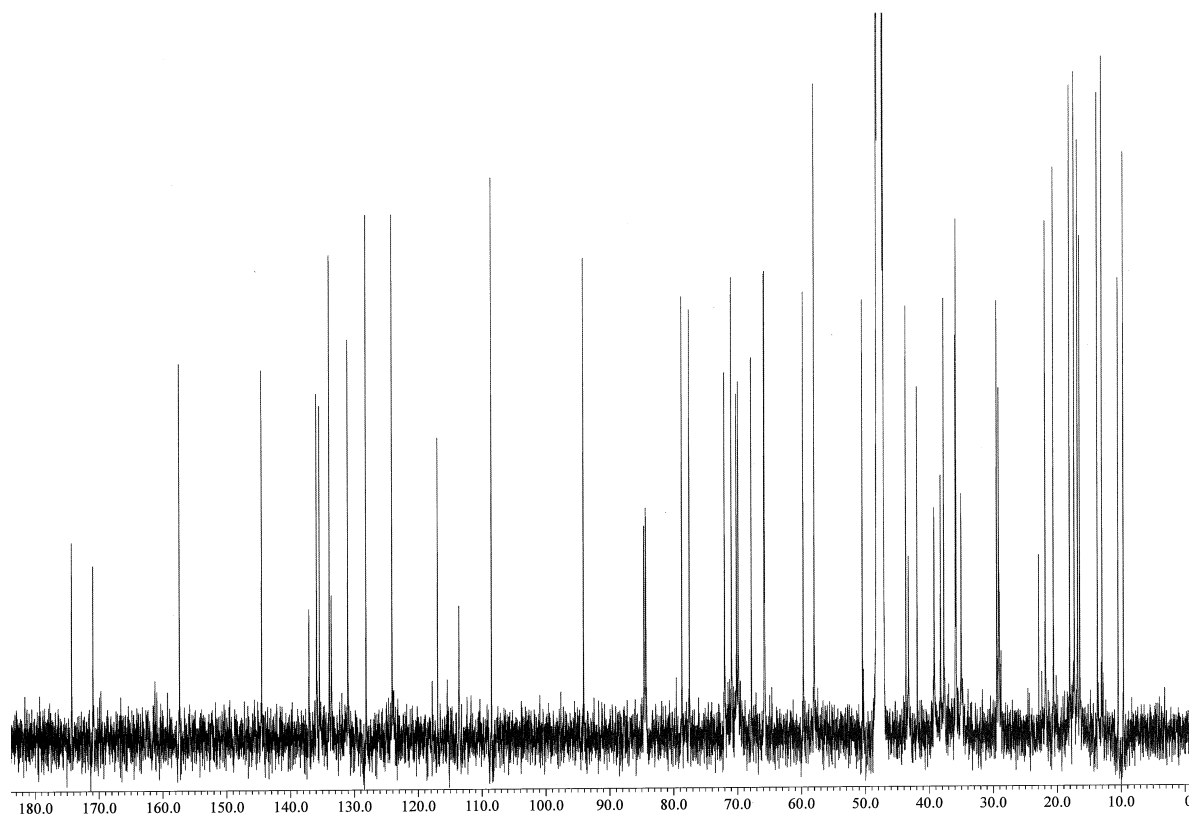


Fig. S16 ^{13}C -NMR spectrum of phosphocalyculin C in CD_3OD

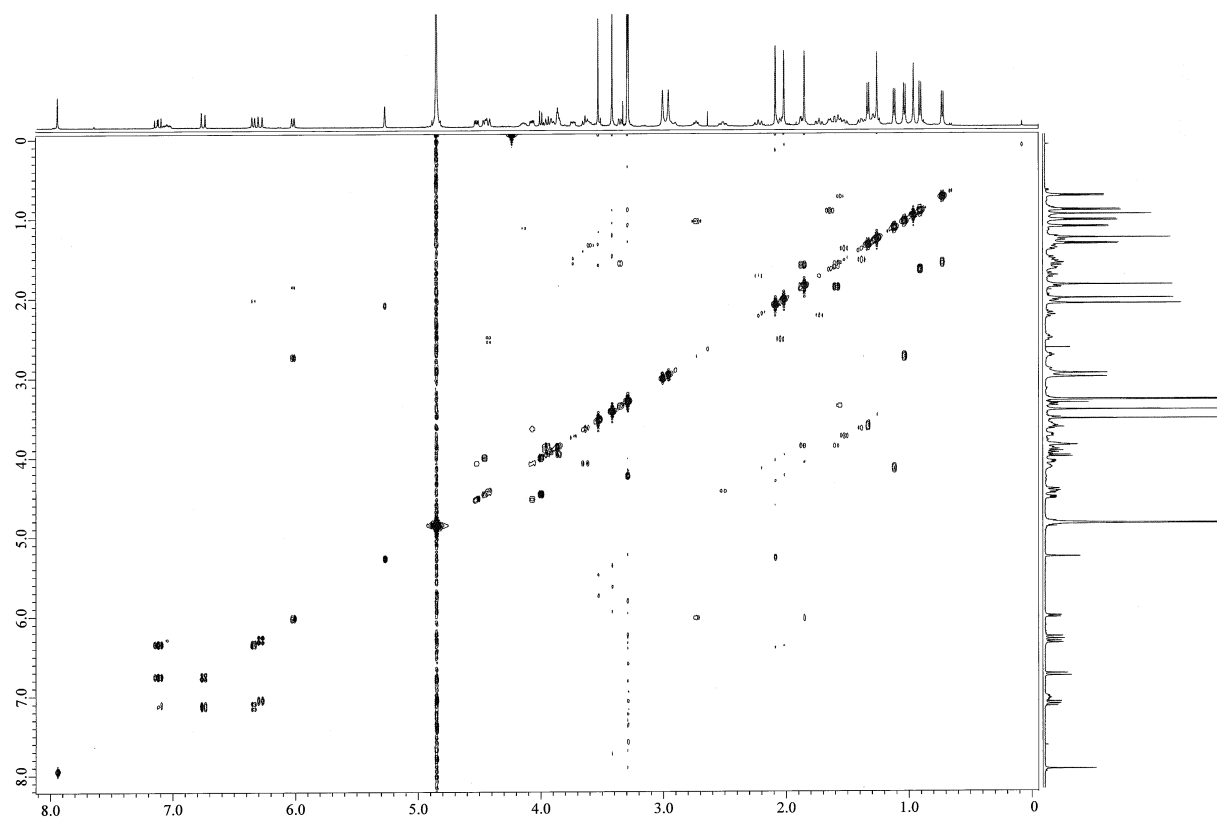


Fig. S17 COSY spectrum of phosphocalyculin C in CD₃OD

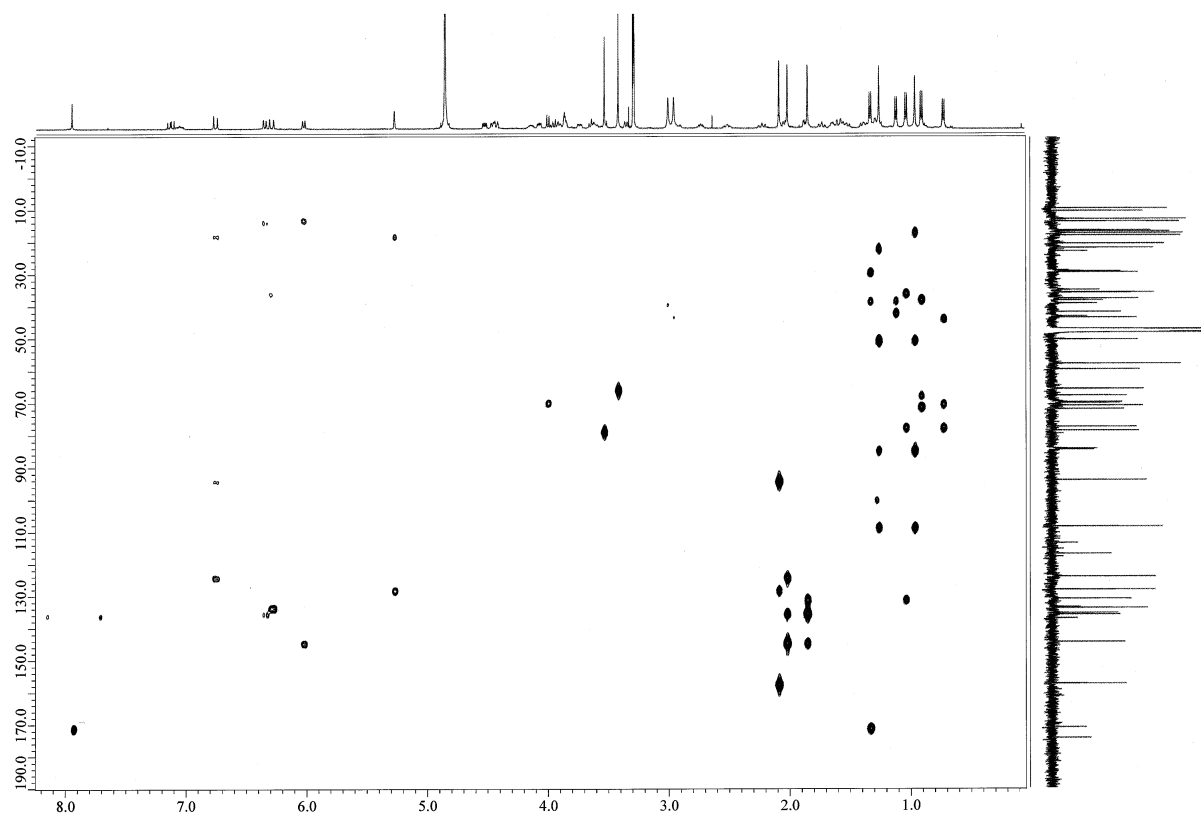


Fig. S18 HMBC spectrum of phosphocalyculin C in CD₃OD

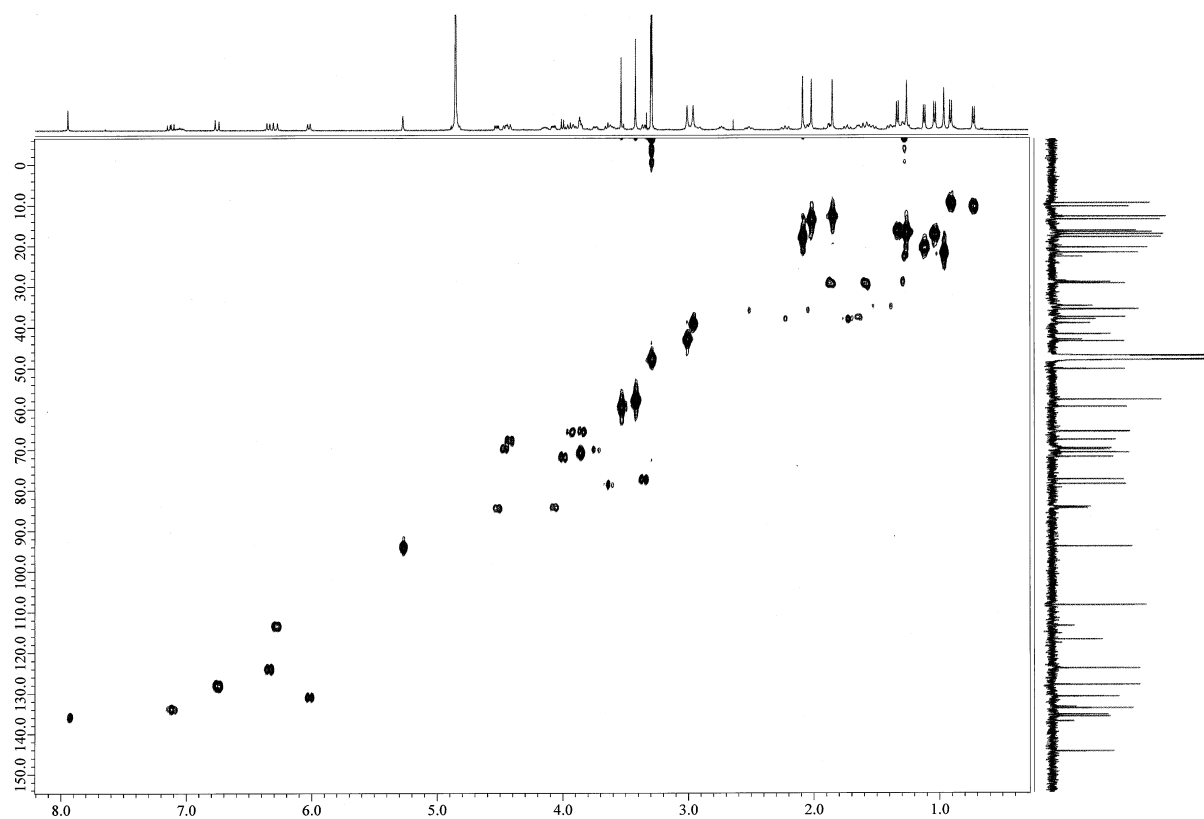


Fig. S19 HMQC spectrum of phosphocalyculin C in CD₃OD

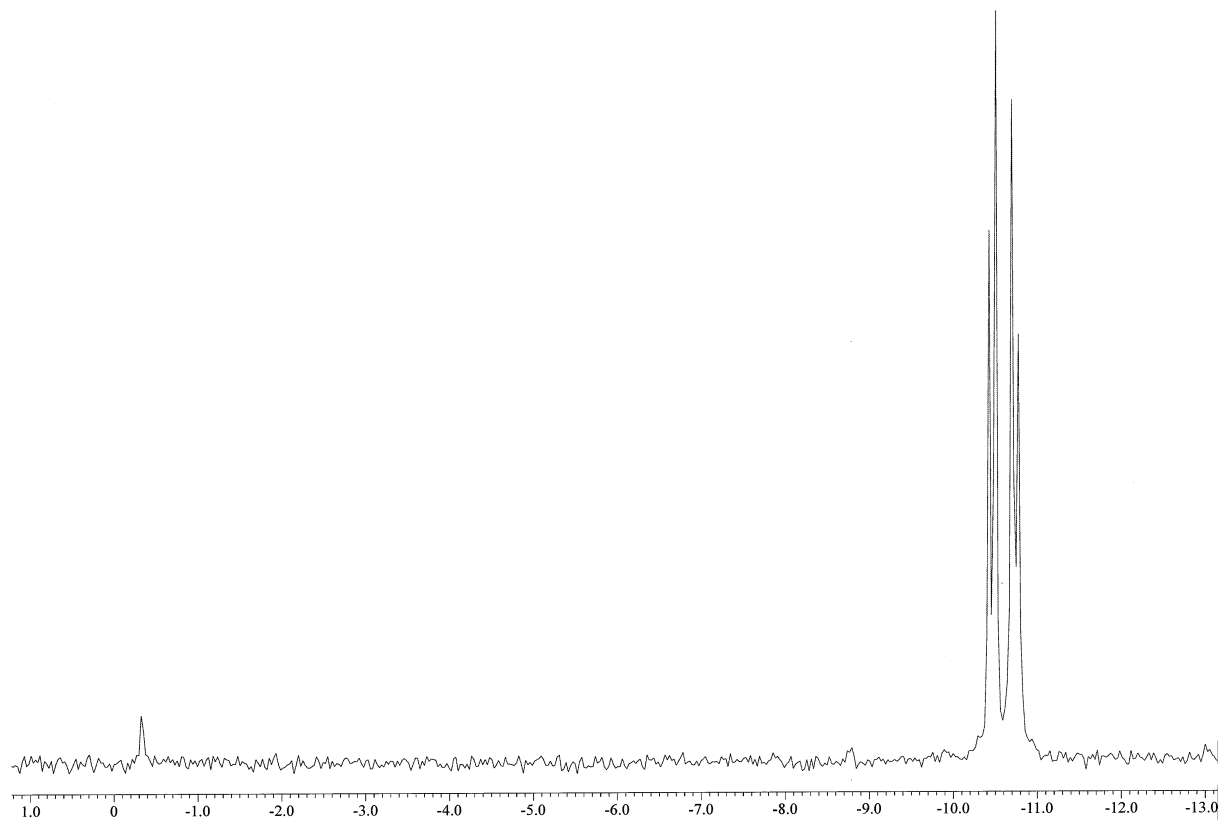


Fig. S20 ³¹P-NMR spectrum of phosphocalyculin C in CD₃OD

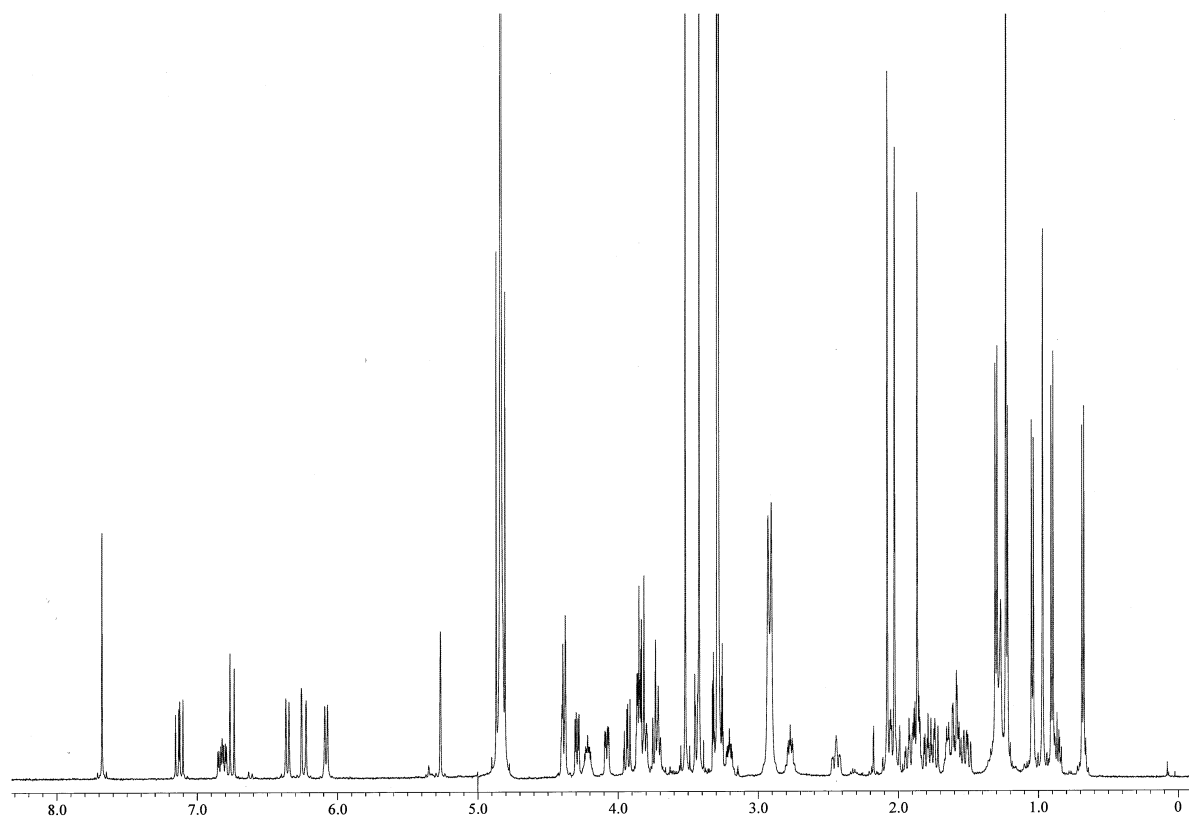


Fig. S21 ^1H -NMR spectrum of calyculin C in CD_3OD

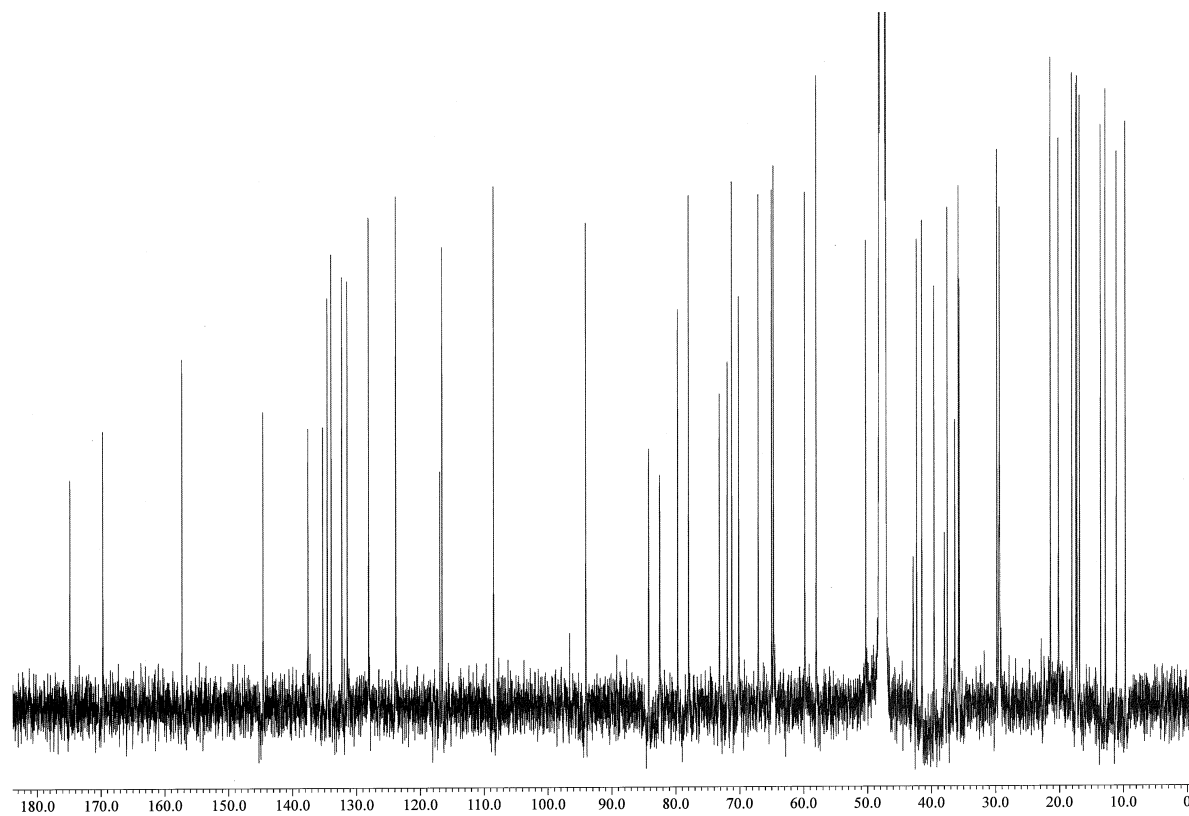


Fig. S22 ^{13}C -NMR spectrum of calyculin C in CD_3OD

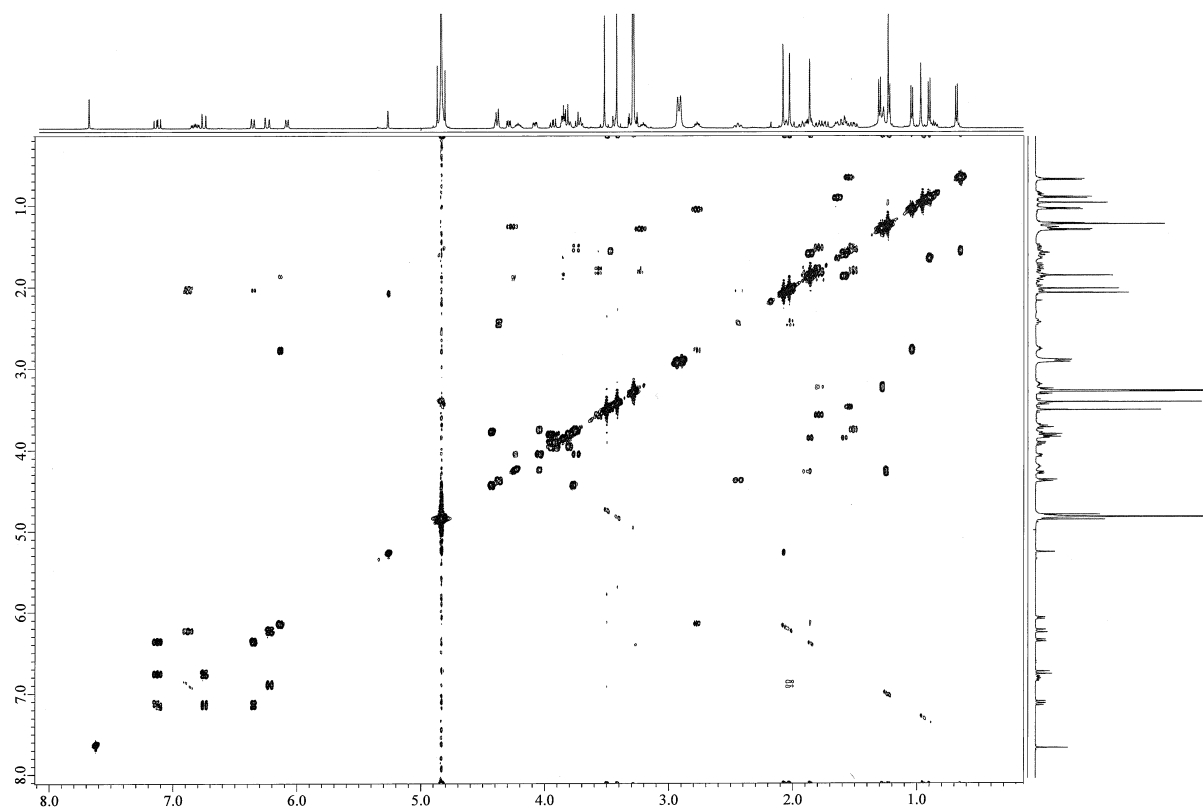


Fig. S23 COSY spectrum of calyculin C in CD₃OD

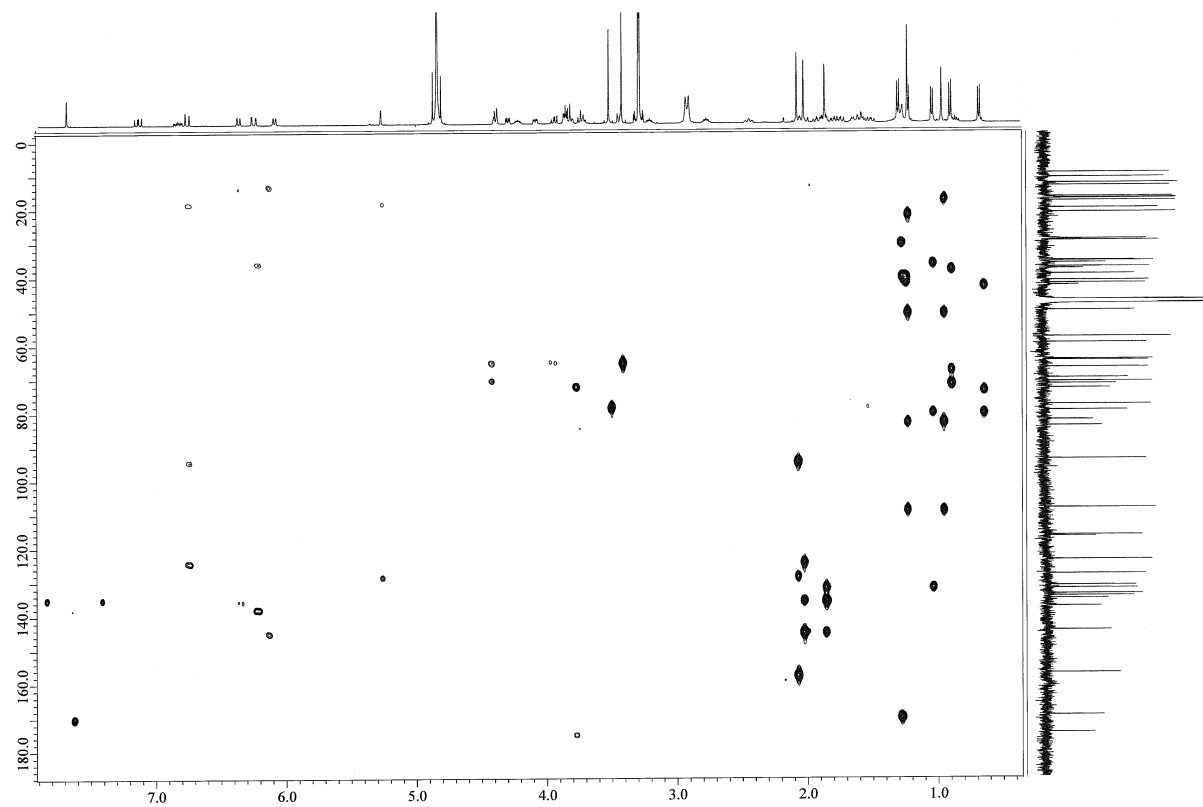


Fig. S24 HMBC spectrum of calyculin C in CD₃OD

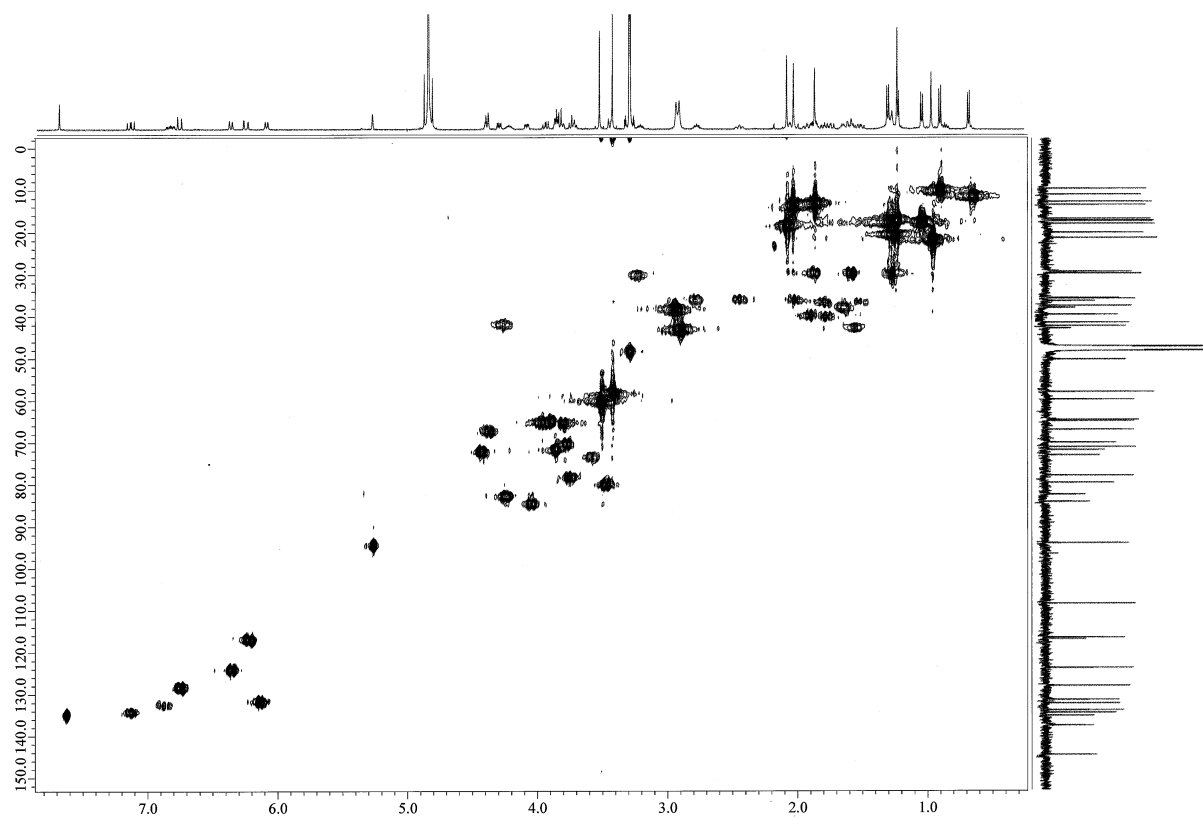


Fig. S25 HMQC spectrum of calyculin C in CD₃OD

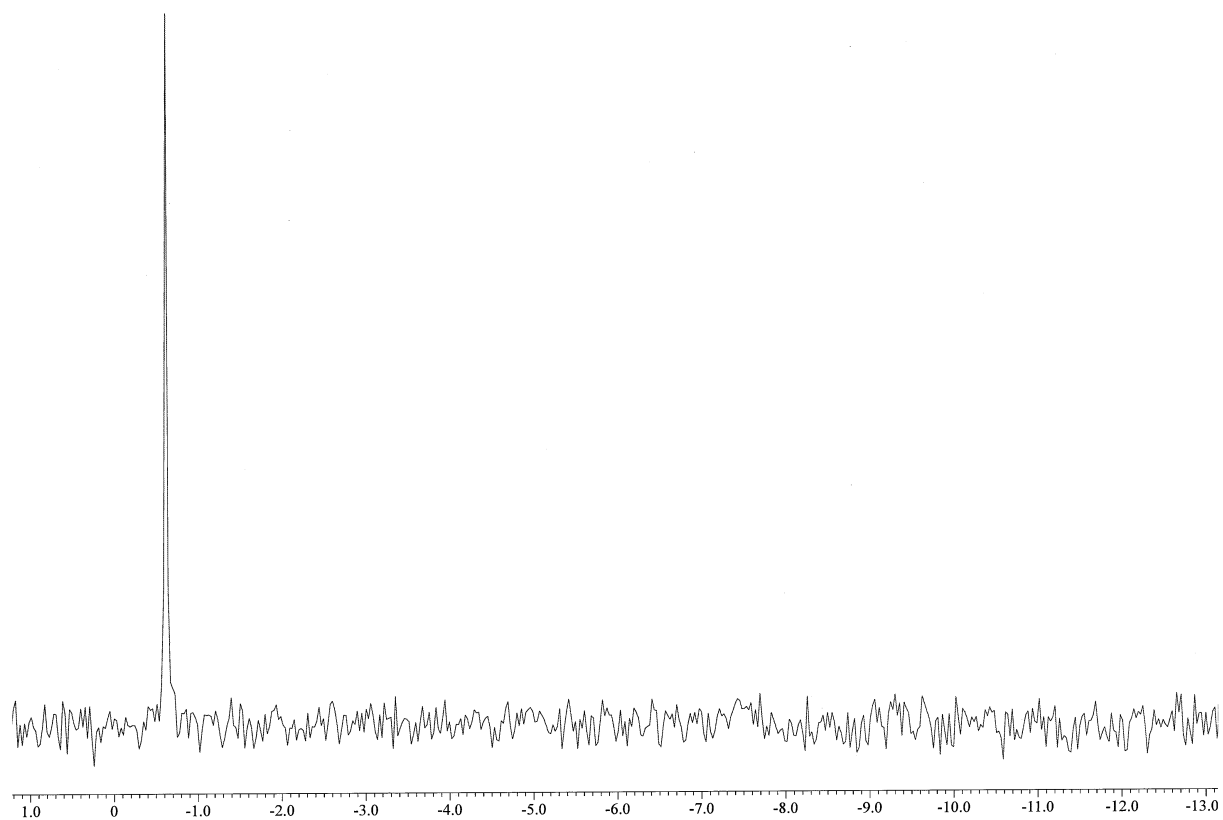


Fig. S26 ³¹P-NMR spectrum of calyculin C in CD₃OD

参考文献

- 1) McCurdy, C. R., Scully, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). *Life Sci.* **78**, 476-484 (2005)
- 2) Falconer, S. B., Czarny, T. L., Brown, E. D. Antibiotics as probes of biological complexity. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 415-423 (2011)
- 3) Arcamone, F., Cassinelli, G., Fantini, G., Grein, A., Orezzi, P., Pol, C., Spalla, C. Adriamycin, 14-hydroxydaimomycin, a new antitumor antibiotic from *S. Peucetius* var. *caesius*. *Biotechnol. Bioeng.* **11**, 1101-1110, (1969)
- 4) Endo, A., Kuroda, M., Tsujita, Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinum*. *J. Antibiot.* **29**, 1346-1348 (1976)
- 5) Truscheit, E., Frommer, W., Junge, B., Müller, L., Schmidt, D., Wingender, W. Chemistry and biochemistry of microbial α -glycosidase inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **93**, 744-761 (1981)
- 6) Kino, T., Hatanaka, H., Hashimoto, H., Nishiyama, M., Goto, T., Okuhara, M., Kohsaka, M., Aoki, H., Imanaka, H. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **40**, 1249-1255 (1987)
- 7) Sala, E., Knowlton, N. Global marine biodiversity trends. *Annu. Rev. Environ. Resour.* **31**, 93-122 (2006)
- 8) Bhakuni, D. S., Rawat, D. S. Chapter 1; Bioactive metabolites of marine algae, fungi and bacteria. In *Bioactive marine natural products*, Springer Netherlands 1-25 (2005)
- 9) Rinehart, K. L., Gloer, J. B., Cook, J. C., Mizzsak, S. A., Scail, T. A. Structures of the didemnins, antiviral and cytotoxic depsipeptides from a Caribbean tunicate. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 1857-1859 (1981)
- 10) Tsukimoto, M., Nagaoka, M., Shishido, Y., Fujimoto, J., Nishisaka, F., Matsumoto, S., Harunari, E., Imada, C., Matsuzaki, T. Bacterial production of the tunicate-derived antitumor cyclic depsipeptide didemnin B. *J. Nat. Prod.* **74**, 2329-2331 (2011)
- 11) Sakai, R., Higa, T., Jefford, C. W., Bernardinelli, G. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 6404-6405 (1986)
- 12) Sasaki, M., Matsumori, N., Maruyama, T., Nonomura, T., Murata, M., Tachibana, K., Yasumoto, T. The complete structure of maitotoxin, part I: configuration of the C1-C14 side chain. *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 1672-1675 (1996)
- 13) Nonomura, T., Sasaki, M., Matsumori, N., Murata, M., Tachibana, K., Yasumoto, T. The complete structure of maitotoxin, part II: configuration of the C135-C142 side chain and absolute configuration of the entire molecule. *Angew. Chem. Int. Ed.* **35**, 1675-1678 (1996)
- 14) Sakowicz, R., Berdelis, M. S., Ray, K., Blackburn, C. L., Hopmann, C., Faulkner, D. J., Goldstein, L. S. B. A marine natural product inhibitor of kinesin motors. *Science* **280**, 292-295 (1998)
- 15) Molinski, T. F., Dalisay, D. S., Lievens, S. L., Saludes, J. P. Drug development from marine natural products. *Nat. Rev. Drug Discov.* **8**, 69-85 (2009)

- 16) Gerwick, W. H., Moore, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.* **19**, 85-98 (2012)
- 17) Bergmann, W., Feeney, R. J. The isolation of a new thymine pentoside from sponges. *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 2809-2810 (1950)
- 18) Bergmann, W., Feeney, R. J. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides of sponges. *J. Org. Chem.* **16**, 981-987 (1951)
- 19) Bergmann, W., Feeney, R. Contributions to the study of marine products. XXXIX. The nucleosides of sponges. III. Spongothymidine and spongouridine. *J. Org. Chem.* **20**, 1501-1507 (1955)
- 20) Olivera, B. M., McIntosh, J. M., Cruz, L. J., Luque, F. A., Gray, W. R. Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* **23**, 5087-5090 (1984)
- 21) Williams, M. E., Brust, P. F., Feldman, D. H., Patthi, S., Simerson, S., Maroufi, A., McCue, A. F., Velicelebi, G., Ellis, S. B., Harpold, M. M. Structure and functional expression of an omega-conotoxin-sensitive human N-type calcium channel. *Science* **257**, 389-395 (1992)
- 22) Rinehart, K. L., Holt, T. G., Fregeau, N. L., Stroh, J. G., Keifer, P. A., Sun, F., Li, L. H., Martin, D. G. Ecteinascidins 729, 743, 745, 759A, 759B, and 770: potent antitumor agents from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *J. Org. Chem.* **55**, 4512-4515 (1990)
- 23) Pommier, Y., Kohlhagen, G., Bailly, C., Waring, M., Mazumder, A., Kohn, K. W. DNA sequence- and structure-selective alkylation of guanine N2 in the DNA minor groove by ecteinascidin 743, a potent antitumor compound from the Caribbean tunicate *Ecteinascidia turbinata*. *Biochemistry* **35**, 13303-13309 (1996)
- 24) Gronchi, A., Bui, B. N., Bonvalot, S., Pilotti, S., Ferrari, S., Hohenberger, P., Hohl, R. J., Demetri, G. D., Le Cesne, A., Lardelli, P., Pérez, I., Nieto, A., Tercero, J. C., Alfaro, V., Tamborini, E., Blay, J. Y. Phase II clinical trial of neoadjuvant trabectedin in patients with advanced localized myxoid liposarcoma. *Ann. Oncol.* **23**, 771-776 (2012)
- 25) Blay, J. Y., Leahy, M. G., Nguyen, B. B., Patel, S. R., Hohenberger, P., Santoro, A., Staddon, A. P., Penel, N., Piperno-Neumann, S., Hendifar, A., Lardelli, P., Nieto, A., Alfaro, V., Chawla, S. P. Randomised phase III trial of trabectedin versus doxorubicin-based chemotherapy as first-line therapy in translocation-related sarcomas. *Eur. J. Cancer* **50**, 1137-1147 (2014)
- 26) Jain, S., Vahdat, L. T. Eribulin Mesylate. *Clin. Cancer Res.* **17**, 6615-6622 (2011)
- 27) Uemura, D., Takahashi, K., Yamamoto, T., Katayama, C., Tanaka, J., Okumura, Y., Hirata, Y. Norhalichondrin A: an antitumor polyether macrolide from a marine sponge. *J. Am. Chem. Soc.* **107**, 4796-4798 (1985)
- 28) Senter, P. D., Sievers, E. L. The discovery and development of brentuximab vedotin for use in relapsed Hodgkin lymphoma and systemic anaplastic large cell lymphoma. *Nat. Biotechnol.* **30**, 631-637 (2012)
- 29) Pettit, G. R., Kamano, Y., Herald, C. L., Tuinman, A. A., Boettner, F. E., Kizu, H., Schmidt, J. M., Baczynskyj, L., Tomer, K. B., Bontems, R. J. The isolation and structure of a remarkable marine animal antineoplastic constituent: dolastatin 10. *J. Am. Chem. Soc.* **109**, 6883-6885

(1987)

- 30) Luesch, H., Moore, R. E., Paul, V. J., Mooberry, S. L., Corbett, T. H. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *symploca* Species VP642 and total stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. *J. Nat. Prod.* **64**, 907-910 (2001)
- 31) Gerwick, H. W., Fenner, A. M. Drug discovery from marine microbe. *Microb. Ecol.* **65**, 800-806 (2013)
- 32) Li, C. W., Chen, J. Y., Hua, T. E. Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**, 879-882 (1998)
- 33) Love, G. D., Grosjean, E., Stalvies, C., Fike, D. A., Grotzinger, J. P., Bradley, A. S., Kelly, A. E., Bhatia, M., Meredith, W., Snape, C. E., Bowring, S. A., Condon, D. J., Summons, R. E. Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature* **457**, 718-721 (2009).
- 34) Van Soest, R. W., Boury-Esnault, N., Vacelet, J., Dohrmann, M., Erpenbeck, D., De Voogd, N. J., Santodomingo, N., Vanhoorne, B., Kelly, M., Hooper, J. N. Global diversity of sponges (Porifera). *PLoS One* **7**, e35105 (2012)
- 35) Hentschel, U., Piel, J., Degnan, S. N., Taylor, M. W. Genomic insights into the marine sponge microbiome. *Nat. Rev.* **10**, 641-654 (2012)
- 36) Kennedy, J., Marchesi, J. R., Dobson, A. D. Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **75**, 11-20 (2007)
- 37) Vacelet, J., Donadey, C. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **30**, 301-314 (1977)
- 38) Hentschel, U., Usher, K. M., Taylor, M. W. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **55**, 167-177 (2006)
- 39) Haygood, M. G., Schmidt, E. W., Davidson, S. K., Faulkner, D. J. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**, 33-43 (1999)
- 40) Fusetani, N., Matsunaga, S. Bioactive sponge peptides. *Chem. Rev.* **93**, 1793-1806 (1993)
- 41) Gunasekera, S. P., Gunasekera, M., Longley, R. E., Schulte, G. K. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge *Discodermia dissolute*. *J. Org. Chem.* **55**, 4912-4915 (1990)
- 42) West, L. M., Northcote, P. T. Peloruside A: a potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp.. *J. Org. Chem.* **65**, 445-449 (2000)
- 43) Erickson, K. L., Beutler, J. A., Cardellina II, J. H., Boyd, M. R. Salicylihalamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp.. *J. Org. Chem.* **62**, 8188-8192 (1997)
- 44) Corley, D. G., Herb, R., Moore, R. E., Scheuer, P. J., Paul, V. J. Laulimalides. New potent cytotoxic macrolides from a marine sponge and a nudibranch predator. *J. Org. Chem.* **53**, 3644-3646 (1988)

- 45) Hunt, B., Vincent, A. C. Scale and sustainability of marine bioprospecting for pharmaceuticals. *Ambio*. **35**, 57-64 (2006)
- 46) Montaser, R., Luesch, H. Marine natural products: a new wave of drugs? *Future Med. Chem.* **3**, 1475-1489 (2011)
- 47) Pettit, G. R., Herald, C. L., Doubek, D. L., Herald, D. L., Arnold, E., Clardy, J. Isolation and structure of bryostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.* **104**, 6846-6848 (1982)
- 48) Mütter, R., Wills, M. Chemistry and clinical biology of the bryostatins. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 1841-1860 (2000)
- 49) Mangialasche, F., Solomon, A., Winblad, B., Mecocci, P., Kivipelto, M. Alzheimer's disease: clinical trials and drug development. *Lancet Neurol.* **9**, 702-716 (2010)
- 50) Plimack, E. R., Tan, T., Wong, Y. N., von Mehren, M. M., Malizzia, L., Roethke, S. K., Litwin, S., Li, T., Hudes, G. R., Haas, N. B. A Phase I study of temsirolimus and bryostatin-1 in patients with metastatic renal cell carcinoma and soft tissue sarcoma. *Oncologist* **19**, 354-355 (2014)
- 51) Cuevas, C., Pérez, M., Martín, M. J., Chicharro, J. L., Fernández-Rivas, C., Flores, M., Francesch, A., Gallego, P., Zarzuelo, M., de La Calle, F., García, J., Polanco, C., Rodríguez, I., Manzanares, I. Synthesis of ecteinascidin ET-743 and phthalascidin Pt-650 from cyanosafraicin B. *Org. Lett.* **2**, 2545-2548 (2000)
- 52) Aicher, T. D., Buszek, K. R., Fang, F. G., Forsyth, C. J., Jung, S. H., Kishi, Y., Matelich, M. C., Scola, P. M., Spero, D. M., Yoon, S. K. Total synthesis of halichondrin B and norhalichondrin B. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3162-3164 (1992)
- 53) Kim, D. S., Dong, C. G., Kim, J. T., Guo, H., Huang, J., Tiseni, P. S., Kishi, Y. New syntheses of E7389 C14-C35 and halichondrin C14-C38 building blocks: double-inversion approach. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15636-15641 (2009)
- 54) Wang, G. Diversity and biotechnological potential of the sponge-associated microbial consortia. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**, 545-551 (2006)
- 55) Scheuermayer, M., Pimentel-Elardo, S. M., Fieseler, L., Grozdanov, L., Hentschel, U. Microorganisms of sponges: Phylogenetic diversity and biotechnological potential. *Frontiers in marine biotechnology*, Horizon Scientific Press 289-312 (2006)
- 56) Döderlein, L. Studien an japanischen Lithistiden. *Zeitschr. f. wiss. Zool.* **40**, 62-104 (1883)
- 57) Kelly-Borges, M., Pomponi, S. A., Phylogeny and classification of lithistid sponges (porifera: Demospongiae): a preliminary assessment using ribosomal DNA sequence comparisons. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**, 87-103 (1994)
- 58) Bewley, C. A., Faulkner, D. J. Lithistid sponges: Star performers or hosts to the stars. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**, 2162-2178 (1998)
- 59) Amy, E. Wright. The Lithistida: Important sources of compounds useful in biomedical research. *Curr. Opin. Biotechnol.* **21**, 801-807 (2010)
- 60) Kato, Y., Fusetani, N., Matsunaga, S., Hashimoto, K., Fujita, S., Furuya, T. J. Calyculin A, a novel antitumor metabolite from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J. Am. Chem. Soc.* **108**, 2780-2781 (1986)

- 61) Kato, Y., Fusetani, N., Matsunaga, S., Hashimoto, K. Isolation and structure elucidation of calyculins B, C, and D, novel antitumor metabolites, from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J. Org. Chem.* **53**, 3930-3932 (1988)
- 62) Matsunaga, S., Fujiki, H., Sakata, D., Fusetani, N. Calyculins E, F, G, and H, additional inhibitors of protein phosphatases 1 and 2a, from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron* **47**, 2999-3006 (1991)
- 63) Matsunaga, S., Wakimoto, T., Fusetani, N. Isolation of four new calyculins from the marine sponge *Discodermia calyx*. *J. Org. Chem.* **62**, 2640-2642 (1997)
- 64) Wakimoto, T., Matsunaga, S., Takai, A., Fusetani, N. Insight into binding of calyculin A to protein phosphatase 1: Isolation of hemicalyculin A and chemical transformation of calyculin A. *Chem. Biol.* **9**, 309-319 (2002)
- 65) Kimura, M., Wakimoto, T., Abe, I. Allos-hemicalyculin A, a photochemically converted calyculin from the marine sponge *Discodermia calyx*. *Tetrahedron Lett.* **54**, 114-116 (2012)
- 66) Dumdei, E. J., Blunt, J. W., Munro, M. H. G., Pannell, L. K. Isolation of calyculins, calyculinamides, and swinholid H from the New Zealand deep-water marine sponge *Lamellomorpha strongylata*. *J. Org. Chem.* **62**, 2636-2639 (1997)
- 67) Fu, X., Schmitz, F. J., Kelly-Borges, M., McCready, T. L., Holmes, C. F. B. Clavosines A-C from the marine sponge *Myriastrea clavosa*: Potent cytotoxins and inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A. *J. Org. Chem.* **63**, 7957-7963 (1998)
- 68) Kehraus, S., König, G. M., Wright, A. D. A New cytotoxic calyculinamide derivative, geometricin A, from the australian sponge *Luffariella geometrica*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1056-1058 (2002)
- 69) Edrada, R. A., Ebel, R., Supriyono, A., Wray, V., Schupp, P., Steube, K., van Soest, R., Proksch, P. Swinhoeiamide A, a new highly active calyculin derivative from the marine sponge *Theonella swinhoei*. *J. Nat. Prod.* **65**, 1168-1172 (2002)
- 70) Ishihara, H., Martin, B. L., Brautigan, D. L., Karaki, H., Ozaki, H., Kato, Y., Fusetani, N., Watabe, S., Hashimoto, K., Uemura, D., Hartshorne, D. J. Calyculin A and okadaic acid: Inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 871-877 (1989)
- 71) Tachibana, K., Scheuer, P. J., Tsukitani, Y., Kikuchi, H., Van Engen, D., Clardy, J., Gopichand, Y., Schmitz, F. J. Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 2471-2472 (1981)
- 72) Sukanuma, M., Fujiki, H., Furuya-Suguri, H., Yoshizawa, S., Yasumoto, S., Kato, Y., Fusetani, N., Sugimura, T. Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin. *Cancer Res.* **50**, 3521-3525 (1990)
- 73) Carmichael, W. W., Beasley, V. R., Bunner, D. L., Eloff, J. N., Falcomer, I., Gorham, P., Harada, K.-I., Krishnamurthy, T., Yu, M.-J., Moore, R. E., Rinehart, K. L., Runnegar, M., Skulberg, O. M., Watanabe, M. Naming of cyclic heptapeptide toxins of cyanobacteria (blue-green algae). *Toxicon* **26**, 971-973 (1988)
- 74) Cheng, X. C., Kihara, T., Kusakabe, H., Magae, J., Kobayashi, Y., Fang, R. P., Ni, Z. F., Shen,

- Y. C., Ko, K., Yamaguchi, I., Isono, K. A new antibiotic, tautomycin. *J. Antibiot.* **40**, 907-909 (1987)
- 75) Cheng, X. C., Ubukata, M., Isono, K. The structure of tautomycin, a dialkylmaleic anhydride antibiotic. *J. Antibiot.* **43**, 809-819 (1990)
- 76) Wiens, M., Wiens, M., Luckas, B., Brümmer, F., Shokry, M., Ammar, A., Steffen, R., Batel, R., Diehl-Seifert, B., Schröder, H., Müller, W. Okadaic acid: a potential defense molecule for the sponge *Suberites domuncula*. *Mar. Biol.* **142**, 213-223 (2003)
- 77) Li, Y. M., Casida, J. E. Cantharidin-binding protein: identification as protein phosphatase 2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 11867-11870 (1992)
- 78) Suzuki, T., Suzuki, M., Furusaki, A., Matsumoto, T., Kato, A., Imanaka, Y., Kurosawa, E. Teurilene and thyriferyl 23-acetate, *meso* and remarkably cytotoxic compounds from the marine red alga *laurencia obtusa* (hudson) lamouroux. *Tetrahedron Lett.* **26**, 1329-1332 (1985)
- 79) Tunac, J. B., Graham, B. D., Dobson, W. E. Novel antitumor agents CI-920, PD 113,270 and PD 113,271. I. Taxonomy, fermentation and biological properties. *J. Antibiot.* **36**, 1595-1600 (1983)
- 80) Stampwala, S. S., Bunge, R. H., Hurley, T. R., Willmer, N. E., Brankiewicz, A. J., Steinman, C. E., Smitka, T. A., French, J. C. Novel antitumor agents CI-920, PD 113,270 and PD 113,271. II. Isolation and characterization. *J. Antibiot.* **36**, 1601-1605 (1983)
- 81) de Silva, E. D., Williams, D. E., Andersen, R. J. Motuporin, a potent protein phosphatase inhibitor isolated from the Papua New Guinea sponge *Theonella swinhoei* Gray. *Tetrahedron Lett.* **33**, 1561-1564 (1992)
- 82) Quinn, R. J., Taylor, C., Suganuma, M., Fujiki, H. The conserved acid binding domain model of inhibitors of protein phosphatases 1 and 2A : molecular modeling aspects. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **3**, 1029-1034 (1993)
- 83) Kita, A., Matsunaga, S., Takai, A., Kataiwa, H., Wakimoto, T., Fusetani, N., Isobe, M., Miki, K. Crystal structure of the complex between calyculin A and the catalytic subunit of protein phosphatase 1. *Structure* **10**, 715-724 (2002)
- 84) Fagerholm, A. E., Habrant, D., Koskinen, A. M. Calyculins and related marine natural products as serine-threonine protein phosphatase PP1 and PP2A inhibitors and total syntheses of calyculin A, B, and C. *Mar. Drugs* **21**, 122-172 (2010)
- 85) Evans, D. A., Gage, J. R., Leighton, J. L. Total synthesis of (+)-calyculin A. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 9434-9453 (1992)
- 86) Tanimoto, N., Gerritz, S. W., Sawabe, A., Noda, T., Filla, S. A., Masamune, S. The synthesis of naturally occurring (-)-calyculin A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **33**, 673-675 (1994)
- 87) Yokokawa, F., Hamada, Y., Shioiri, T. Total synthesis of calyculin A-Construction of the C(9)–C(37) fragment. *Chem. Commun.* **7**, 871-872 (1996)
- 88) Ogawa, A. K., Armstrong, R. W. Total synthesis of calyculin C. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12435-12442 (1998)

- 89) Smith, A. B., Friestad, G. K., Duan, J. J. W., Barbosa, J., Hull, K. G., Iwashima, M., Qiu, Y., Spoor, P. G., Bertounesque, E., Salvatore, B. A. Total synthesis of (+)-calyculin A and (-)-calyculin B. *J. Org. Chem.* **63**, 7596-7597 (1998)
- 90) Anderson, O. P., Barrett, A. G. M., Edmunds, J. J., Hachiya, S.-I., Hendrix, J. A., Horita, K., Malecha, J. W., Parkinson, C. J., VanSickle, A. Applications of crotyldiisopinocampheylboranes in synthesis: A formal total synthesis of (+)-calyculin A. *Can. J. Chem.* **79**, 1562-1592 (2001)
- 91) Dechert-Schmitt, A. R., Schmitt, D. C., Gao, X., Itoh, T., Krische, M. J. Polyketide construction via hydrohydroxyalkylation and related alcohol C-H functionalizations: reinventing the chemistry of carbonyl addition. *Nat. Prod. Rep.* **31**, 504-513 (2014)
- 92) Hertweck, C. The biosynthetic logic of polyketide diversity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **48**, 4688-4716 (2009)
- 93) Cortés, J., Haydock, S. F., Roberts, G. A., Bevitt, D. J., Leadlay, P. F. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. *Nature* **348**, 176-178 (1990)
- 94) Donadio, S., Staver, M. J., McAlpine, J. B., Swanson, S. J., Katz, L. Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science* **252**, 675-679 (1991)
- 95) Lambalot, R. H., Gehring, A. M., Flugel, R. S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M. A., Reid, R., Khosla, C., Walsh, C. T. A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3**, 923 (1996)
- 96) Smith, S., Tsai, S.-C. The type I fatty acid and polyketide synthases: a tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* **24**, 1041-1072 (2007)
- 97) Keatinge-Clay, A. The structures of type I polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **29**, 1050-1073 (2012)
- 98) Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., Lindqvist, Y. Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E. coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *EMBO J.* **17**, 1183-1191 (1998)
- 99) Reid, R., Piagentini, M., Rodriguez, E., Ashley, G., Viswanathan, N., Carney, J., Santi, D. V., Hutchinson, C. R., McDaniel, R. A model of structure and catalysis for ketoreductase domains in modular polyketide synthases. *Biochemistry* **42**, 72-79 (2003)
- 100) Caffrey, P. Conserved amino acid residues correlating with ketoreductase stereospecificity in modular polyketide synthases. *ChemBioChem* **4**, 654-657 (2003)
- 101) Keatinge-Clay, A. Crystal structure of the erythromycin polyketide synthase dehydratase. *J. Mol. Biol.* **384**, 941-953 (2008)
- 102) Kwan, D. H., Sun, Y., Schelz, F., Hong, H., Popovic, B., Sim-Stark, J. C. C., Haydock, S. F., Leadlay, P. F. Prediction and manipulation of the stereochemistry of enoylreduction in modular polyketide synthases. *Chem. Biol.* **15**, 1231-1240 (2008)
- 103) Kwan, D. H., Leadlay, P. F. Mutagenesis of a modular polyketide synthase enoylreductase domain reveals insights into catalysis and stereospecificity. *ACS Chem. Biol.* **5**, 829-838 (2010)

- 104) Tsai, S.-C., Lu, H., Cane, D. E., Khosla, C., Stroud, R. M. Insights into channel architecture and substrate specificity from crystal structures of two macrocycle-forming thioesterases of modular polyketide synthases. *Biochemistry* **41**, 12598-12606 (2002)
- 105) Dutta, S., Whicher, J. R., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Congdon, G. R., Narayan, A. R. H., Håkansson, K., Sherman, D. H., Smith, J. L., Skiniotis, G. Structure of a modular polyketide synthase. *Nature* **510**, 512-517 (2014)
- 106) Whicher, J. R., Dutta, S., Hansen, D. A., Hale, W. A., Chemler, J. A., Dosey, A. M., Narayan, A. R. H., Håkansson, K., Sherman, D. H., Smith, J. L., Skiniotis, G. Structural rearrangements of a polyketide synthase module during its catalytic cycle. *Nature* **510**, 560-564 (2014)
- 107) J. Piel. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 14002-14007 (2002)
- 108) Musiola, E. M., Weber, T. Discrete acyltransferases involved in polyketide biosynthesis. *Med. Chem. Commun.* **3**, 871-886 (2012)
- 109) Calderone, C. T., Iwig, D. F., Dorrestein, P. C., Kelleher, N. L., Walsh, C. T. Incorporation of nonmethyl branches by isoprenoid-like logic: multiple beta-alkylation events in the biosynthesis of myxovirescin A1. *Chem. Biol.* **14**, 835-846 (2007)
- 110) Simunovic, V., Müller, R. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-like synthases direct the formation of methyl and ethyl side groups in the biosynthesis of the antibiotic myxovirescin A. *ChemBioChem* **8**, 497-500 (2007)
- 111) Kusebauch, B., Busch, B., Scherlach, K., Roth, M., Hertweck, C. Functionally distinct modules operate tow consecutive $\alpha,\beta \rightarrow \beta,\gamma$ double-bond shifts in the rhizoxin polyketide assembly line. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1460-1464 (2010)
- 112) Moldenhauer, J., Götz, D. C., Albert, C. R., Bischof, S. K., Schneider, K., Süssmuth, R. D., Engeser, M., Gross, H., Bringmann, G., Piel, J. The final steps of bacillaene biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: direct evidence for β,γ dehydration by a *trans*-acyltransferase polyketide synthase. *Angew. Chem. Int. Ed.* **49**, 1465-1467 (2010)
- 113) Hochmuth, T., Piel, J. Polyketide synthases of bacterial symbionts in sponges - Evolution-based applications in natural products research. *Phytochemistry* **70**, 1841-1849 (2009)
- 114) Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S. G., Park, C., Vederas, J. C., Hutchinson, C. R. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science* **284**, 1368-1372 (1999)
- 115) Grimm, A., Madduri, K., Ali, A., Hutchinson, C. R. Characterization of the *Streptomyces peucetius* ATCC 29050 genes encoding doxorubicin polyketide synthase. *Gene* **30**, 1-10 (1994)
- 116) Ferrer, J. L., Jez, J. M., Bowman, M. E., Dixon, R. A., Noel, J. P. Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 775-784 (1999)

- 117) Walsh, C. T., O'Brien, R. V., Khosla, C. Nonproteinogenic amino acid building blocks for nonribosomal peptide and hybrid polyketide scaffolds. *Angew. Chem. Int. Ed.* **8**, 7098-7124 (2013)
- 118) Dreyfuss, M., Harri, E., Hoffmann, H., Kobel, H., Pache, W., Tschertter, H. Cyclosporin A and C. New metabolites from *Trichoderma polysporum* (Linx ex Pers.) Rifai. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **3**, 125-133 (1976)
- 119) McCormick, M. H., Stark, W. M., Pittenger, G. E., Pittenger, R. C., McGuire, J. M. Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biological properties. *Antibiot. Annu.* **1955**, 601-611 (1956)
- 120) Hamada, T., Matsunaga, S., Yano, G., Fusetani, N. Polytheonamide A and B, highly cytotoxic, linear polypeptides with unprecedented structural features, from the marine sponge, *Theonella swinhoei*. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 110-118 (2005)
- 121) Arnison, P. G., Bibb, M. J., Bierbaum, G., Bowers, A. A., Bugni, T. S., Bulaj, G., Camarero, J. A., Campopiano, D. J., Challis, G. L., Clardy, J., Cotter, P. D., Craik, D. J., Dawson, M., Dittmann, E., Donadio, S., Dorrestein, P. C., Entian, K. D., Fischbach, M. A., Garavelli, J. S., Göransson, U., Gruber, C. W., Haft, D. H., Hemscheidt, T. K., Hertweck, C., Hill, C., Horswill, A. R., Jaspars, M., Kelly, W. L., Klinman, J. P., Kuipers, O. P., Link, A. J., Liu, W., Marahiel, M. A., Mitchell, D. A., Moll, G. N., Moore, B. S., Müller, R., Nair, S. K., Nes, I. F., Norris, G. E., Olivera, B. M., Onaka, H., Patchett, M. L., Piel, J., Reaney, M. J., Rebuffat, S., Ross, R. P., Sahl, H. G., Schmidt, E. W., Selsted, M. E., Severinov, K., Shen, B., Sivonen, K., Smith, L., Stein, T., Süssmuth, R. D., Tagg, J. R., Tang, G. L., Truman, A. W., Vederas, J. C., Walsh, C. T., Walton, J. D., Wenzel, S. C., Willey, J. M., van der Donk, W. A. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: overview and recommendations for a universal nomenclature. *Nat. Prod. Rep.* **30**, 108-160 (2013)
- 122) Rogers, L. A., Whittier, E. O. Limiting factors in the lactic fermentation. *J. Bacteriol.* **16**, 211-229 (1928)
- 123) Schnell, N., Entian, K.-D., Schneider, U., Götz, F., Zahner, H., Kellner, R., Jung, G. Prepeptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with four sulphide-rings. *Nature* **333**, 276-278 (1988)
- 124) Freeman, M. F., Gurgui, C., Helf, M. J., Morinaka, B. I., Uria, A. R., Oldham, N. J., Sahl, H. G., Matsunaga, S., Piel, J. Metagenome mining reveals polytheonamides as posttranslationally modified ribosomal peptides. *Science* **338**, 387-390 (2012)
- 125) Marahiel, M. A., Stachelhaus, T., Mootz, H. D. Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **10**, 2651-2674 (1997)
- 126) Stachelhaus, T., Mootz, H. D., Marahiel, M. A. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493-505 (1999)
- 127) Gulick, A. M. Conformational dynamics in the acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem. Biol.* **4**, 811-827 (2009)

- 128) Schwarzer, D., Finking, R., Marahiel, M. A. Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 275-287 (2003)
- 129) Lanea, A. L., Moore, B. S. A sea of biosynthesis: marine natural products meet the molecular age. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 411-428 (2011)
- 130) Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N., Matsunaga, S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 16222-16227 (2004)
- 131) Fisch, K. M., Gurgui, C., Heycke, N., van der Sar, S. A., Anderson, S. A., Webb, V. L., Taudien, S., Platzer, M., Rubio, B. K., Robinson, S. J., Crews, P., Piel, J. Polyketide assembly lines of uncultivated sponge symbionts from structure-based gene targeting. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 494-501 (2009)
- 132) Schirmer, A., Gadkari, R., Reeves, C. D., Ibrahim, F., DeLong, E. F., Hutchinson, C. R. Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissolute*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4840-4849 (2005)
- 133) Torsvil, V., Ovreas, L., Thingstad, T. F. Prokaryotic diversity-magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* **296**, 1064-1066 (2002)
- 134) Gans, J., Wolinsky, M., Dunbar, J. Computational improvements reveal great bacterial diversity and high metal toxicity in soil. *Science* **309**, 1387-1389 (2005)
- 135) Handelsman, J. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 669-685 (2004)
- 136) Brady, S. F., Simmons, L., Kim, J. H., Schmidt, E. W. Metagenomic approaches to natural products from free-living and symbiotic organisms. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1488-1503 (2009)
- 137) Wang, G. Y., Graziani, E., Waters, B., Pan, W., Li, X., McDermott, J., Meurer, G., Saxena, G., Andersen, R. J., Davies, J. Novel natural products from soil DNA libraries in a streptomycete host. *Org. Lett.* **10**, 2401-2404 (2000)
- 138) He, R., Wakimoto, T., Takeshige, Y., Egami, Y., Kenmoku, H., Ito, T., Wang, B., Asakawa, Y., Abe, I. Porphyrins from a metagenomic library of the marine sponge *Discodermia calyx*. *Mol. Biosyst.* **6**, 2334-2338 (2012)
- 139) Davidson, S. K., Allen, S. W., Lim, G. E., Anderson, C. M., Haygood, M. G. Evidence for the biosynthesis of bryostatins by the bacterial symbiont "*Candidatus Endobugula sertula*" of the bryozoan *Bugula neritina*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 4531-4537 (2001)
- 140) Seow, K. T., Meurer, G., Gerlitz, M., Wendt-Pienkowski, E., Hutchinson, C. R., Davies, J. A study of iterative type II polyketide synthases, using bacterial genes cloned from soil DNA: a means to access and use genes from uncultured microorganisms. *J. Bacteriol.* **179**, 7360-7368 (1997)
- 141) Fieseler, L., Hentschel, U., Grozdanov, L., Schirmer, A., Wen, G., Platzer, M., Hrvatin, S., Butzke, D., Zimmermann, K., Piel, J. Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Environ. Microbiol.* **8**, 921-927 (2004)

- 142) Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B., Müller, R. Metabolic diversity in myxobacteria: identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide-(poly)peptide gene cluster from the epothilone producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim. Biophys. Acta.* **1445**, 185-195 (1999)
- 143) Ginolhac, A., Jarrin, C., Gillet, B., Robe, P., Pujic, P., Tuphile, K., Bertrand, H., Vogel, T. M., Perrière, G., Simonet, P., Nalin, R. Phylogenetic analysis of polyketide synthase I domains from soil metagenomic libraries allows selection of promising clones. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5522-5527 (2004)
- 144) Moffitt, M. C., Neilan, B. A. Evolutionary affiliations within the superfamily of ketosynthases reflect complex pathway associations. *J. Mol. Evol.* **56**, 446-457 (2003)
- 145) Nguyen, T., Ishida, K., Jenke-Kodama, H., Dittmann, E., Gurgui, C., Hochmuth, T., Taudien, S., Platzer, M., Hertweck, C., Piel, J. Exploiting the mosaic structure of trans-acyltransferase polyketide synthases for natural product discovery and pathway dissection. *Nat. Biotechnol.* **26**, 225-233 (2008)
- 146) Hrvatin, S., Piel, J. Rapid isolation of rare clones from highly complex DNA libraries by PCR analysis of liquid gel pools. *J. Microbiol. Methods* **68**, 434-436 (2007)
- 147) Simunovic, V., Zapp, J., Rachid, S., Krug, D., Meiser, P., Müller, R. Myxovirescin A biosynthesis is directed by hybrid polyketide synthases/nonribosomal peptide synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases, and trans-acting acyltransferases. *ChemBioChem* **7**, 1206-1220 (2006)
- 148) Ayuso-Sacido, A., Genilloud, O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb. Ecol.* **49**, 10-24 (2005)
- 149) Partida-Martinez, L. P., Hertweck, C. A gene cluster encoding rhizoxin biosynthesis in "*Burkholderia rhizoxina*", the bacterial endosymbiont of the fungus *Rhizopus microspores*. *ChemBioChem* **8**, 41-45 (2007)
- 150) Tang, M.-C., He, H.-Y., Zhang, F., Tang, G.-L. Baeyer-Villiger oxidation of acyl carrier protein-tethered thioester to acyl carrier protein-linked thiocarbonate catalyzed by a monooxygenase domain in FR901464. *ACS Catal.*, **3**, 444-447 (2013)
- 151) Haines, A. S., Dong, X., Song, Z., Farmer, R., Williams, C., Hothersall, J., Płoskoń E., Wattana-amorn, P., Stephens, E. R., Yamada, E., Gurney, R., Takebayashi, Y., Masschelein, J., Cox, R. J., Lavigne, R., Willis, C. L., Simpson, T. J., Crosby, J., Winn, P. J., Thomas, C. M., Crump, M. P. A conserved motif flags acyl carrier proteins for β -branching in polyketide synthesis. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 685-692 (2013)
- 152) Tang, G. L., Cheng, Y. Q., Shen, B. Polyketide chain skipping mechanism in the biosynthesis of the hybrid nonribosomal peptide-polyketide antitumor antibiotic leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J. Nat. Prod.* **69**, 387-393 (2006)
- 153) Chen, X. H., Vater, J., Piel, J., Franke, P., Scholz, R., Schneider, K., Koumoutsis, A., Hitzeroth, G., Grammel, N., Strittmatter, A. W., Gottschalk, G., Süssmuth, R. D., Borriss, R.

- Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42. *J. Bacteriol.* **188**, 4024-4436 (2006)
- 154) Perlova, O., Gerth, K., Kaiser, O., Hans, A., Müller, R. Identification and analysis of the chivosazol biosynthetic gene cluster from the myxobacterial model strain *Sorangium cellulosum* So ce56. *J. Biotechnol.* **121**, 174-191 (2006)
- 155) Butcher, R. A., Schroeder, F. C., Fischbach, M. A., Straight, P. D., Kolter, R., Walsh, C. T., Clardy, J. The identification of bacillaene, the product of the PksX megacomplex in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**, 1506-1509 (2007)
- 156) Müller, I., Weinig, S., Steinmetz, H., Kunze, B., Veluthoor, S., Mahmud, T., Müller, R. A unique mechanism for methyl ester formation via an amide intermediate found in myxobacteria. *ChemBioChem* **7**, 1197-1205 (2006)
- 157) Wilson, M. C., Mori, T., Rückert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. A. E., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crüsemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., Piel, J. An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **506**, 58-62 (2014)
- 158) Thompson, J. E., Barrow, K. D., Faulkner, D. J. Localization of two brominated metabolites, aerothionin and homoaerothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongia thiona*). *Acta Zool.* **64**, 199-210 (1983)
- 159) Matsunaga, S., Fusetani, N., Konosu, S. Bioactive marine metabolites VI. Structure elucidation of discodermin a, an antimicrobial peptide from the marine sponge *Discodermia kiiensis*. *Tetrahedron Lett.* **25**, 5165-5168 (1984)
- 160) Waisvisz, J. M., van der Hoeven, M. G., van Peppen, J., Zwennis, W. C. M. Botbromycin. I. A New sulfur-containing antibiotic. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4520-4521 (1957)
- 161) Unson, M. D., Holland, N. D., Faulkner, D. J. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline metabolite in the sponge tissue. *Mar. Biol.* **119**, 1-11 (1994)
- 162) Bewley, C. A., Holland, N. A., Faulkner, D. J. Two classes of metabolites from *Theonella swinhoei* are localized in distinct populations of bacterial symbionts. *Experientia* **52**, 716-722 (1996)
- 163) Schmidt, E. W., Obratsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., Haygood, M. G. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel δ -proteobacterium, "*Candidatus* Enttheonella palauensis". *Mar. Biol.* **136**, 969-977 (2000)
- 164) Sakai, R., Yoshida, K., Kimura, A., Koike, K., Jimbo, M., Koike, K., Kobiyama, A., Kamiya, H. Cellular origin of dysiherbaine, an excitatory amino acid derived from a marine sponge. *ChemBioChem* **9**, 543-551 (2008)
- 165) Flatt, P. M., Gautschi, J. T., Thacker, R. W., Musafija-Girt, M., Crews, P., Gerwick, W. H. Identification of the cellular site of polychlorinated peptide biosynthesis in the marine sponge

- Dysidea (Lamellodysidea) herbacea* and symbiotic cyanobacterium *Oscillatoria spongeliae* by CARD-FISH analysis. *Mar. Biol.* **147**, 761-774 (2005)
- 166) Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* **173**, 697-703 (1991)
- 167) Spiegel, M., Rubinstein, N. A. Synthesis of RNA by dissociated cells of sea urchin embryo. *Exp. Cell Res.* **70**, 423-430 (1972)
- 168) Pernthaler, A., Pernthaler, J., Amann, R. Fluorescence *in situ* hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3094-3101 (2002)
- 169) Amann, R., Fuchs, B. M. Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence *in situ* hybridization techniques. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 339-348 (2008)
- 170) Klitgaard, K., Mølbak, L., Jensen, T. K., Lindboe, C. F., Boye, M. Laser capture microdissection of bacterial cells targeted by fluorescence *in situ* hybridization. *Bio. Techniques* **39**, 864-868 (2005)
- 171) Blanco, L., Bernad, A., Lázaro, J. M., Martín, G., Garmendia, C., Salas, M. Highly efficient DNA synthesis by the phage ϕ 29 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **264**, 8935-8940 (1989)
- 172) Brück, W. M., Sennett, S. H., Pomponi, S. A., Willenz, P., McCarthy, P. J. Identification of the bacterial symbiont *Entotheonella* sp. in the mesohyl of the marine sponge *Discodermia* sp. *ISME J.* **2**, 335-339 (2008)
- 173) Kong, R., Liu, X., Su, C., Ma, C., Qui, R., Tang, L. Elucidation of the biosynthetic gene cluster and the post-PKS modification mechanism for fostriecin in *Streptomyces pulveraceus*. *Chem. Biol.* **20**, 45-54 (2013)
- 174) Oliynyk, M., Stark, C. B., Bhatt, A., Jones, M. A., Hughes-Thomas, Z. A., Wilkinson, C., Oliynyk, Z., Demydchuk, Y., Staunton, J., Leadlay, P. F. Analysis of the biosynthetic gene cluster for the polyether antibiotic monensin in *Streptomyces cinnamonensis* and evidence for the role of *monB* and *monC* genes in oxidative cyclization. *Mol. Microbiol.* **49**, 1179-1190 (2003)
- 175) Gallimore, A. R., Stark, C. B., Bhatt, A., Harvey, B. M., Demydchuk, Y., Bolanos-Garcia, V., Fowler, D. J., Staunton, J., Leadlay, P. F., Spencer, J. B. Evidence for the role of the *monB* genes in polyether ring formation during monensin biosynthesis. *Chem. Biol.* **13**, 453-460 (2006)
- 176) Frank, B., Knauber, J., Steinmetz, H., Scharfe, M., Blöcker, H., Beyer, S., Müller, R. Spiroketal polyketide formation in *Sorangium*: identification and analysis of the biosynthetic gene cluster for the highly cytotoxic spirangienes. *Chem. Biol.* **14**, 221-233 (2007)
- 177) Takahashi, S., Toyoda, A., Sekiyama, Y., Takagi, H., Nogawa, T., Uramoto, M., Suzuki, R., Koshino, H., Kumano, T., Panthee, S., Dai, T., Ishikawa, J., Ikeda, H., Sakaki, Y., Osada, H. Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 461-468 (2011)

- 178) Minami, A., Shimaya, M., Suzuki, G., Migita, A., Shinde, S. S., Sato, K., Watanabe, K., Tamura, T., Oguri, H., Oikawa, H. Sequential enzymatic epoxidation involved in polyether lasalocid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7246-7249 (2012)
- 179) Bak, S., Kahn, R. A., Nielsen, H. L., Møller, B. L., Halkier, B. A. Cloning of three A-type cytochromes P450, CYP71E1, CYP98, and CYP99 from *Sorghum bicolor* (L.) Moench by a PCR approach and identification by expression in *Escherichia coli* of CYP71E1 as a multifunctional cytochrome P450 in the biosynthesis of the cyanogenic glucoside dhurrin. *Plant Mol. Biol.* **36**, 393-405 (1998)
- 180) Olano, C., Moss, S. J., Brana, A. F., Sheridan, E. M., Math, V., Weston, A. J., Mendez, C., Leadlay, P. F., Wilkinson, B., Salas, J. A. Biosynthesis of the angiogenesis inhibitor borrelidin by *Streptomyces parvulus* Tu4055: insights into nitrile formation. *Mol. Microbiol.* **52**, 1745-1756 (2004)
- 181) MaCarty, R. M., Somogyi, A., Lin, G., Jacobsen, N. E., Bandarian, V. The deazapurine biosynthetic pathway revealed: in vitro enzymatic synthesis of preQ₀ from guanoside 5'-triphosphate in four steps. *Biochemistry* **48**, 3847-3852 (2009)
- 182) MaCarty, R. M., Bandarian, V. Deciphering deazapurine biosynthesis: pathway for pyrrolopyrimidine nucleosides toyocamycin and sangivamycin. *Chem. Biol.* **15**, 790-798 (2008)
- 183) Scherlach, K., Brendel, N., Ishida, K., Dahse, H.-M., Hertweck, C. Photochemical oxazole-nitrile conversion downstream of rhizoxin biosynthesis and its impact on antimitotic activity. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 5756-5759 (2012)
- 184) Gomes, P. B., Nett, M., Dahse, H.-M., Sattler, I., Martin, K., Hertweck, C. Bezerramycins A-C, antiproliferative phenoxazinones from *Streptomyces griseus* featuring carboxy, carboxamide or nitrile substituents. *Eur. J. Org. Chem.* **2**, 231-235 (2010)
- 185) Reissmann, S., Hochleiter, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. S., Böck, A. Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science* **299**, 1067-1070 (2003)
- 186) Swanson, K. D., Duffus, B. R., Beard, T. E., Peters, J. W., Broderick, J. B. Cyanide and carbon monoxide ligand formation in hydrogenase biosynthesis. *Eur. JIC.* **2011**, 935-947 (2011)
- 187) Wright, G. D., Thompson, P. R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Front. Biosci.* **4**, 9-21 (1999)
- 188) Izard, T., Ellis, J. The crystal structures of chloramphenicol phosphotransferase reveal a novel inactivation mechanism. *EMBO J.* **19**, 2690-2700 (2000)
- 189) Nishimura, K., Kanemori, M., Kiatagawa, M., Yanagi, H., Yura, T. Chaperone coexpression plasmids: Differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GroE and GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1694-1699 (1998)
- 190) Paul, V. J., Van Alstyne, K. L. Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **160**, 191-203 (1992)

- 191) Sugiyama, N., Konoki, K., Tachibana, K. Isolation and characterization of okadaic acid binding proteins from the marine sponge *Halichondria okadae*. *Biochemistry* **46**, 11410-11420 (2007)
- 192) Konoki, K., Saito, K., Matsuura, H., Sugiyama, N., Cho, Y., Yamashita, M. Y., Tachibana, K. Binding of diarrhetic shellfish poisoning toxins to okadaic acid binding proteins purified from the sponge *Halichondria okadae*. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 7607-7610 (2010).
- 193) Wittstock, U., Gershenzon, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 300-307 (2002)
- 194) Teeyapant, R., Proksch, R. Biotransformation of brominated compounds in the marine sponge *Verongia aerophoba* - evidence for an induced chemical defense? *Naturwissenschaften* **80**, 369-370 (1993)
- 195) Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H. J., Proksch, P. Wound activation of protoxins in marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J. Chem. Ecol.* **23**, 1451-1462 (1997)
- 196) Thoms, C., Schupp, P. J. Activated chemical defense in marine sponges—a case study on *Aplysinella rhax*. *J. Chem. Ecol.* **34**, 1242-1252 (2008)
- 197) Dynlacht, B. D. Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle. *Nature* **389**, 149-152 (1997)
- 198) Krell, T., Lacal, J., Busch, A., Silva-Jiménez, H., Guazzaroni, M. E., Ramos, J. L. Bacterial sensor kinases: Diversity in the recognition of environmental signals. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**, 539-559 (2010)
- 199) Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kornberg, A. Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* **293**, 705-708 (2001)
- 200) Ishikawa, J., Hotta, K. FramePlot: a new implementation of the Frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**, 251-253 (1999)
- 201) Bachmann, B. O., Ravel, J. Methods for *in silico* prediction of microbial polyketide and nonribosomal peptide biosynthetic pathways from DNA sequence data. *Methods Enzymol.* **458**, 181-217 (2009)
- 202) Kumar, S., Tamura, K., Nei, M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers. *Comput. Appl. Biosci.* **10**, 189-191 (1994)
- 203) Saitou, N., Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-525 (1987)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導ならびにご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室教授阿部郁朗先生に心より感謝の意を表します。また、修士課程修了後の私を研究員として受け入れて下さり、多くの貴重な経験と様々なチャンスを与えて下さいましたことに重ねて御礼申し上げます。

本論文を執筆するにあたり、貴重なご助言ならびにご討論を賜りました東京大学大学院薬学系研究科有機反応化学教室教授井上将行先生、有機合成化学教室教授金井求先生、生体分析化学教室教授船津高志先生、蛋白構造生物学教室教授清水敏之先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、終始温かいご指導ならびにご討論を賜りました東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室准教授脇本敏幸先生に心より御礼申し上げます。また、学部生の頃より長期に渡って自然科学の魅力や研究の奥深さをご教授下さいましたことに併せて感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、タンパク質の異種発現において貴重なご助言と多くの励ましのお言葉を賜りました富山大学和漢医薬学総合研究所天然物化学分野教授森田洋行先生に心より感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、研究全般において有益なご助言を賜りました東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室助教淡川孝義先生、松田侑大先生、森貴裕先生に深く感謝致します。

本研究に着手した当初から数々の貴重なご助言を賜り、また、KS ドメインの *clade* 解析にご協力いただきましたスイス連邦工科大学チューリッヒ校 (ETH Zürich) 教授 Jörn Piel 先生に心より感謝の意を表します。タンパク質の異種発現において懇切丁寧なご助言を賜りました同研究室博士研究員 Michel F. Freeman 博士に深く感謝致します。

次世代シーケンサーGenome Analyzer II (Illumina) による *cal* 遺伝子の解析を行って頂きました徳島文理大学薬学部教授浅川義範先生、講師伊藤卓也先生 (現 富山大学和漢医薬学総合研究所天然物化学分野准教授)、助教兼目裕充先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、貴重なご助言を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科水圏天然物化学教室教授永松茂樹先生に深く感謝致します。海綿共生微生物の観察ならびに海綿採集にご協力いただきました同研究室助教高田健太郎先生に心より感謝申し上げます。

海綿の同定ならびに海綿採集にご協力いただきました名古屋大学大学院理学研究科付属臨海実験所特任助教伊勢優史先生に厚く御礼申し上げます。

マウス白血病細胞 P388 を分与して頂きました東京大学大学院理学系研究科天然物化学教室助教福沢世傑先生に心より感謝致します。

本研究を遂行するにあたり、calyculin 生産菌の特定実験において精力的にご尽力いただきました東京大学大学院薬学系研究科天然物化学教室修士過程 2 年生中嶋優くに心より感謝致します。修飾酵素の機能解析で用いた calyculinamide A の半合成を行って頂きました同研究室修士課程 2 年生脇本行彦くに厚く御礼申し上げます。同研究室教室員の皆様には、日々、多くのご助言を賜り、また、皆様の存在に励まされ、勇気づけられることが多々ありました。心より感謝の意を表します。

研究者としての姿勢をご教授下さり、公私に渡って温かく励まして下さいました東京大学生物生産工学センター細胞機能工学研究室教授西山真先生、同大学農学生命科学研究科保全生態学研究室准教授吉田薫先生、同大学生物情報工学研究室助教角越和也先生に心より感謝致します。

最後に、東京での研究生活を理解し、支えてくれた父悦生、母和代、兄姉圭、江梨香、頌、理恵、祖父銀蔵、祖母公子に深く感謝の意を表します。

平成 27 年 3 月

江上 蓉子