HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Aspergillus oryzae異種発現系を用いた糸状菌由来二次代謝産物の全生合成研究
Author(s)	藤居, 瑠彌
Citation	北海道大学. 博士(理学) 甲第11921号
Issue Date	2015-03-25
DOI	10.14943/doctoral.k11921
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/63039
Type	theses (doctoral)
File Information	Ryuya_Fujii.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Aspergillus oryzae 異種発現系を用いた糸状菌由来二次代謝産物の全生合成研究

北海道大学大学院　総合化学院　有機反応論研究室

藤居　瑠彌

2015 年　博士論文

目次

序章
１．糸状菌の生産する二次代謝産物 4
２．糸状菌生合成遺伝子の探索方法 6
３．糸状菌生合成遺伝子の異種発現例 7
４．*Aspergillus oryzae* 異種発現系 9
参考文献

１章 *A. oryzae* 異種発現系を用いた生合成遺伝子機能解析法の確立
1-1. 天然物の異種生産の方法論 16
1-2. aphidicolin の全生合成の検討 17
1-3. 実験結果と考察 22
1-4. 迅速プラスミド構築法の発展 31
参考文献

２章　ポリケタイドの全生合成研究
2-1. ポリケタイド合成酵素 43
2-2. solanapyrone の全生合成の検討 48
2-3. 実験結果と考察 49
2-4. cytochalasin E 生合成研究の背景 64
2-5. 実験結果と考察 67
参考文献

３章 nonadride 系天然物の生合成機構の解明
3-1. phomoidride 生合成研究の背景 78
3-2. 実験結果と考察 81
3-3. *Talaromyces stipitatus* に存在する nonadride 生合成遺伝子のゲノムマイニング 88
3-4. 異種発現および各形質転換体の代謝産物の解析 90
3-5. CS、MCD の *in vitro* 活性試験 92
3-6. 糸状菌が生産する酸無水物型天然物の普遍的生合成経路の提唱 101
参考文献

４章　experimental section　111
4-1. Strains and culture condition
4-2. Preparation of genomic DNA (gDNA) and complementary DNA (cDNA)
4-3. Cloning
4-4. Fungal transformation
4-5. Production and analysis of the metabolites
4-6. Overexpression and purification of CS and MCD
4-7. CS and MCD assays
4-8. Substrate synthesis
4-9. Structure determination
4-10. NMR spectra
4-11. Predicted sequences of *sol6* gene by NCBI and 2ndFind
References

５章　総括　159

謝辞　164

序章

1.　糸状菌の生産する二次代謝産物

生物の体内では、アミノ酸や脂肪酸、糖など、一次代謝産物とよばれる、生命維持に欠かせない化合物が生合成されている。これに対して二次代謝産物には、外敵から身を守るための毒素や、昆虫などを誘引するフェロモン、他生物種を警戒させる色素などが存在する。これらは生命の維持には直接関係しないが、様々な目的のため、一次代謝産物を原料として生合成される。二次代謝産物は、それらを原料とする一次代謝産物からポリケタイド、テルペノイド、アルカロイドなどに分類される。生物が二次代謝産物の生合成に使用する原料の種類は比較的限定されており、それらを組み合わせることで驚くほど多種多様なものを作ることができる[1]。

二次代謝産物の生合成に利用される重要な原料は、アセチル CoA、シキミ酸、メバロン酸、1-デオキシキシルロース 5-リン酸に由来する(図 1)。これらはそれぞれ、酢酸経路、シキミ酸経路、メバロン酸経路、デオキシキシルロースリン酸経路(非メバロン酸経路)の基盤となる化合物である。酢酸経路からは、フェノール類、プロスタグランジン類、マクロライド系抗生物質、ドコサヘキサエン酸などの不飽和脂肪酸が供給される。シキミ酸経路は、芳香族アミノ酸を供給するのに重要な役割を担い、得られる二次代謝産物は、多様なフェノール類、けい皮酸誘導体、リグナン類、アルカロイドなどがある。メバロン酸経路とデオキシキシルロースリン酸経路は、膨大な数のテルペノイドやステロイドの生合成に関与している。このほかに、生合成原料として重要なものに、アミノ酸があり、シキミ酸経路以外で生合成されるアミノ酸は解糖系および Krebs 回路の中間体から供給される。得られる二次代謝産物には、環状ペプチドやアルカロイドなどが知られる。

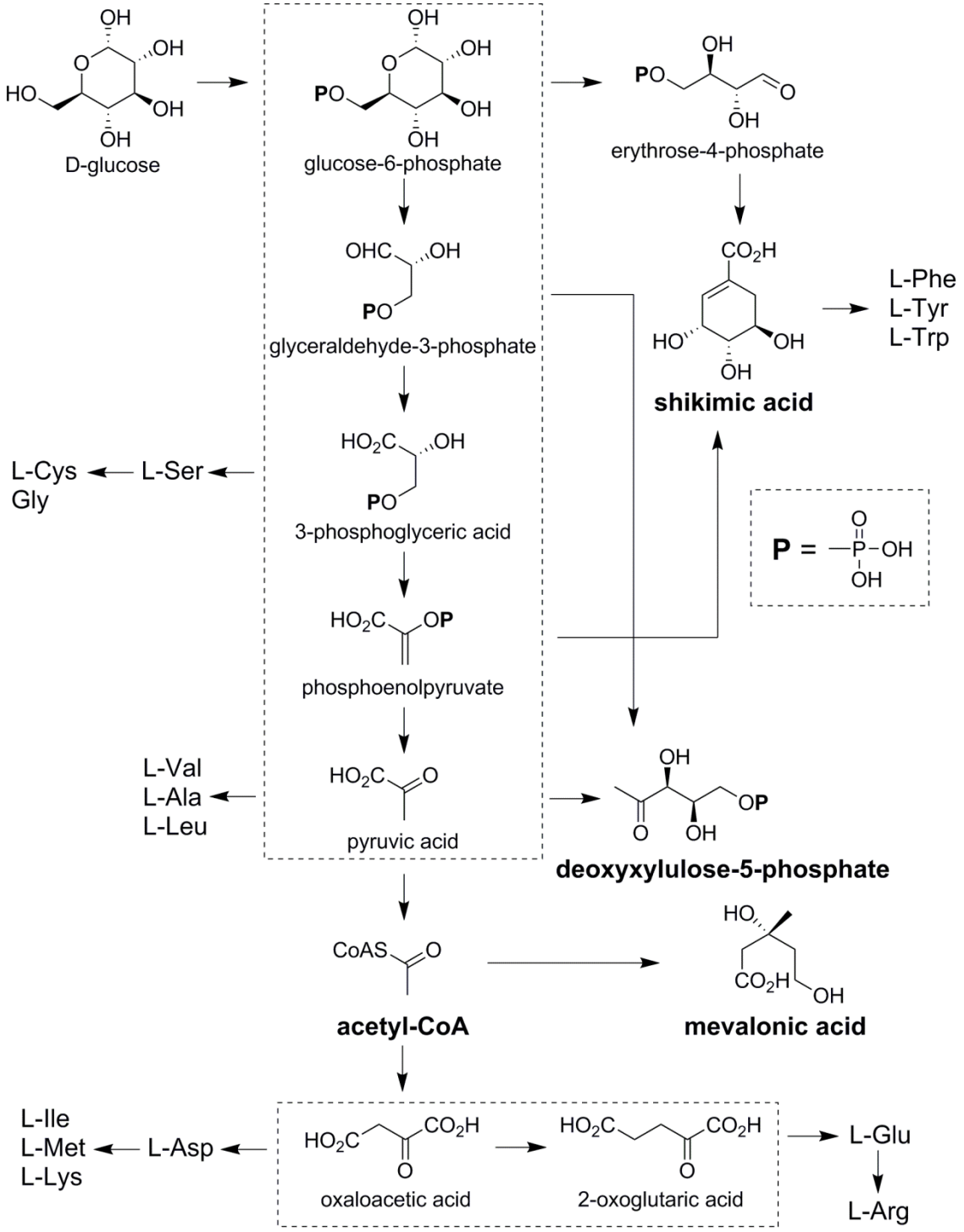


図 1.　二次代謝産物の生合成原料

カビに代表される糸状菌が生産する二次代謝産物には、複雑な骨格を持ち、顕著な生理活性を示す化合物が数多く存在する(図 2)。コレステロール低下剤 lovastatin(ポリケタイド)や抗生物質 penicillin 類(非リボソーム依存型ペプチ

ド)、植物ホルモン gibberellin 類(テルペノイド)はその代表例である。このように顕著な活性をもつ糸状菌天然物は、医薬品や農薬のリード化合物として研究されてきた。天然物の生合成では、初めに骨格を構築する酵素が働き、次に様々な修飾酵素が母骨格を官能基化する。それらの反応機構は学術的に興味深く、多くの研究者が天然物の生合成機構の解析を行ってきた。

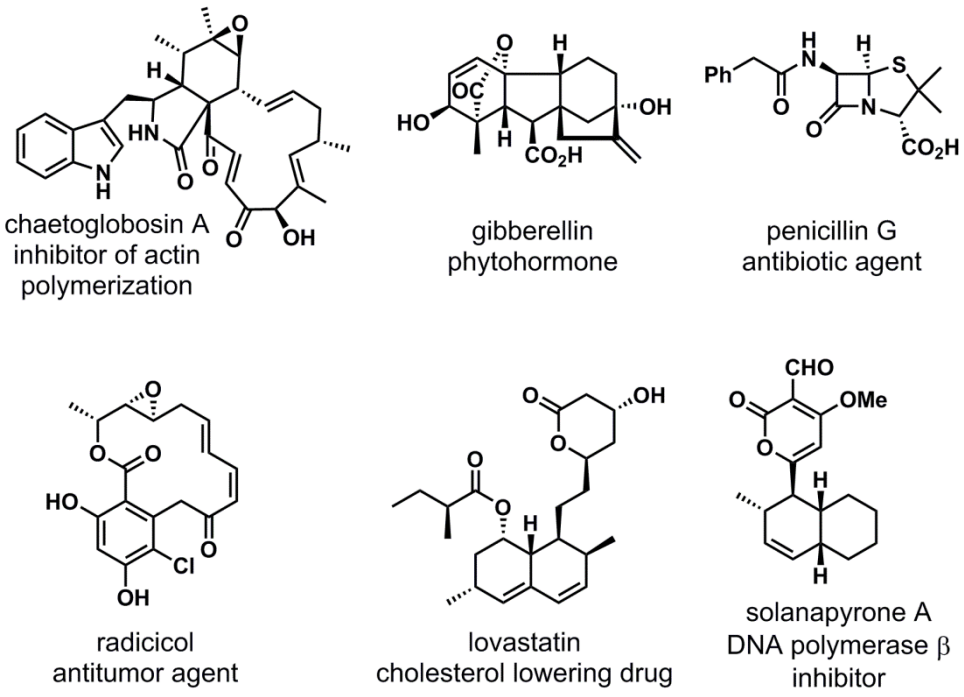


図 2.　糸状菌由来二次代謝産物の構造と生理活性

2.　糸状菌天然物生合成研究における遺伝子レベルの解析

糸状菌天然物の生合成研究に関しては、長年の実験結果の蓄積があり、骨格構築や修飾などの大まかな生合成経路が解明されている。遺伝子レベルの研究も 1990 年代入って次第に活発になってきたが、2000 年代に複数の糸状菌ゲノム解析により、天然物生合成遺伝子がゲノム上の特定の領域に集合して、遺伝子クラスターとして存在することが明らかになった[2](図 3)。2010 年代に次世代シーケンサーが普及すると、従来の研究で最大の律速段階となっていたクラスターの探索が容易になり、ゲノムデータから必要なクラスターを絞り込む手法が一般化してきた。すなわち、実験的に機能解析された酵素などを利用した BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)による相同性検索を用いることで、機能未知の遺伝子でも、その機能を推測できるようになった。現在では、2ndFind、antiSMASH、SMURF など天然物生合成遺伝子クラスター予測プログラムも多数開発されている。これらにより、無数にある遺伝子情報の中から、どの遺伝子が生合成に関わるかも判別できるようになった。ここで得られた遺伝子情報

と天然物を対応させられれば、有用な活性を持つ糸状菌天然物の大量供給や、新規天然物の発掘につながるはずである。

上述のように天然物生合成に関わるクラスターが予測できると、次にその同定を行なう必要がある。一般に同定に使われるのは、遺伝子破壊と異種発現の二種類の方法が知られる。遺伝子破壊は、標的遺伝子を相同組換えによって欠損させ、破壊前後の代謝産物の違いを調べる手法である。有効な手法であるが、個々の微生物ごとに形質転換条件を検討する必要があることや、破壊により注目する天然物が生産しないことが確認できても、予想される中間体が単離されなかったり、生産量が低下するなど有用な情報が得られないなどの問題もある。一方、異種発現は、目的遺伝子を遺伝子操作や培養方法が確立した宿主に移し、酵素の発現により代謝産物を獲得し、遺伝子の機能を解析する手法である。この手法でも、目的遺伝子が機能するかどうかは導入してみないと分からないが、発現により期待される生成物を生産する場合が多い。

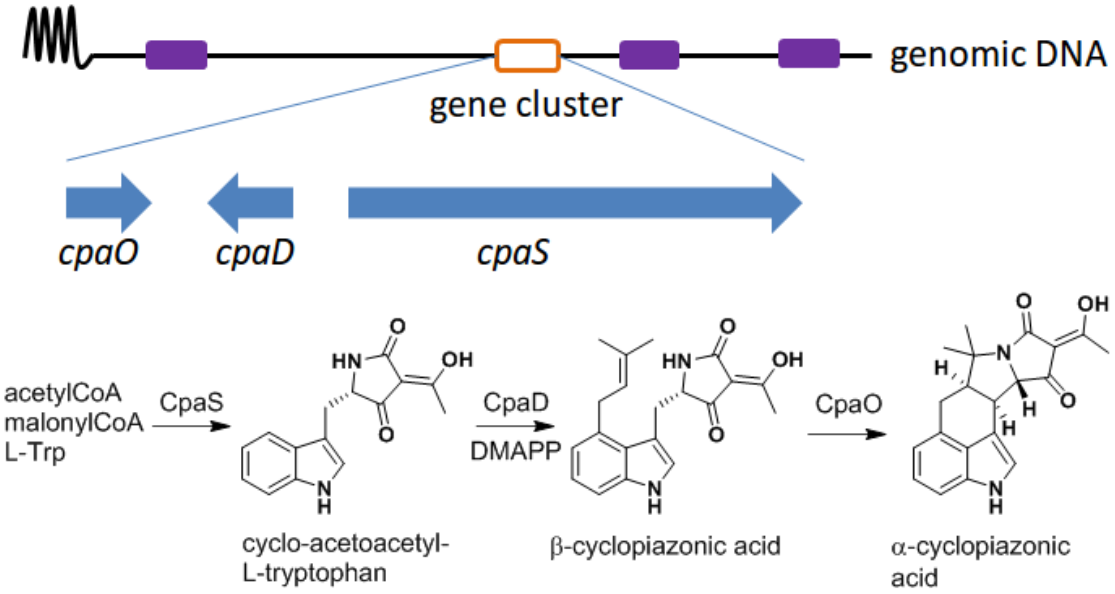


図 3.　糸状菌天然物の生合成遺伝子クラスターの例[3]

3.　糸状菌生合成遺伝子の異種発現による機能解析例

1996 年、東大の Fujii(現岩手医大)らは、*Aspergillus terreus* の機能未知ポリケタイド合成酵素(PKS)遺伝子 *atX* を、*Aspergillus nidulans* に導入し 6-methylsalicylic acid を生合成することを突き止めた[4]。これは、糸状菌の遺伝子を同じ糸状菌宿主に移し、二次代謝産物と生合成遺伝子を対応させた初めての例となった。

1999 年には Hutchinson らが、*A. terreus* の生産する lovastatin の生合成遺伝子 *lovB*(ポリケタイド合成酵素;PKS)、*lovC*(α,β–不飽和還元酵素;ER)を、同

じく *A. nidulans* を宿主に用いて異種発現した[5]。これにより、還元型 PKS による骨格構築経路が明らかになり(図 4)、Diels-Alder 反応を含む生合成機構について知見が得られた。

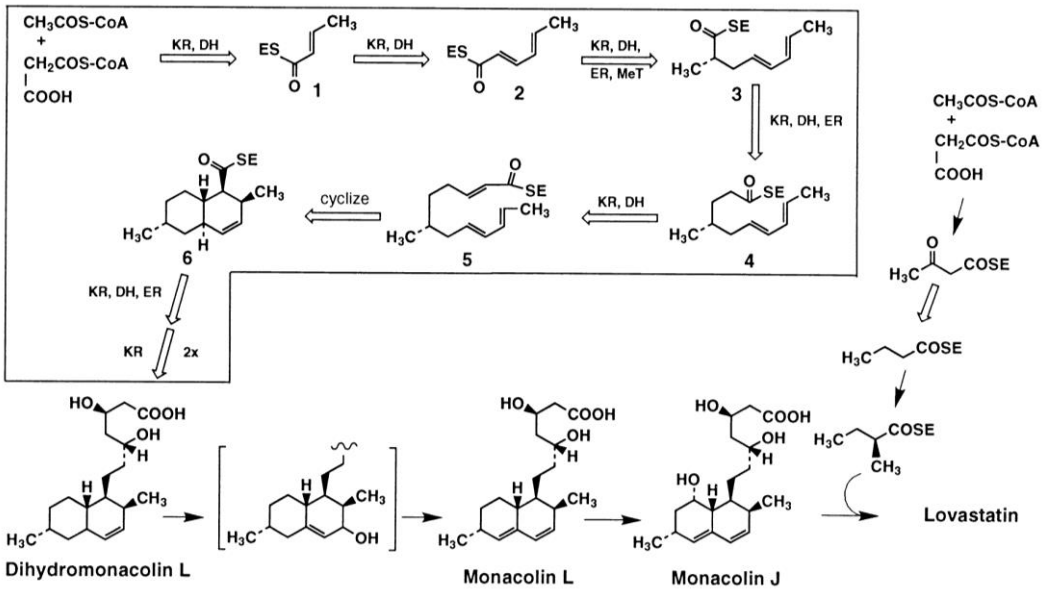


図 4.　糸状菌宿主を用いた研究で明らかになった lovastatin の生合成経路

糸状菌遺伝子を発現する宿主として、糸状菌以外にも大腸菌や酵母が用いられてきた。代表的な例を挙げると、Tang らは、2009 年に酵母を宿主に用い、lovastatin 合成酵素遺伝子である *lovB*、*lovC* を異種発現した[6]。彼らは、発現したタンパク質を精製し、*in vitro* 実験を行うことで、LovB の詳細な反応機構を解析した(図 5)。

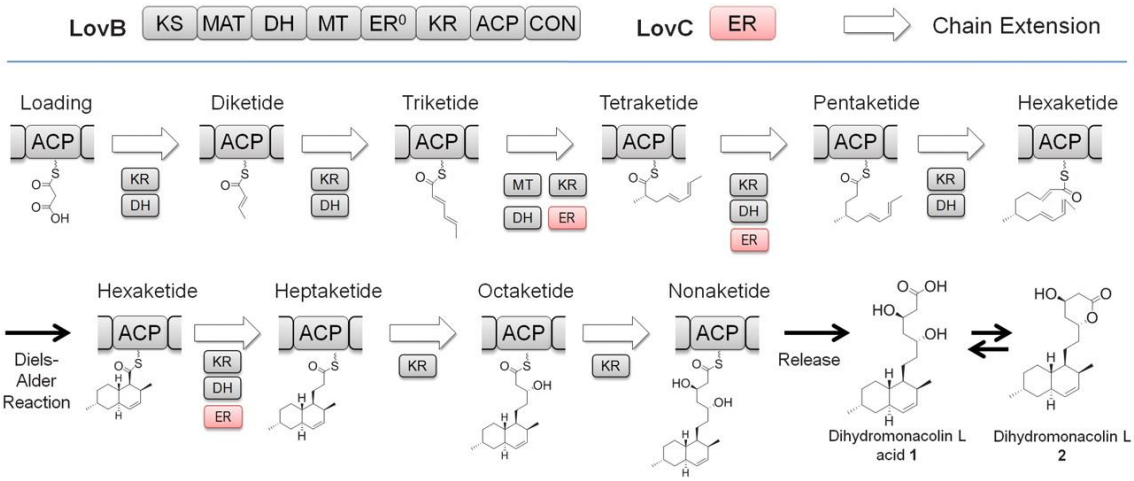


図 5.　酵母発現系を用いた *in vitro* 解析によって証明された LovB の反応機構

糸状菌の翻訳機構では、ゲノム DNA から転写された mRNA 前駆体は、スプライシングされイントロン配列が除去される。その後、翻訳されて対応した酵素が作られる。このため原核生物である大腸菌や、同じ真核生物でもスプライシング機構が異なる酵母を用いて、糸状菌天然物の生合成遺伝子を発現するには、mRNA を逆転写した cDNA を入手する必要がある。そのためには、注目する天然物が生産する培養条件を検討しなければならない。これに対し、*A. oryzae* 異種発現系では、近縁の糸状菌の遺伝子発現であることから、正常にスプライシングされ、活性のある酵素の発現が期待でき、望む生成物が得られることが予想される。

上述のように染色体上に存在する遺伝子クラスターには、通常の培養条件下で転写されない、眠った遺伝子クラスターが数多く存在する。例えば、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* の染色体上には、ポリケタイドや非リボソーム依存型ペプチドなどの生合成遺伝子クラスターは 30 個以上あるが、天然物と対応しているものは 6 個程度しかない[2]。この場合、遺伝子を発現する宿主として糸状菌を使用すると、*A. fumigatus* の 24 個の遺伝子クラスターのように mRNA を調製できない遺伝子の機能解析ができるはずである。すなわち、糸状菌異種発現系は、新規化合物の発掘(ゲノムマイニング)に応用できる可能性を秘めている。

4. *Aspergillus oryzae* 異種発現系

糸状菌のゲノム DNA にコードされる酵素遺伝子を直接導入できる *A. oryzae* や *A. nidulans* を宿主として、糸状菌天然物の生合成に関与する遺伝子の機能解析が行われてきた。清酒生産にも使用される *A. oryzae* は、アミラーゼ生産能力が高く、1 リットルの培養で、数 g 単位で生産できる。これは、酵母のタンパク質分泌生産能力の 100-1000 倍といわれる。従って、*A. oryzae* は真核生物の中でもタンパク質生産能力が高いといえる。これには、アミラーゼ遺伝子を大量に発現させるための強力なプロモーターPamyB が関与している。PamyB は、マルトースやデンプンの存在下で下流の遺伝子の転写を活性化し、グルコースの存在下で発現を抑制するという特徴をもつ。この仕組みを応用し、これまで *A. oryzae* は微生物由来セルラーゼや味覚修飾タンパク質であるネオクリンなど、様々な異種タンパク質の生産に用いられてきた[7]。

A. oryzae M-2-3 (*ΔargB*) は、1998 年に *A. nidulans* の生産する色素 YWA の PKS 遺伝子 *wA* の異種発現に初めて使用された[8]。この *A. oryzae* M-2-3 は、アルギニン生合成遺伝子 *argB* が欠損した栄養要求性変異株であり、マーカー遺伝子(*argB*)を持つ、大腸菌で複製可能な pTAex3 というベクターに、導入したい遺伝子を組込んだプラスミドを用いて形質転換すると、アルギニンの非存在下で注目遺伝子を持つ形質転換体が得られる。この注目遺伝子の導入株を培養して、

目的の色素 YWA の生産株が選抜された。

2000 年代後半には、*A. oryzae* 異種発現用のベクターpPTRI が開発され、複数遺伝子の同時発現が可能となった。2010 年に Kushiro らは、*A. oryzae* M-2-3 に、栄養要求性マーカー*argB* と pyrithiamine 耐性遺伝子マーカー*ptrA* を使用し、ポリケタイドとテルペノイドが融合した構造をもつメロテルペノイド、pyripyropene A の生合成遺伝子 5 種の機能解析を行い、その骨格構築機構を明らかにした[9](図 6-A)。また、同年 Cox らは、PKS-NRPS 遺伝子と下流の酸化酵素遺伝子など、計 4 つの遺伝子を *A. oryzae* M-2-3 で同時に異種発現し、tenellin の全生合成を達成した[10](図 6-B)。この時に使用したマーカー遺伝子は、*argB* の他に glufosinate 耐性遺伝子 *bar* と bleomycin 耐性遺伝子 *ble* の 3 種であった。

糸状菌天然物生産に *A. oryzae* 異種発現系を使用するメリットとして以下のことが挙げられる；1) 糸状菌遺伝子を導入する際のイントロン除去が不要であると予想される。即ち、眠っている遺伝子の機能解析もできる；2) 酸化還元酵素を補完する酵素や翻訳後修飾を行う酵素が備わっている；3) 膜構造が類似しているため、大腸菌では発現できない P450 などの膜タンパク質の機能も解析できる；4) *A. oryzae* は異種生産する化合物を検出するのに邪魔になる二次代謝産物をほとんど作らない。つまり、生体内の基質が他の二次代謝経路に使用されないため、生成物の収量が増加し、検出も容易になる。

2)に関しては、酵母で糸状菌の酵素を発現した場合、補完酵素が正しく機能しない場合がある。例えば、PKS を活性のある状態にするには、酵素に基質を連結する腕となるホスホパントテイン鎖の結合が必須である。詳細は 2 章で述べるが、酵母や大腸菌でこの修飾反応を進行させるには、別途 phosphopantetheinyl transferase を発現させる必要がある。

一方、不利な点としては、以下の点が考えられる；1) 大腸菌や酵母に比べて *A. oryzae* の生育が遅い；2) 形質転換の操作が煩雑である；3) 遺伝子を導入する際に使用可能な選択マーカーが少ない；4) *A. oryzae* 宿主は、数多くの毒物排出用のトランスポーターを有しており、多くの薬剤に耐性を示すため、形質転換体のスクリーニングに適さないものが多いと考えられる。

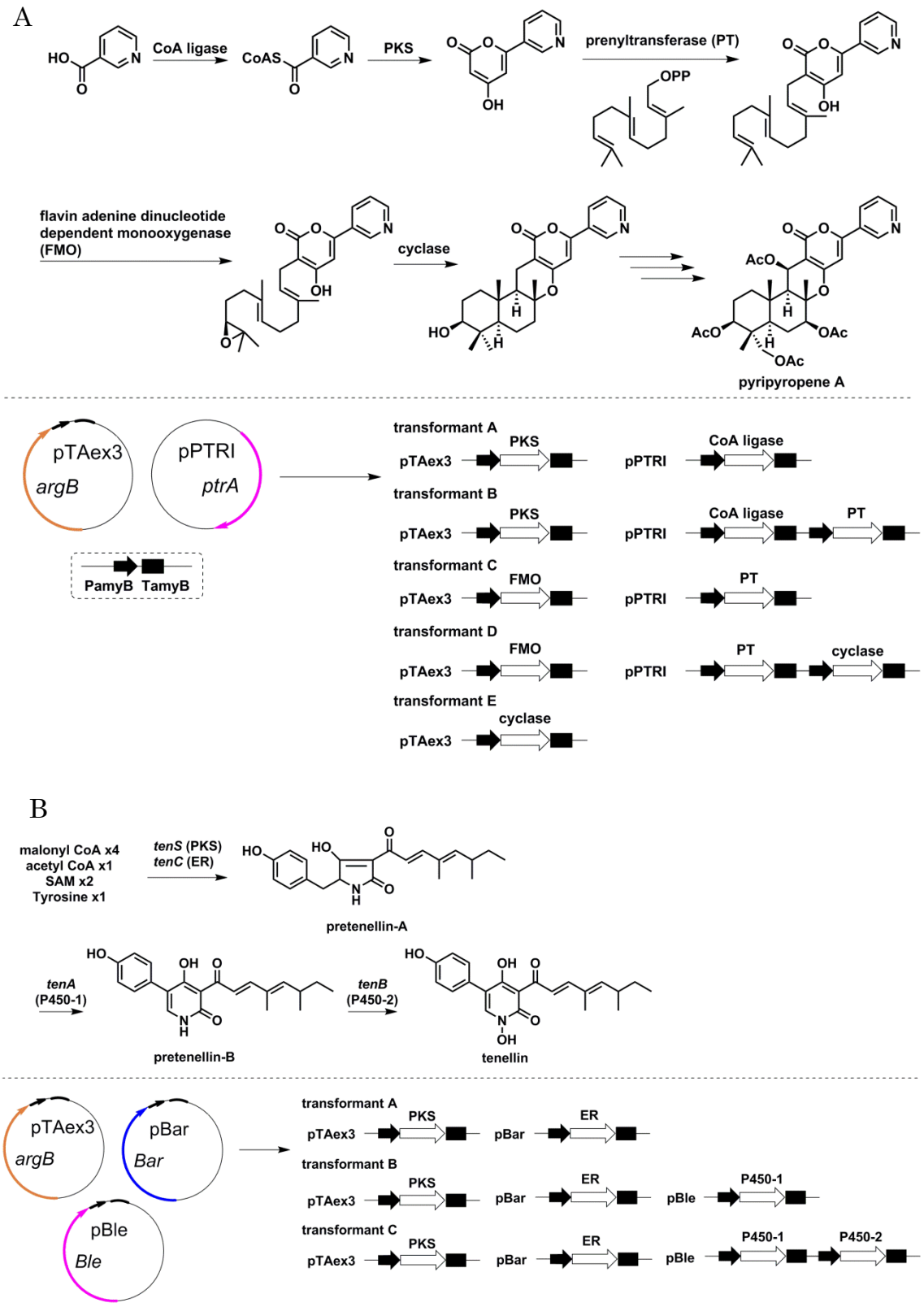


図 6.　A: pyripyropene A 生合成経路と作製した形質転換体の種類；B: tenellin の生合成経路と作製した形質転換体の種類

そこで、本研究では Kitamoto らが開発した *A. oryzae* NSAR1 に着目した。この株は栄養要求性の 4 重変異株(*ΔargB, sC*⁻, *adeA*⁻, *niaD*⁻)で、薬剤耐性マーカー(*ptrA*)を合わせた 5 種のベクターが使用可能である[11]。これにより、一つのベクターに一つの遺伝子を挿入しても、合計 5 種の遺伝子を異種発現できる。さらに近年、本研究に伴い、共同研究者の Gomi らが、2 か所の MCS を持ったベクターを開発した。これにより理論上 10 個の遺伝子を同時に異種発現できるようになった(図 7)。また、同じマーカー遺伝子をもつベクターに別の遺伝子を組み込んだ 2 種類のプラスミドを同時に導入できることも判明したため[12]、異種発現できる遺伝子数は飛躍的に増大した。なお、これらのプラスミドは、宿主の染色体上に挿入され、環状 DNA の形を保持しないものである。

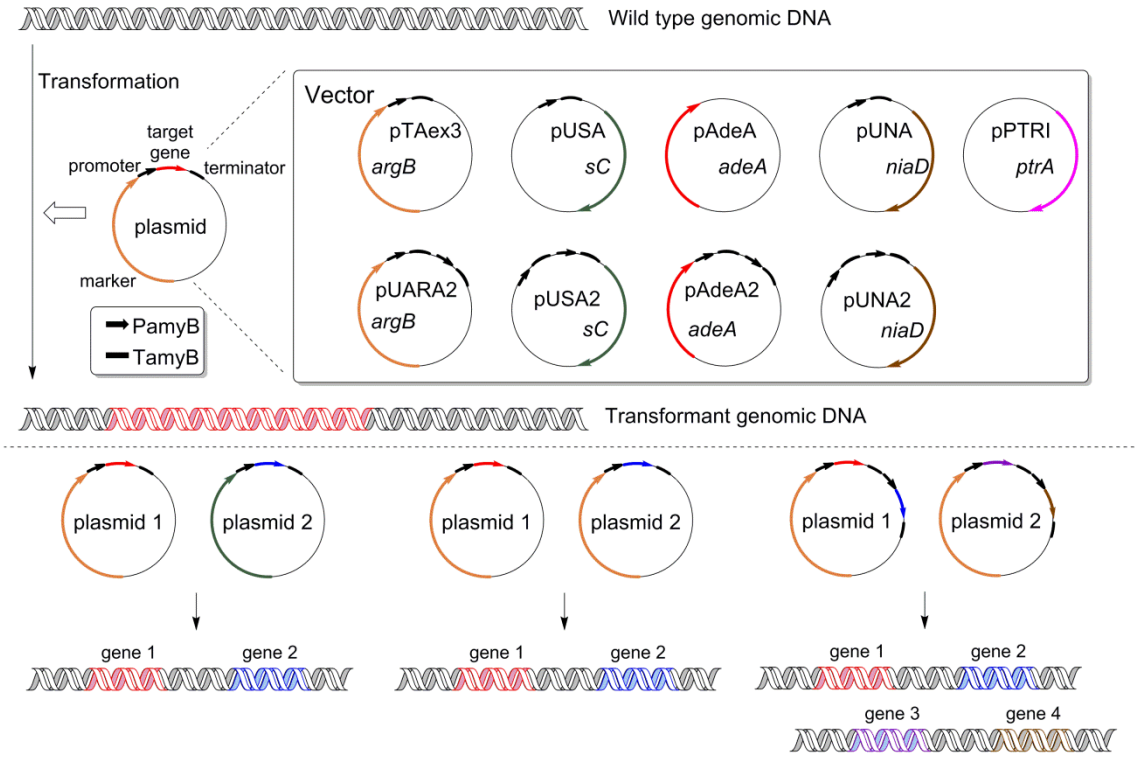


図 7.　使用可能なベクター

糸状菌の生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子数が 20 を越えることは少なく、もし 20 個の遺伝子導入による物質生産が可能になれば、理論上全ての天然物の生産ができることになる。(図 8、表 1)。

表 1.　糸状菌天然物と生合成遺伝子の数

natural product	organisms	number of genes	type	ref
aspericin E	*A. alliaceus*	3	non-ribosomal peptide (NRP)	13
aspernidine	*A. nidulans*	6	meroterpenoid	14
aphidicolin	*Phoma betae*	6	terpenoid	15
equisetin	*Fusarium heterosporum*	7	PK-NRP hybrid	16
fumagillin	*A. fumigatus*	16	meroterpenoid	17
gliotoxin	*A. fumigatus*	12	NRP	18
griseofulvin	*Penicillium aethiopicum*	9	polyketide	19
paxilline	*Penicilliun paxilli*	7	indoleterpenoid	20
stipitatic acid	*Talaromyces stipitatus*	11	polyketide	21
tenellin	*Beauveria bassiana*	4	PK-NRP hybrid	9
viridicatumtoxin	*P. aethiopicum*	14	meroterpenoid	22
yanuthone D	*A. niger*	10	polyketide	23

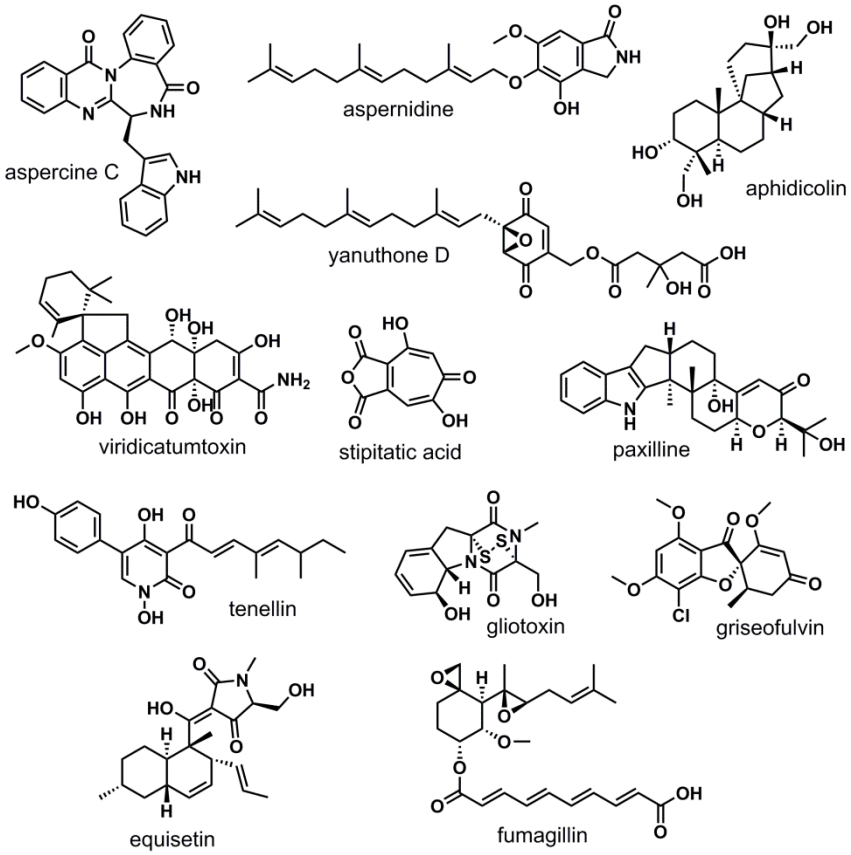


図 8.　生合成遺伝子クラスターが解析された糸状菌由来天然物

A. oryzae NSAR1 に着目した当初、*A. oryzae* を用いた天然物の全生合成例は、tenellin[9]だけであり、NSAR1 株を用いた異種生産例は無かった。そのため、以下の問題点が挙げられた；1）導入した全ての遺伝子が正しく転写、翻訳されるか；2）生成物の生理活性による、宿主へのダメージの有無；3）補完酵素が異種酵素に対して正しく働くか；4）化合物種、菌種に対してどこまで汎用性があるか；5）同じプロモーターで何個の遺伝子を同時発現できるか；6)宿主がもつ酵素による副反応は進行するか。そこで、既に環化酵素の機能解析が終了している aphidicolin の全生合成を行い、これらの問題に対する知見を得ながら、*A. oryzae* 異種発現系を用いた糸状菌天然物の異種生産法の検討を行った。

参考文献

[1] Dewick, P. M., Medicinal Natural Product A Biosynthetic Approach 3rd Edition
[2] Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W., *Nature*, **2005**, *3*, 937-947.
[3] Liu, X.; Walsh, C. T., *Biochemistry* **2009**, *46*, 11032-11044.
[4] Fujii, I.; Ono, Y.; Tada, H.; Gomi, K.; Ebizuka, Y.; Sankawa, U., *Mol. Gen. Genet.* **1996**, *253*, 1-10.
[5] Kennedy, J.; Auclair, K.; Kendrew, S. G.; Park, C.; Vederas J. C.; Hutchinson, C. R., *Science* **1999**, *284*, 1368-1372.
[6] Ma, S. M.; Li, J. W. H.; Choi, J. W.; Zhou, H.; Lee, K. K. M.; Moorthie, V. A.; Xie, X.; Kealey, J. T.; Da Silva, N. A.; Vederas, J. C.; Tang, Y., *Science* **2009**, *326*, 589-592.
[7] Nakajima, K.; Asakura, T.; Maruyama, J.; Morita, Y.; Oike, H.; Shimizu-Ibuka, A.; Misaka, T.; Sorimache, H.; Arai, S.; Kitamoto, K.; Abe, K., *Appl. Environmen. Microbiol.* **2006,** *72* (5), 3716-3723.
[8] Watanabe, A.; Ono, Y.; Fujii, I.; Sankawa, U.; Mayorga, M. E.; Timberlake, W. E.; Ebizuka, Y., *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7733-7736.
[9] Itoh, T.; Tokunaga, K.; Matsuda, Y.; Fujii, I.; Abe, I.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T., *Nat. Chem*. **2010**, *2*, 858-864.
[10] Heneghan, M. N.; Yakasai, A. A.; Halo, L. M.; Song, Z. S.; Bailey, A. M.; Simpson, T. J.; Cox, R. J.; Lazarus, C. M., *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1508-1512.
[11] Jin, F. H.; Maruyama, J.; Juvvadi, P. R.; Arioka, M.; Kitamoto, K., *FEMS Microbiol. Lett*. **2004**, *239*, 79-85.
[12] Tagami, K.; Minami, A.; Fujii, R,; Liu, C.; Tanaka, M.; Gomi, K.; Dairi, T.; Oikawa, H., *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2076-2080.
[13] Yaegashi, J.; Praseuth, M. B.; Tyan, S-W.; Sanchez, J. F.; Entwistle, R.; Chiang, Y-M.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. C., *Org. Lett*. **2013**, *15*, 2862-2865.
[14] Toyomasu, T.; Nakaminami, K.; Toshima, H.; Mie, T.; Watanabe, K.; Ito, H.; Matsui, H.; Mitsuhashi, W.; Sassa, T.; Oikawa, H, *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **2004**, *68*, 146-152.
[15] Fujii, R.; Minami, A.; Tsukagoshi, T.; Sato, N.; Sahara, T.; Ohgiya, S.; Gomi, K.; Oikawa, H., *Biosci. Biotech. Biochem*. **2011**, *75* (9), 1813-1817.
[16] Kakule, T. B.; Sardar, D.; Lin, Z.; Schmidt, E. W., *ACS Chem. Biol*. **2013**, *8*, 1549-1557.
[17] Lin, H-C.; Tsunematsu, Y.; Dhingra, S.; Xu, W.; Fukutomi, M.; Chooi, Y-H.; Cane,

D. E.; Calvo, A. M.; Watanebe, K.; Tang, Y., *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, *136*, 4426-4436.
[18] Scharf, D. H.; Habel, A.; Heinekamp, T.; Brakhage, A. A.; Hertweck, C., *J. Am. Chem. Soc*. **2014**, *136*, 11674-11679.
[19] Cacho, R. A.; Chooi, Y-H.; Zhou, H.; Tang, Y., *ACS Chem. Biol*. **2013**, *8*, 2322-2330.
[20] Tagami, K.; Liu, C.; Minami, A.; Noike, M.; Isaka, T.; Fueki, S.; Shichijo, Y.; Toshima, H.; Gomi, K.; Dairi, T.; Oikawa, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260–1263.
[21] Davison, J.; Fahad, A.; Cai, M.; Song, Z.; Yehia, S. Y.; Lazarus, C. M.; Bailey, A. M.; Cox, R. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2012**, *109*, 7642-7647.
[22] Chooi, Y-H.; Hong, Y. J.; Cacho, R. A.; Tantillo D. A.; Tang, Y., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 16805-16808.
[23] Holm, D. K.; Petersen, L. M.; Klitgaard, A.; Knudsen, P. B.; Jarczynska, Z. D.; Nielsen, K. F.; Gotfredsen, C. H.; Larsen, T. O.; Mortensen, U. H., *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 519-529.

1 章　*A. oryzae* 異種発現系を用いた生合成遺伝子機能解析法の確立

1-1.　天然物の異種生産の方法論

天然物の異種生産を行うにあたって、天然物がどのように生合成されるかを知る必要がある。一般に、天然物の生合成では、初めに母骨格が合成され、次に種々の修飾反応が進行する。天然物の多様性は生合成原料の組み合わせ、骨格構築の様式、酸化や糖転移などの修飾によって生み出されている(図 1-1)[1]。

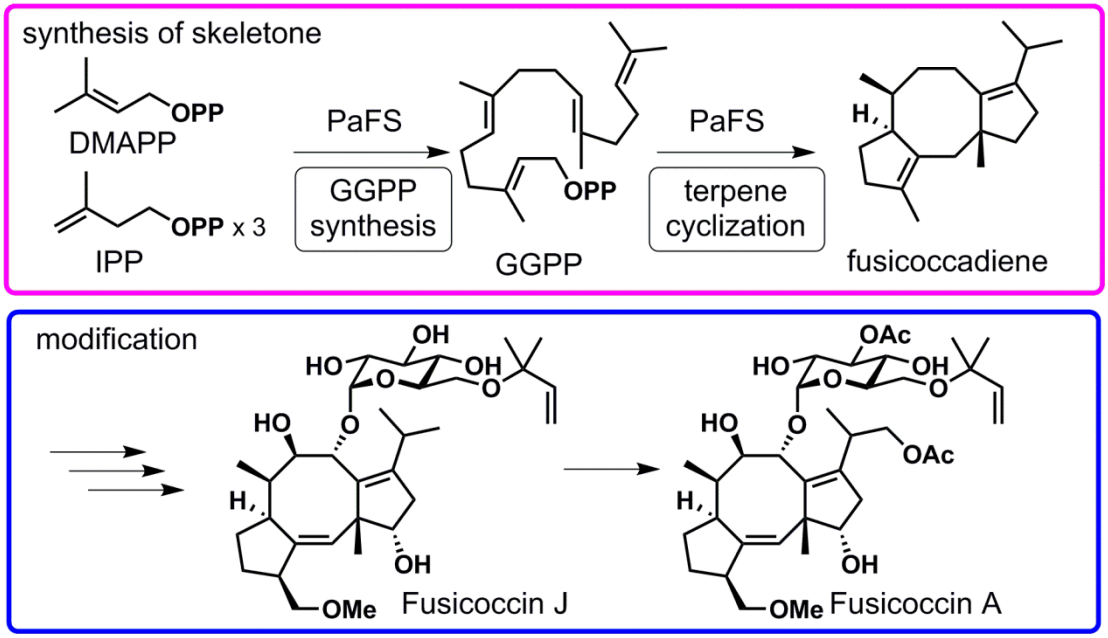


図 1-1.　fusicoccin A の生合成経路

前述したとおり、これらの反応を触媒する酵素遺伝子は、染色体上でクラスターを形成している。従って、生合成遺伝子クラスターには、少なくとも 1 つの骨格合成酵素遺伝子があり、その周辺には、修飾酵素遺伝子が存在していることが多い。このような遺伝子クラスターがどのような天然物の生合成に関与しているかを判別するには、骨格合成酵素のアミノ酸配列を見るとよい。骨格合成酵素は、生合成原料を変換するための特徴的なアミノ酸配列(モチーフ)を有している。すなわち、遺伝子の塩基配列からどのような二次代謝産物を合成するかを予測できる。その上、前述したとおり、アミノ酸配列の相同性検索によって、既に解析が行われた酵素とアミノ酸配列が似ていれば、似たような反応を触媒する可能性が高いといえる。例えば、chaetoglobosin の生産菌である糸状菌 *Chaetomium globosum* の染色体上には CHGG_01239 という 12 kb の遺伝子が存在する。このアミノ酸配列をドメイン予測ツール pfam や BLAST で解析すると、PKS-NRPS に相当することが判明した。周辺の遺伝子を同様に解析すると、この遺伝子の付近には 3 つの酸化酵素遺伝子(p450 および FMO)とα,β-

不飽和還元酵素遺伝子(ER)が存在し、遺伝子は図 1-2 のよう並んでいることがわかった。この CHGG_01239 と、高い相同性を示すものに *Aspergillus clavatus* の PKS-NRPS 遺伝子 *ccsA* (ACLA_078660)がある。この遺伝子は、Tang らの遺伝子破壊実験により、cytochalasin E の生合成遺伝子であることが支持された[2]。このことから、CHGG_01239 は chaetoglobosin を生合成する遺伝子である可能性が高いと予想できる。実際に、Watanabe らは、遺伝子破壊実験により、この遺伝子クラスターが chaetoglobosin の生合成に関与していることを示した[3]。このように、遺伝子情報から機能を推定していくバイオインフォマティクスを駆使して標的となる遺伝子を探索し、実際に遺伝子破壊や異種発現の手法を用いて、天然物の生合成機構を解明できる。

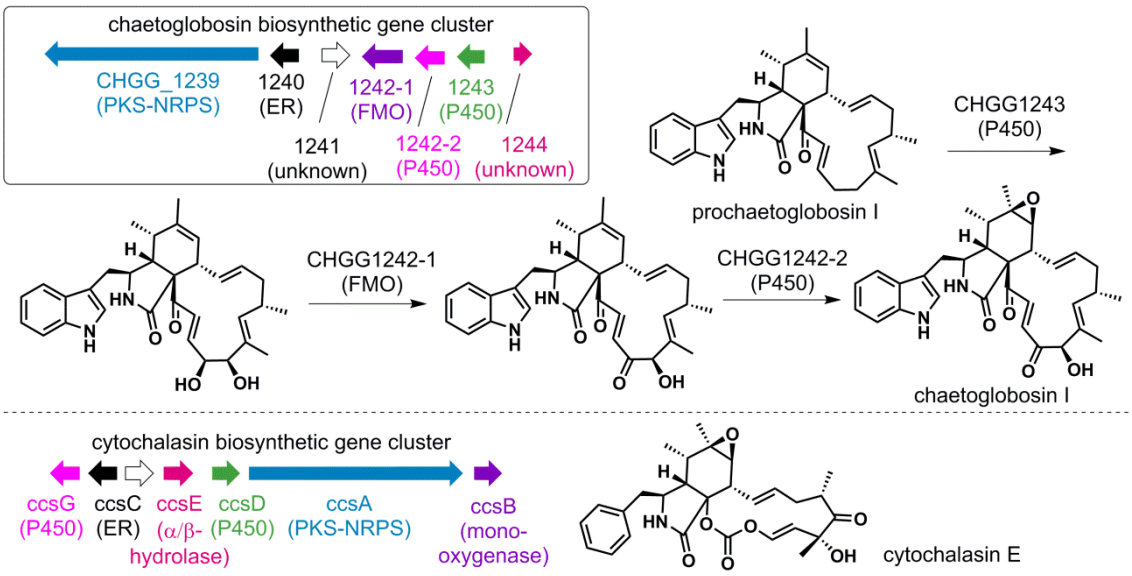


図 1-2.　chaetoglobosin 生合成遺伝子クラスターの機能解析

1-2.　aphidicolin の全生合成の検討

1-2-1.　テルペンの生合成機構

テルペンは、ジメチルアリル二リン酸(DMAPP)に、イソペンテニル二リン酸(IPP)が head-to-tail の様式で結合した前駆体から環化した化合物群であり、ヘミテルペン(C5)、モノテルペン(C10)、セスキテルペン(C15)、ジテルペン(C20)、セスタテルペン(C25)など多様な骨格をもつ。また、ファルネシル二リン酸(FPP)やゲラニルゲラニル二リン酸(GGPP)が tail-to-tail で結合した前駆体から得られる天然物には、トリテルペン(C30)、テトラテルペン(C40)などがある(図 1-3)。

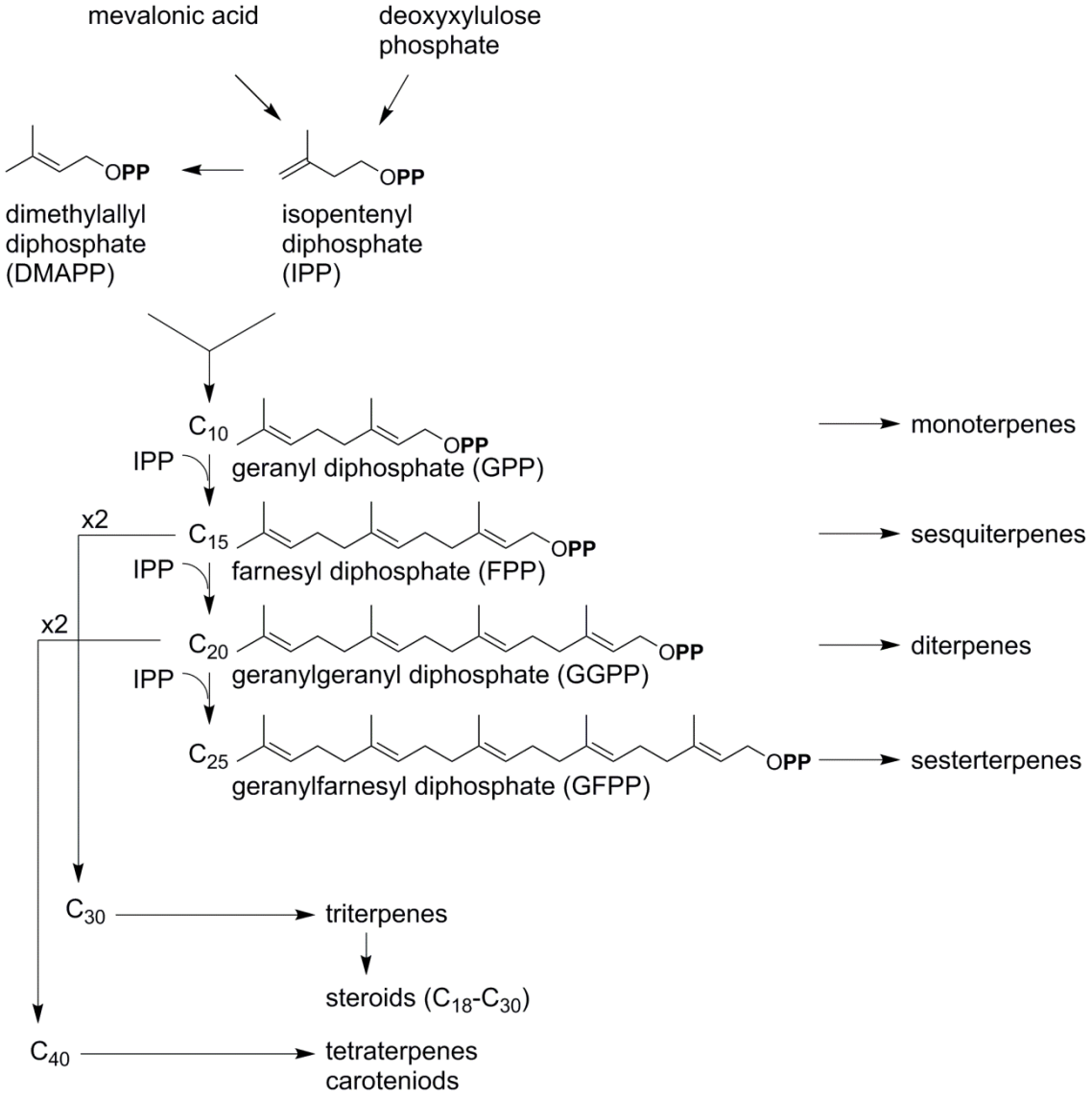


図 1-3.　各テルペノイド鎖の生合成経路

本研究で注目したジテルペンの、共通した生合成機構は以下のように説明できる。初めに、GGPP 合成酵素 GGS が細胞内に大量に存在する前駆体である DMAPP もしくは FPP と、IPP を基質に、GGPP を合成する。次にジテルペン合成酵素(環化酵素)が複雑な縮環骨格を合成する（図 1-4)[4]。このとき、環化反応は、GGPP のピロリン酸の脱離もしくは、二重結合のプロトン化によるカルボカチオン中間体の形成から始まる。骨格の多様性は、カルボカチオンの生成位置の他、種々の閉環反応や転位反応によって創出される。さらに、骨格構築後、酸化やその他の修飾反応が進行することで、生理活性の強い天然物へと変換される。

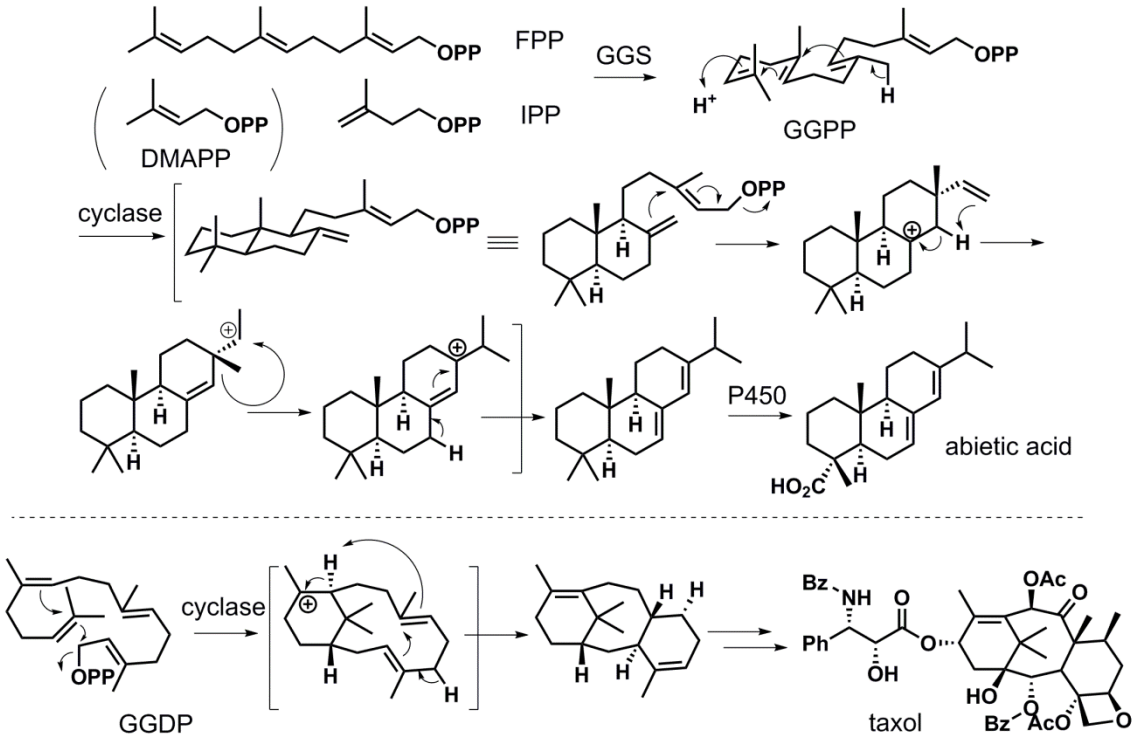


図 1-4.　ジテルペンの生合成機構

1-2-2.　aphidicolin の推定生合成経路

1972 年、Brundret らが、糸状菌 *Cephalosporium aphidicola* から単離した四環性ジテルペン aphidicolin (**1**)は、その後、3 種の糸状菌からも単離された[5]。この複雑な縮環骨格と 6 個の不斉中心をもつこと、および真核生物の DNA ポリメラーゼαに対する特異的阻害活性[6]ゆえ、多くの有機化学者の全合成の対象となった[7]。

Bu' Lock らは、各種同位体標識体の取り込み実験の結果から、**1** の生合成では、GGPP から syn-CPP を経由し、4 環性骨格ができる環化機構を提唱した[8]。Hanson らは、同じく放射性同位体標識された前駆体の取り込み実験を行い、**1** の生合成経路を推定した(図 1-5)[9]。Oikawa らは生産菌である *Phoma betae* PS-13 に対して P450 の阻害剤を添加することによる生合成中間体の取得を行った[10]。その結果、aphidicolan- 16β-ol (**2**)と 3-deoxyaphidicolin (**4**)および、少量の **3** が得られた。このことから **1** の生合成経路を **2**→**3**→**4**→**1** と予測した。また、2002 年、後述する aphidicolin 合成酵素(ACS)の触媒機構を推定すべく、**2** や *syn*-CDP のアナログ体にルイス酸を反応させ、環化様式の異なる化合物を合成した[11]。この結果と合わせ、分子軌道計算により各カルボカチオン中間体の熱力学的安定性を算出することで、ACS の環化機構を推定した。

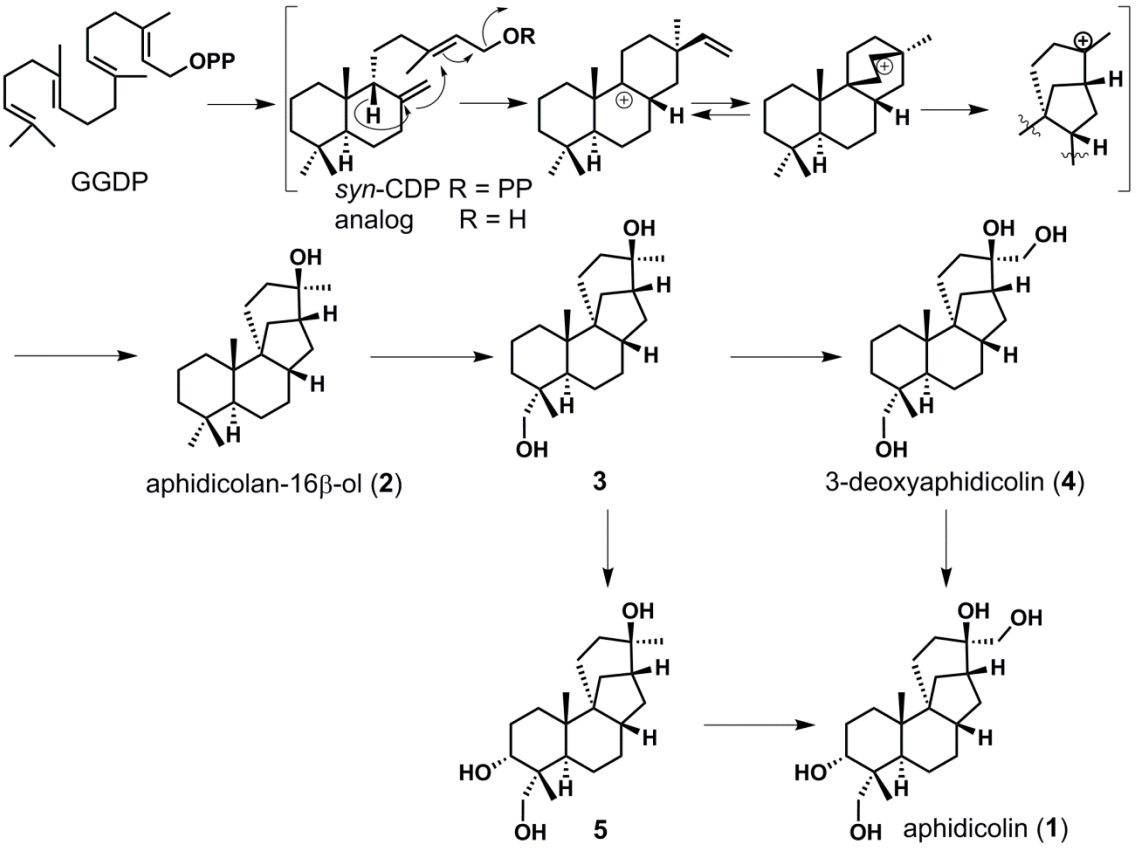


図 1-5.　aphidicolin の推定生合成経路

1-2-3.　生合成遺伝子クラスター

2001 年、Oikawa らは、植物や糸状菌のテルペン環化酵素に高く保存されたアミノ酸配列を元に縮重プライマーを作製し、生産菌である *P. betae* の cDNA を鋳型に PCR を行った。その結果、*ent*-kaurene 合成酵素遺伝子に類似のジテルペン合成酵素遺伝子の増幅が確認された[12]。その後、遺伝子の全長を PCR で増幅し、塩基配列を解析したところ、2835 bp の aphidicolin 合成酵素(ACS)遺伝子を同定することに成功した。

その 3 年後、Oikawa らは **1** の生合成遺伝子クラスターを特定した[13]。すなわち、ACS 遺伝子 *PbACS* の周辺にある遺伝子を調査するため、ゲノムウォーキング法を用いて、上流および下流の塩基配列を解析した。その結果、**1** の生合成遺伝子クラスターには、*PbACS* 以外に、GGDP 合成酵素遺伝子 *PbGGS*、2 種の酸化酵素 *PbP450-1*、*PbP450-2*、ABC トランスポター*PbTP*、転写因子 *PbTF* の計 6 個が含まれていることが判明した(図 1-6、表 1-1)。

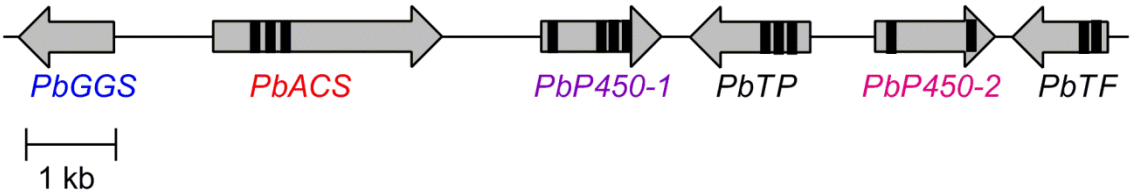


図 1-6.　aphidicolin の生合成遺伝子クラスター。各遺伝子の縦線はイントロンの位置を示している。

表 1-1.　aphidicolin の生合成遺伝子クラスター

gene	conserved domain/function	size in AA
PbGGS	GGDP synthase	343
PbACS	terpene cyclase	944
PbP450-1	cytochrome P450	486
PbTP	ABC-transporter	564
PbP450-2	cytochrome P450	541
PbTF	transcriptional factor	425

本研究では、既に骨格構築酵素の機能がわかっている遺伝子クラスターを *A. oryzae* 異種発現系に適用し、序章で述べた問題点について検討した。

また、生合成遺伝子クラスター中には P450 遺伝子が *PbP450-1*, *PbP450-2* と 2 種類存在するが、**1** の生合成には、C3 位、C17 位、C18 位の 3 箇所に水酸化が必要である。そこで本研究では、遺伝子の順次導入による生合成経路の解明と、**1** の全生合成を通して、本手法の検討をすることにした。(図 1-7)。

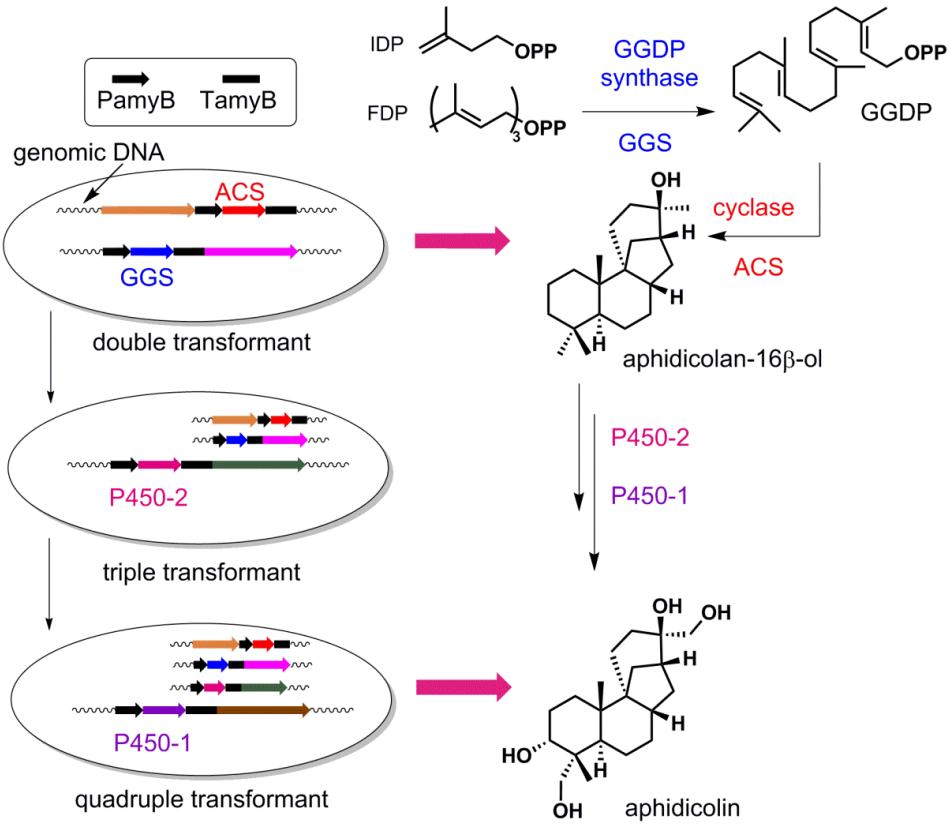


図 1-7.　形質転換の順序と予想生成物

1-3.　実験結果と考察

1-3-1.　プラスミドの構築

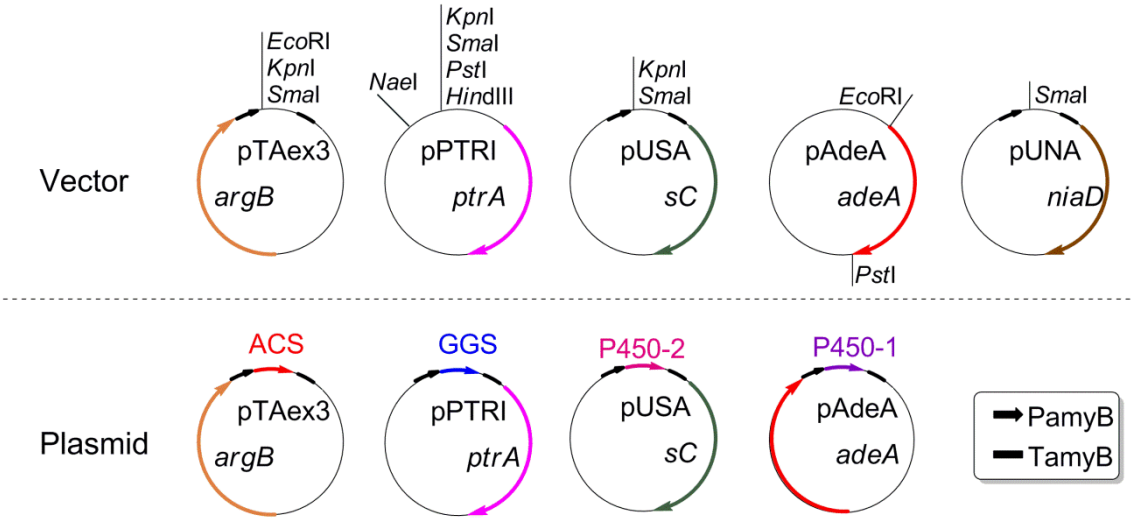


図 1-8.　*A. oryzae* 発現用プラスミド

図 1-8 に *A. oryzae* 発現用のベクターを示した。使用可能な 5 種のうち、実績のある pTAex3 と pPTRI は骨格構築に重要な *PbACS* と *PbGGS* の導入に使用した。残り 2 つの酸化酵素遺伝子は、比較的スクリーニングが容易な pUSA および pAdeA に導入した。pPTRI および pAdeA は、プロモーターを有していないため、これらのベクターを用いる際には、一度 pTAex3 に遺伝子を導入した後、再度 PCR でプロモーターを含む領域をクローニングする必要がある。

挿入する遺伝子は、既存のプラスミドもしくは *P. betae* のゲノム DNA を鋳型にして増幅し、ligation もしくは後述する In-Fusion 法を用いてベクターに挿入した。

PbP450-1 のプラスミドを構築する際、初めに pUNA に組み込んで調製したが、形質転換体の選択性が非常に悪く、非形質転換体のコロニーが多数得られた。これは、選択培地に含まれたアデニンなどの窒素源によって、マーカー遺伝子をもたない非形質転換体も生育できたためと考えられた。したがって、*PbP450-1* を、アデニン生合成を相補するベクターpAdeA に導入することにした。

これらのプラスミド構築において、インサートの有無は PCR で確認した(図 1-9)。レーンの数はインサートチェックを行ったコロニーの数である。また、シーケンス解析によって、各遺伝子に変異がないことを確認した。

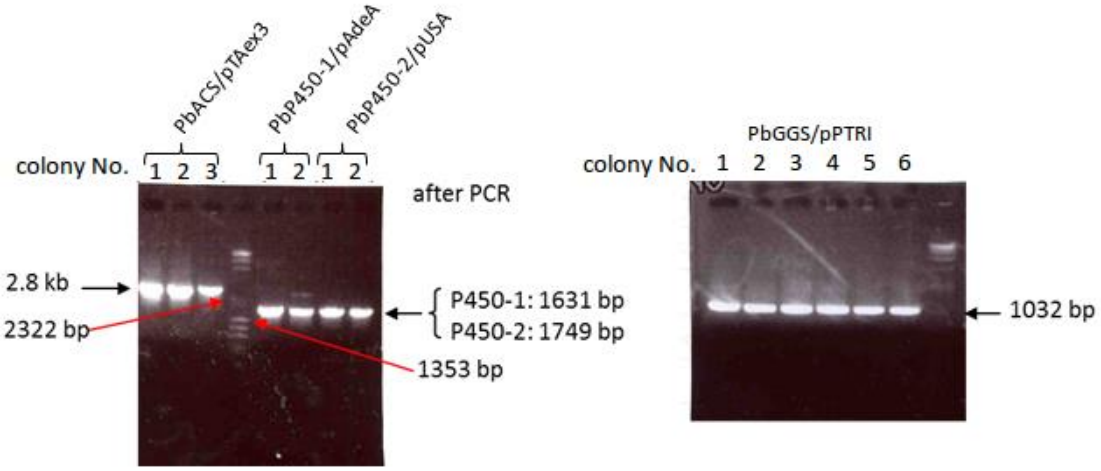


図 1-9.　麹菌発現用プラスミドのインサートチェック

これら 5 種のベクターには、利用可能な制限酵素サイトが少ないことが欠点であった。従来のプラスミドの構築では、マルチクローニングサイトに存在する 2 か所の制限酵素サイトを用い、挿入する遺伝子の向きを決定する。一方、利用可能な制限酵素サイトが 1 個しかない場合、遺伝子の向きが正方向と逆方向の 2 種類ができるだけでなく、制限酵素で切ったベクターが環状に戻るセルフライゲーションが競合する。

この解決策として In-Fusion 法が有効であることがわかった。この酵素は、線状化したベクターと、両端に 15 bp のベクターと相同な配列をもつ PCR 産物を連結することが出来る。この方法には、以下のようなメリットがある ; 1) PCR 産物を制限酵素処理しなくてよい。そのため、従来法で問題であった、目的遺伝子内に存在する制限酵素サイトを気にせずにプラスミド構築が可能となる ; 2) 反応時間が 15 分と短いので、ベクターおよびインサートの調製から大腸菌の形質転換までを 1 日で終えることが出来る ; 3) プラスミド構築の成功率が高い。このように、In-Fusion 法を用いることで、使える制限酵素サイトが 1 か所しかない場合でも、プラスミドを迅速に構築することが出来る。本論文中で行ったプラスミド構築法は、ほとんどの場合、In-Fusion 法を用いている。

1-3-2. *A. oryzae* の形質転換法

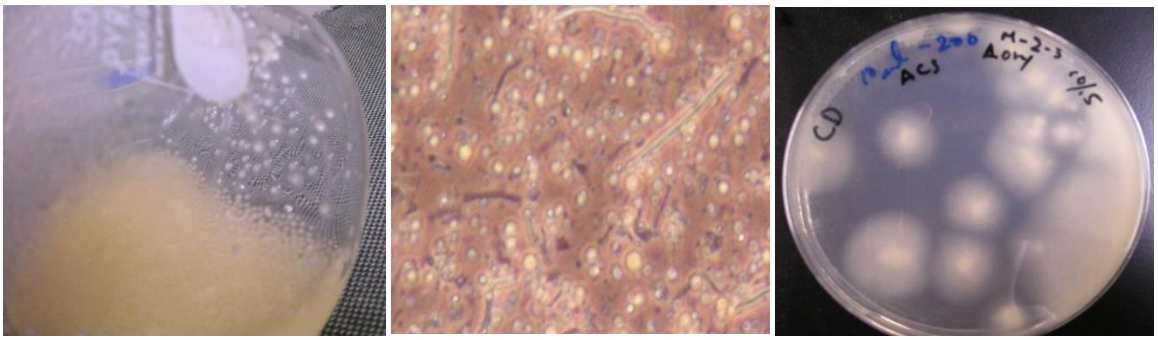


図 1-10. 形質転換の様子。左 : 培養 3 日目の菌体 ; 中央 : プロトプラスト ; 右 : 回復培養後の形質転換体

本研究では、一般に用いられているプロトプラスト-PEG 法を用いて、*A. oryzae* の形質転換を行った。初めに、適当な栄養要求性を相補する栄養分(*argB*→arginine, *sC*→methionine, *niaD*→ammonium sulfate, *adeA*→adenine)を加えた DPY 培地を調製した。ただし、*ptrA* をマーカーに用いる場合、DPY のような栄養豊富な培地では、体内で thiamine が蓄積され、抗生物質である pyrithiamine 耐性の効果が低減してしまう。これにより、形質転換体の選択性が下がってしまうため、最小培地である Czapek-Dox (CD)培地に少量のポリペプトンと適宜栄養分を加えた培地を用意した。

3 日間培養した菌体を Yatalase (TaKaRa)によってプロトプラスト化し、細胞数を計測した。このプロトプラスト懸濁液にプラスミドを添加し、形質転換を行った。

形質転換体はコロニーを形成することが多いが、プレートの一部に境目なく生えてくることもあった(図 1-10)。また、各マーカーの選択性には以下のようにばらつきがあり、*argB* マーカーや *ptrA* マーカーのほか、カラーセレクション

ができる *adeA* マーカーも非形質転換体との選別がしやすいことが分かった。*sC* マーカーは、バックグラウンドとして非形質転換体も生えてくるが、形質転換体は明確なコロニーとして観測されるため、選別は比較的容易であった。最後に、*niaD* マーカーは、複数の栄養素を除去した条件でも非形質転換体が一面に生えてくるため、選別が困難であった。そのため、*niaD* マーカーを用いる際は、ほかの 4 種のマーカーを用いた後に使用する必要がある。

1-3-3.　形質転換株の選択とそれらの代謝産物の解析

形質転換の成否を判断する基準には、以下のようなチェックポイントを設けた；1) 選択培地での生育。このスクリーニングはマーカー遺伝子に依存しており、非形質転換体が生えてしまうマーカーでは、優先度の高い判断基準とはならない；2) ゲノム DNA を鋳型にした PCR。これは、調製したゲノム DNA の純度や濃度によっては、目的遺伝子が存在していても、増幅が確認できないことがある。その上、遺伝子の増幅が確認されても、転写されにくい位置に遺伝子が入ってしまった場合は、目的物が得られない。従って、判断基準としては、優先度が低いと位置づけしている；3) cDNA を鋳型にした PCR での転写確認。導入された遺伝子が正しく転写されていれば、目的のタンパク質が翻訳もされているという前提で、転写の確認できた形質転換体は目的の化合物を作っている可能性が高い；4) 目的物の生産確認。形質転換体の代謝産物を確認し、目的の代謝産物が得られれば、遺伝子が導入されたと判断できる。これが最も優先度の高い判断基準となる。したがって、形質転換の成否を判断する基準の優先度は 4 >3 >1 >2 となる。

本研究で作製した形質転換体の種類と、得られたコロニー数、PCR で遺伝子の挿入を確認したコロニー数、および代謝産物の確認ができたコロニー数を表 1-2 にまとめた。

表 1-2.　形質転換体のスクリーニング

形質転換体	コロニー数 [a]	PCR で導入を確認した数	生産確認
ACS	13 (4)[b]	—	1
ACS＋GGS	12 (8)	ACS：—,GGS：1	5
ACS＋GGS＋P450-2	8 (8)	P450-2：3	2
ACS＋GGS＋P450-2＋P450-1	4 (4)	P450-1：2	3

a) コロニー数は 1 枚のプレートあたりの個数

b) ( )内の数は生産確認用に培養したコロニー数

*PbACS*形質転換体

初めに、*PbACS*/pTAex3 遺伝子を *A. oryzae* M-2-3 に導入した。得られた形質転換体は 13 コロニーで、そのうち 4 コロニーを選抜し、マルトースを含む CMP 培地で 30 ℃、1 週間振盪培養した後、菌体から代謝産物を抽出した。これらのうち、一つの形質転換体から得られた抽出物を GC-MS で解析し、aphidicolan-16β-ol (**2**)の標品と比較した。その結果、形質転換体で新たに検出されたピークの保持時間と MS のフラグメントパターンが標品と一致した。標品を用いた検量線で定量を行った結果、収量は 0.18 mg/L であった。

PbACS+*PbGGS* 二重形質転換体

ACS 形質転換体では、代謝産物の収量が低かったため、ACS の基質である GGPP の供給系を導入することにした。形質転換の操作は煩雑で、遺伝子を 1 個ずつ導入していては、時間がかかるため、*PbACS*/pTAex3 と *PbGGS*/pPTRI を同時に *A. oryzae* NSAR1 に導入した。形質転換体は 1 枚のプレート当たり 12 コロニー観測された。導入した遺伝子は、染色体上にランダムに挿入されるため、代謝産物の生産量には、個体差がある。そのため、骨格合成段階において高い生産能をもつ形質転換体を選ぶ必要がある。観測された 12 個の形質転換体のうち 8 個のコロニーを CMP 培地で 1 週間振盪培養し、生産能の比較を行った。抽出物を一定量の酢酸エチルで溶解させ、TLC で生産能の違いを確認した。スポットとして十分検出できた 2 サンプルを GC-MS で解析し(図 1-11-A)、収量を算出した。結果、生産能の低い方は 0.8 mg/L、生産能の高い方は 5.8 mg/L の収量で **2** が得られた。さらに、生産量の向上を目指し、米固体培地を用いて形質転換体を培養したところ、米 1 kg あたり、40 mg の収量で目的物を得た。

また、*PbGGS* の有無は、直接確認できないため、ゲノム DNA を抽出し、PCR 確認を行った。これにより、生産量の上がった形質転換体には、*PbGGS* が導入されていると判明した(図 1-11-B)。

このように、GGPP の供給量を増やすことで、**2** の収量が増加した。従ってジテルペン合成酵素遺伝子の機能解析の際には、GGS 遺伝子を同時に発現すると、代謝産物の構造決定が容易になると判明した。但し、形質転換体によって生産量が異なるため、できるだけ多くの形質転換体の生産量を測定する必要がある。特に天然物の全生合成を目指す場合、骨格構築の段階で生産量の高い形質転換体を選抜することが重要となる。

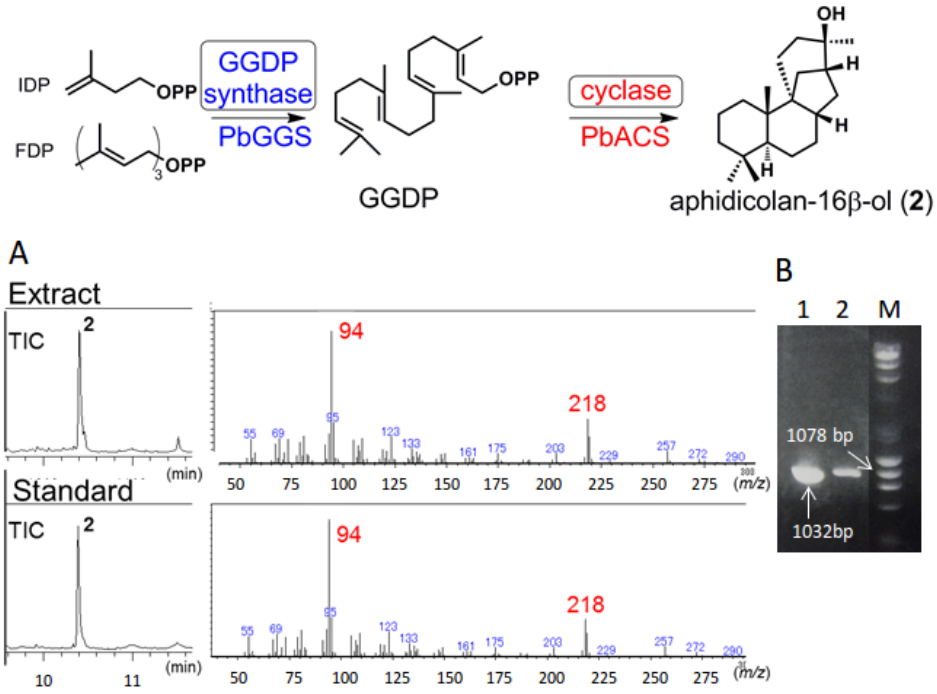


図 1-11.　二重形質転換体における *PbGGS* 遺伝子の挿入の確認と代謝産物の GC-MS 解析。A：　GC-MS 解析結果；上段：抽出物、下段：標品。
B: 各ゲノム DNA を鋳型とした *PbGGS* 遺伝子の PCR 結果；Lane 1：二重形質転換体のゲノム DNA 由来。Lane 2：*Phoma betae* PS-13 のゲノム DNA 由来。M：λ *Hin*dIII digest and ϕx174 *Hae*III digest mix

PbACS+*PbGGS*+*PbP450-2* 三重形質転換体

次に、*PbP450-2*/pUSA を用いて、三重形質転換体を作製した。この三重形質転換体は、8 コロニー観測され、それら全てを CMP 培地で培養した。これらの代謝産物を抽出し、LC-MS で標品と比較した(図 1-12)。8 コロニー中 2 つのコロニーからの抽出物で、*m/z* 346 のピークの保持時間が 3-deoxyaphidicolin (**4**) の標品と一致したことから、P450-2 が C17 位と C18 位の離れた 2 か所のメチル基を位置選択的に水酸化していることが判明した。また、二重形質転換と同様に、米培地を用いて培養することで、米 1 kg あたり、90 mg の収量で **4** を得ることが出来た。

水酸化されるメチル基は分子の離れた場所に位置しており、どちらも紙面奥側に突き出ている。この認識機構については、基質である **2** の CPK モデルを用いて考察した(図 1-13)。

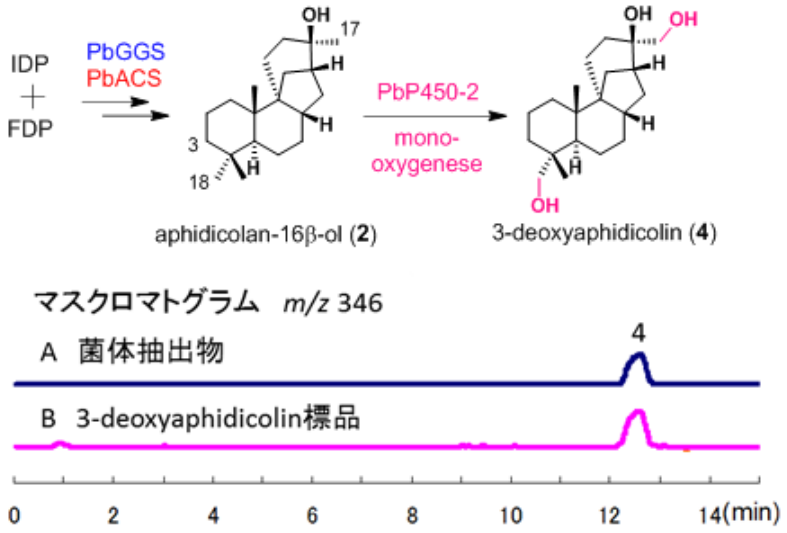


図 1-12.　三重形質転換体代謝産物の LC-MS 解析

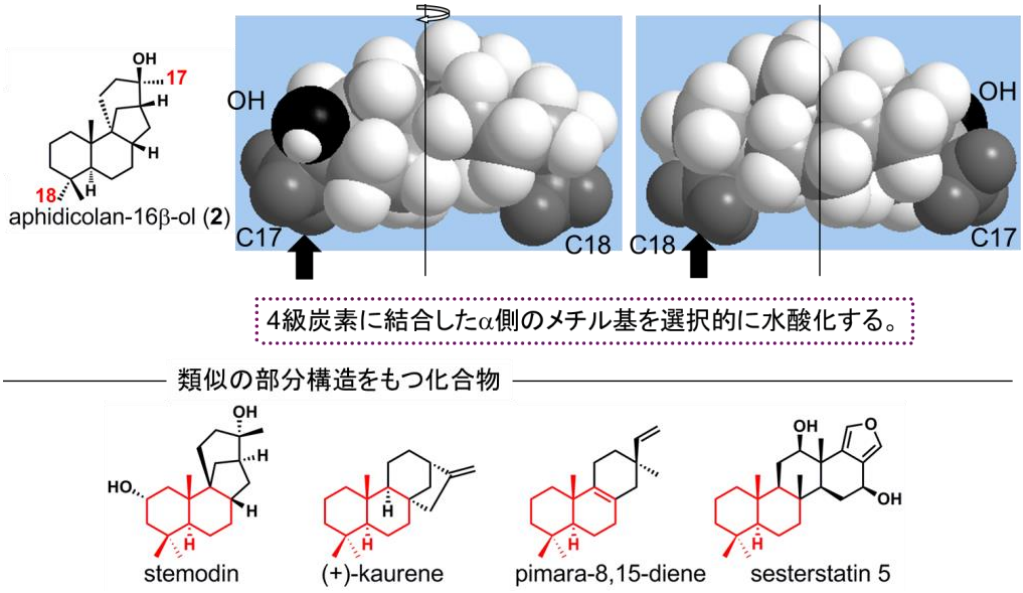


図 1-13.　**2** の CPK モデルと類似骨格をもつ化合物の例

2 はイモムシのような偽対称な形をしており、水酸化されるメチル基は分子の両端下側に位置している。左のモデルを垂直軸に対して反転させると、C18 位のメチル基が C17 位のメチル基とほぼ同じ位置に来ることがわかった。この分子が偽対称なことから、P450-2 は水酸基の有無に関わらず、分子の部分的な形を認識して、水酸化を触媒すると考えられる。したがって、P450-2 は比較的広い基質認識能を有していると思われる。また、このような特性は、天然に似たような部分構造をもつテルペン類が多数存在することから、汎用性の高い触媒

としての利用も期待できる。なお、このように二か所の離れた炭素を水酸化するP450は2011年に2例報告されるなど、最近の報告例が増えている(図1-14)[14]。

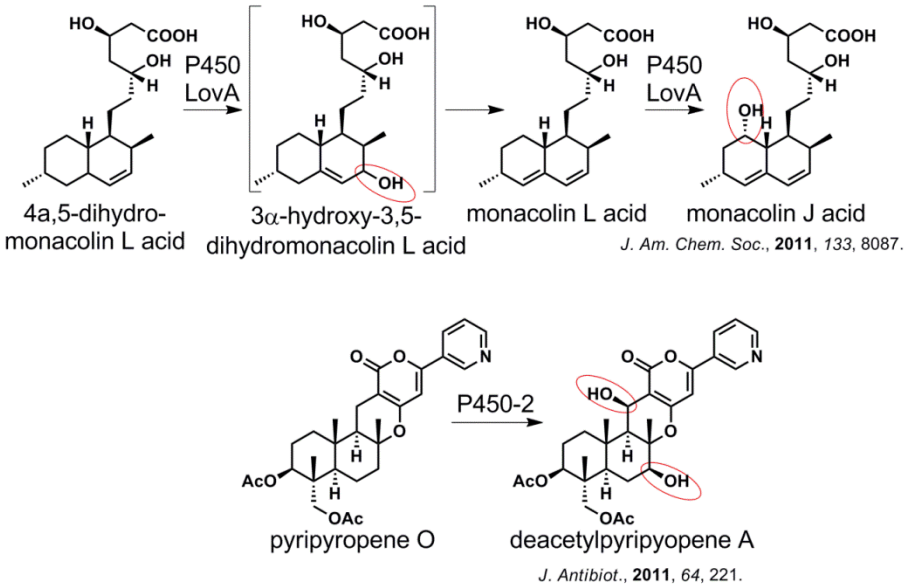


図 1-14.　単一の P450 が 2 か所の離れた炭素を水酸化する例

PbACS+*PbGGS*+*PbP450-2*+*PbP450-1* 四重形質転換体

最後に、*PbP450-1*/pAdeA を三重形質転換体に導入し、四重形質転換体を作製した。観測された 4 つの形質転換体を CMP 培地で 1 週間振盪培養し、代謝産物を LC-MS で解析した。その結果、菌体ではなく、培養ろ液の抽出物においてaphidicolin (**1**)の標品と保持時間が一致するピークを観測した。従って、四重形質転換体が **1** を生合成していることが判明した(図 1-15)。これにより、P450-1 が 3 位の水酸化を立体選択的に触媒することが確認された。さらに、米培地を用いて培養することで、米 1 kg あたり、130 mg の収量で **1** を得た。

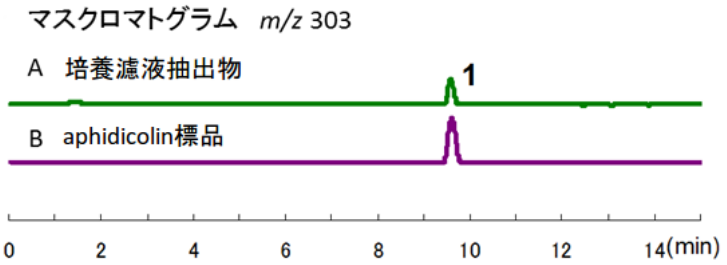


図 1-15.　四重形質転換体代謝産物の LC-MS 解析

以上のように、4 種の遺伝子を段階的に導入したことで、各酵素遺伝子の機能を解明し、**1** の全生合成を達成した(図 1-16)。この研究から、序章で提示した問題点について以下の知見が得られた；1) ゲノム DNA からクローニングした遺

伝子は、正しく転写・翻訳され、酵素が機能した；2) 生成物による宿主へのダメージは観測されなかったが、最終生成物である **1** は菌体ではなく、培地から抽出された；3) 宿主に備わっている P450 還元酵素が異種 P450 を認識し、還元が行われた；4) 4 種の遺伝子なら、同じプロモーターを用いて同時に強制発現することが可能；5) 宿主による副反応は観測されなかった。

2)に関して、**1** は DNA ポリメラーゼαの阻害剤としての毒性を示すため、細胞外に排出されたと考えられる。*A. oryzae* や *A. nidulans* には、多剤耐性を示す ATP-binding cassette (ABC) transporter や Major Facilitator Superfamily (MFS)に属する排出機構が数多く備わっており、毒性を持つ様々な化合物を体外に排出できる。そのため、毒性をもつ天然物の生産も可能で、生合成遺伝子クラスターに存在する耐性遺伝子を別途導入する必要がないことがわかった。

3)について、宿主には、150 個以上の P450 があるが、還元酵素はたったの 2 個しか知られていない。そのため、還元酵素には広い P450 許容能があると期待されていた。実際に、糸状菌 P450 を異種発現させた例は、tenellin[15]や pyripyropene A[14b] の生合成研究でも報告されており、*A. oryzae* の持つ P450 還元酵素は異種 P450 に対しても正常に機能すると推定できた。さらに、P450 の還元に重要な NAD(P)H 量も菌体内に十分量存在していると考えられる。

上記の事項の他にも新たな知見を得ることができた；6) 同じ形質転換体でも、生産能に大きな違いがある；7) 米培地を用いることで、収量が著しく増加した。

6)に関して、生産量に個体差がある原因として、導入する遺伝子が宿主の染色体上にランダムに入るため、場所によっては、転写されにくくなるためと考えられる。そこで、骨格合成段階で高い生産能をもつ形質転換体をスクリーニングすることで、下流の酵素遺伝子を導入した場合でも、構造決定が可能な程度の収量を得られる。

7)について、米 100 g を液体培地 100 mL に換算できると仮定すると、**1** は 1 L あたり 130 mg 得られる計算になる。米培地は誘導剤であるデンプンの量が米 100 g あたり約 80 g と多く、消費しきらないので、常に発現誘導をかけられる。また、固体培地の特性として、表面積が寒天培地や液体培地と比べて圧倒的に広いため、より多くの菌を培養できる。このように、菌体量と発現量の増加が収量の増加につながっていると考えられる。

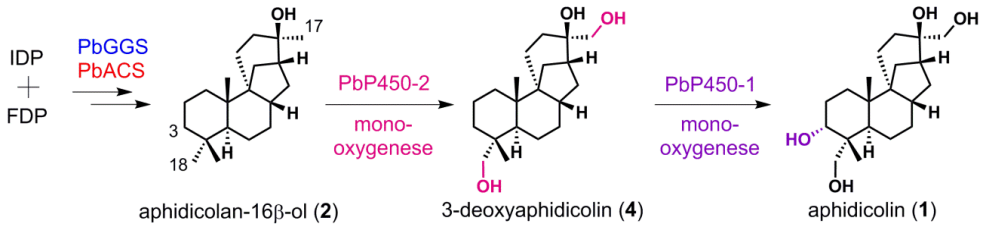


図 1-16.　aphidicolin の生合成経路

このように、*A. oryzae* NSAR1 株を用いて、酵素遺伝子を順次導入し、各遺伝子の機能解析および天然物の全生合成を行う手法は多くの知見をもたらした。本手法は、既に当研究室で多用されているほか、東京大学の Abe らにも用いられている[16]。

1-4.　糸状菌異種発現で使用されるようになった迅速プラスミド構築法

これまでプラスミドの構築に用いられてきたのは、制限酵素と ligase を用いる手法であった。本手法の問題点は、導入するインサートが長くなると、連結部分を揃えるために使う制限酵素が限定される。また、制限酵素の癖を知り抜いていないと素人には使いこなすのが難しい点なども問題であった。このほか、天然物を作る際、複数の遺伝子を同時に組み込みたいなどの要求があり、様々な手法が利用されるようになってきた。特に有用だと思われるものを以下に紹介する。1) Gibson Assembly System、2) USER Friendly Cloning Kit、3) 酵母を使用した Gap Repair Cloning 法 (DNA assembler 法)。

1-4-1.　Gibson Assembly System

本手法は三つの異なる酵素反応を一つのバッファーで行うことで、複数の DNA 断片を一度に繋ぎ合せることができる ; 1) エキソヌクレアーゼが DNA 断片の 5'側を分解し、3'側を突出させる。これにより、他方の相補鎖(オーバーラップする部位)とアニーリングできるようにする ; 2) ポリメラーゼがそれぞれのアニーリングした断片の間のギャップを埋める ; 3) DNA ligase がニックを埋め、DNA をつなぎ合わせる(図 1-17)。

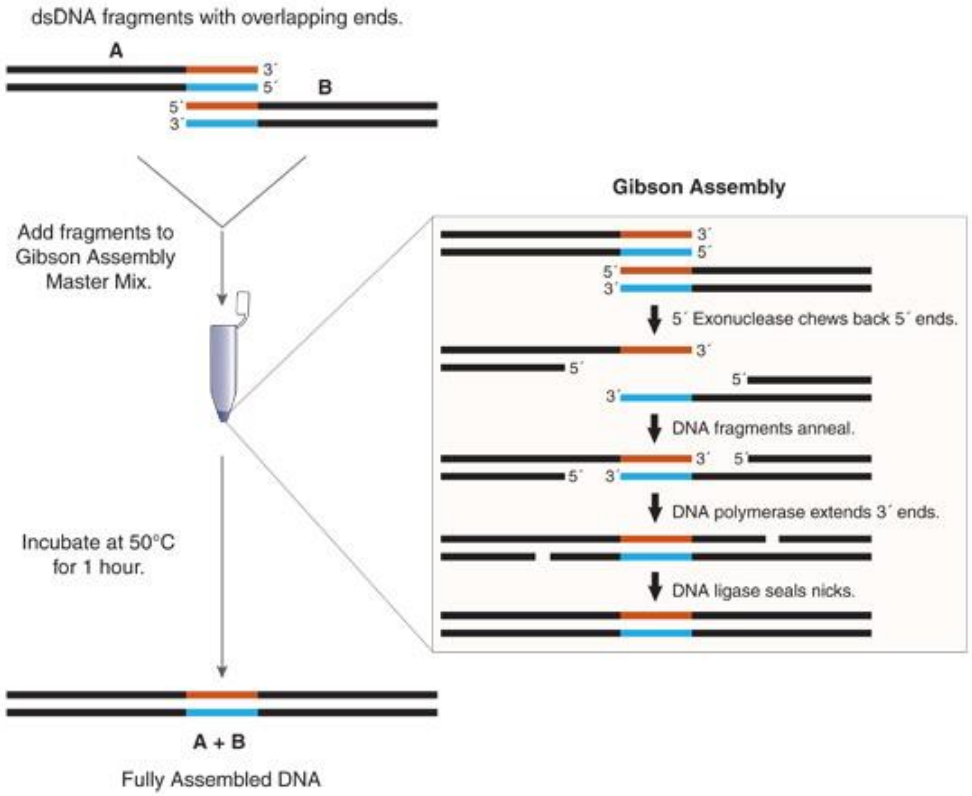


図 1-17.　Gibson Assembly System の概略図

これは In-Fusion 法と非常に近い仕組みである。しかし、In-Fusion 法よりも複数の PCR 産物を一度にベクターに挿入する効率が高い。これを応用すると、二つの MCS を持つベクターに対し、二つのインサートを同時に導入することも容易となる。これまでは一断片ずつ遺伝子を導入し、インサートの挿入を確認してから次の遺伝子を挿入していたため、プラスミドの構築に時間がかかっていたが、この方法では、1 日で二つの遺伝子を組み込んだプラスミドを得られる(図 1-18)。

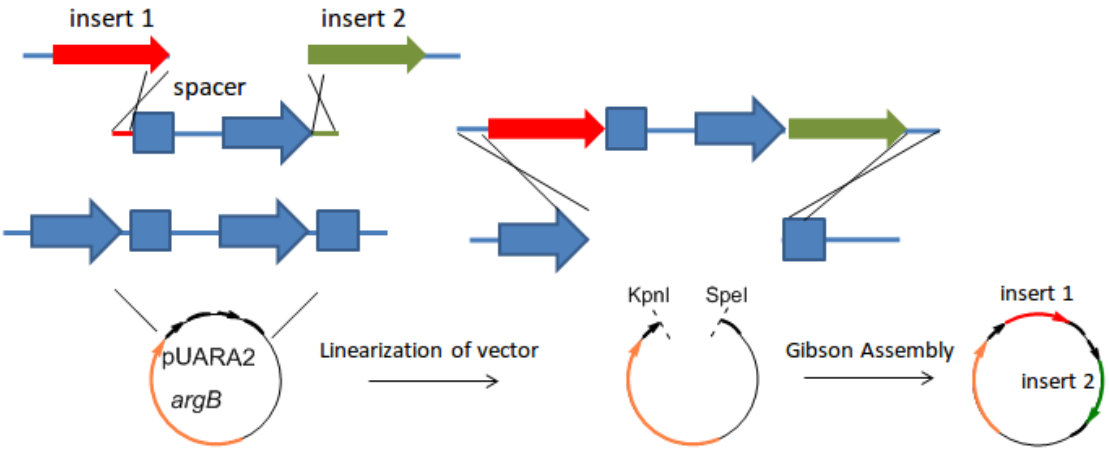


図 1-18.　複数断片の同時導入法

1-4-2.　USER Friendly Cloning Kit

本手法は、New England Biolabs で販売しているキットを使ったクローニング法である（図 1-19）[17]。初めに、Forward と Reverse 両方のプライマーに存在する任意の deoxythymidine (T)を deoxyuridine (U)に置き換え、PCR を行う。この時、校正機能を持つ DNA ポリメラーゼは U をエラーと認識してしまうため、校正機能の低いポリメラーゼを使わなければならない。これは、Stratagene 社から PfuTurbo Cx Hotstart DNA polymerase が販売されている。次に、USER 酵素を使用し、突出末端を作製する。この酵素には、deoxyuridine の uracil 部を選択的に切断する uracil DNA glycosidase と、残った phosphodiseter を除去する DNA glycosylase-lyase endo VIII が含まれている。この二つの活性により、導入した U を含む 5'側の DNA が切除される。これによって生成される突出末端を、つなげたい DNA 断片(ほかの PCR 産物やベクター)と相補的な配列にしておくと、ligase による反応をせずに、環状 DNA を構築でき、大腸菌へ導入できる。

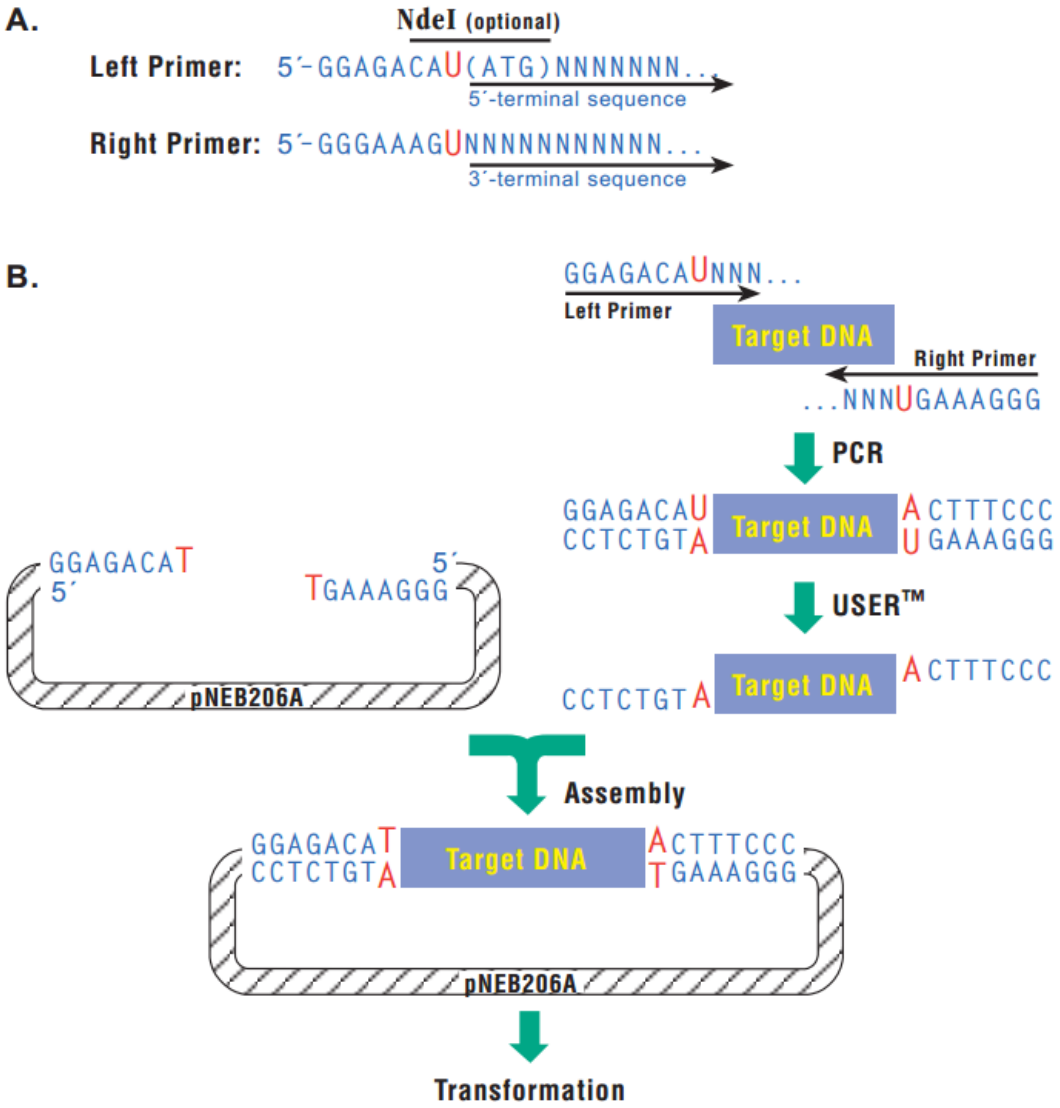
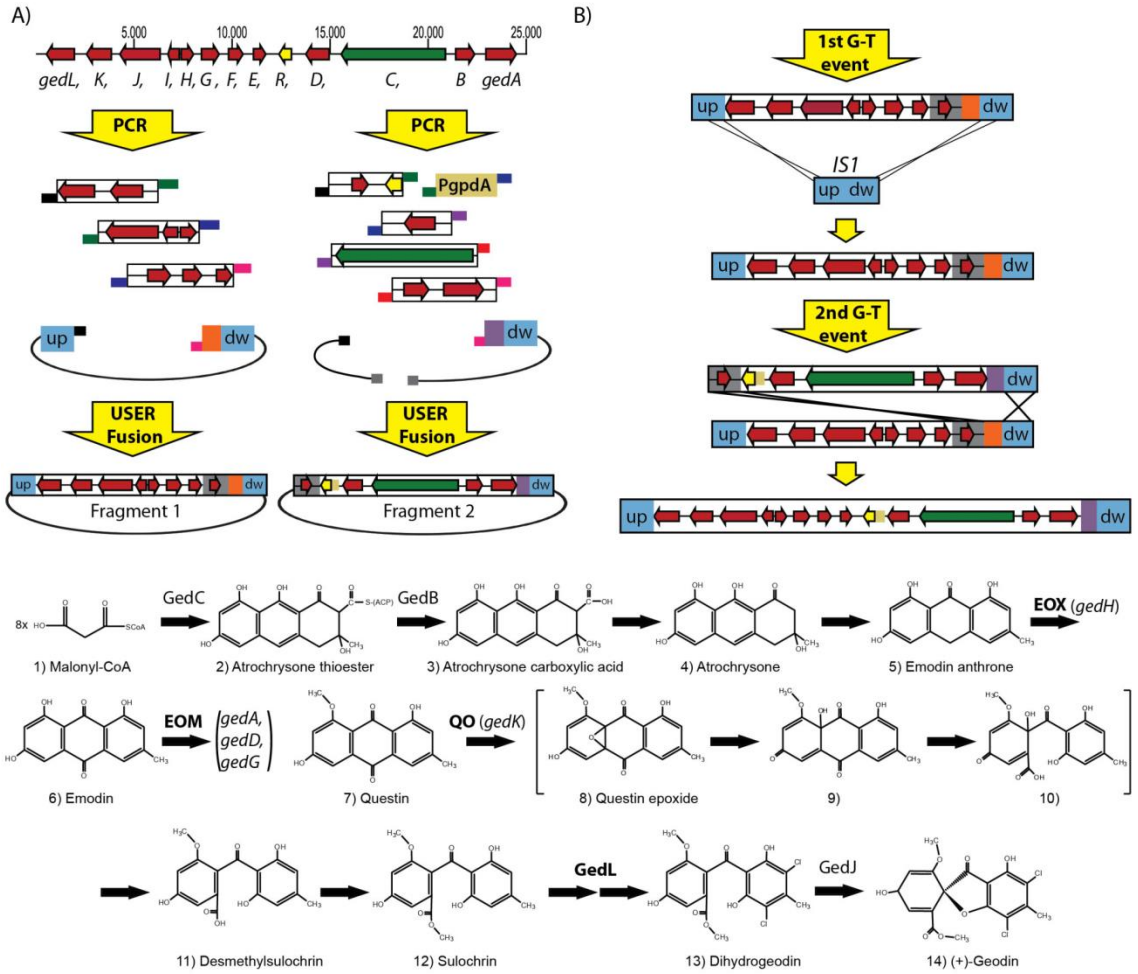


図 1-19.　USER Friendly Cloning Kit の概略図

本手法を用いて、2013 年、Mortensen らは *A. terreus* 由来の geodin 生合成遺伝子クラスターを構成する 13 個の遺伝子をクローニングした。次に、2 つのフラグメントに分けて構築したプラスミドを段階的に *A. nidulans* の *IS1* 遺伝子に相同組換えで導入した(図 1-20)。この時、クラスターに含まれる転写因子を gpdA プロモーターで高発現させることで、geodin の異種生産に成功した[18]。しかし、本手法は校正機能の低いポリメラーゼを使用するため、タンパク質をコードする領域に変異が入る確率が上がるなどの問題も生じる。



BROAD annotation	Proposed annotation	Enzyme class	Validation	Reference
ATEG_08449	GedA	Putative O-methyl transferase*	BLAST, Hhpred	*This study*
ATEG_08450	GedB	β-lactamase type thioesterase	Heterologous expression, in vitro assays	[20]
ATEG_08451	GedC	Polyketide synthase	Deletion mutants, heterologous expression, in vitro assays	[19–21]
ATEG_08452	GedD	Putative O-methyl transferase*	BLAST, Hhpred	*This study*
ATEG_08453	GedR	Putative transcription factor	Deletion mutant, quantitative RT-PCR	*This study*
ATEG_08454	GedE	Putative gluthathione-S-transferase	Annotation from BROAD, BLAST, Hhpred	*This study*
ATEG_08455	GedF	Putative oxidoreductase	BLAST, Hhpred	*This study*
ATEG_08456	GedG	Putative SAM-dependent-methyltransferase*	BLAST, Hhpred	*This study*
ATEG_08457-2	GedH	Putative emodin anthrone oxidase, similar to HypC	BLAST, 34% amino acid identity	*This study*
ATEG_08457-1	GedI	Putative mdpH homolog	BLAST, 46% amino acid identity	*This study*
ATEG_08458	GedJ	Dihydrogeodin oxidase	Enzymatic assays, protein sequencing	[18]
ATEG_08459	GedK	Putative Bayer Villiger-type oxidase	Enzymatic assays, Identity inferred in this study	[17]
ATEG_08460	GedL	Sulochrin halogenase	Deletion mutant, functional complementation	*This study*

All similarity percentages indicate identities at the amino acid level.
*One of these three putative ORFs is likely to encode the emodin O-methyltransferase described by Chen et al [16].
doi:10.1371/journal.pone.0072871.t001

図 1-20.　geodin 生合成遺伝子クラスターの異種発現

1-4-3.　Gap repair cloning (DNA assembler)法

Gap repair cloning 法に類似した DNA assembler 法は、2009 年、Zhao らが開発した方法で、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に複数の DNA 断片を導入し、一段階でプラスミドを組み上げられるほか、酵母の染色体上に挿入もできる[19]。Zhao らは、この方法で *Erwinia uredovora* の zeaxanthin 生合成遺伝子クラスターを再構築した(図 1-21)。

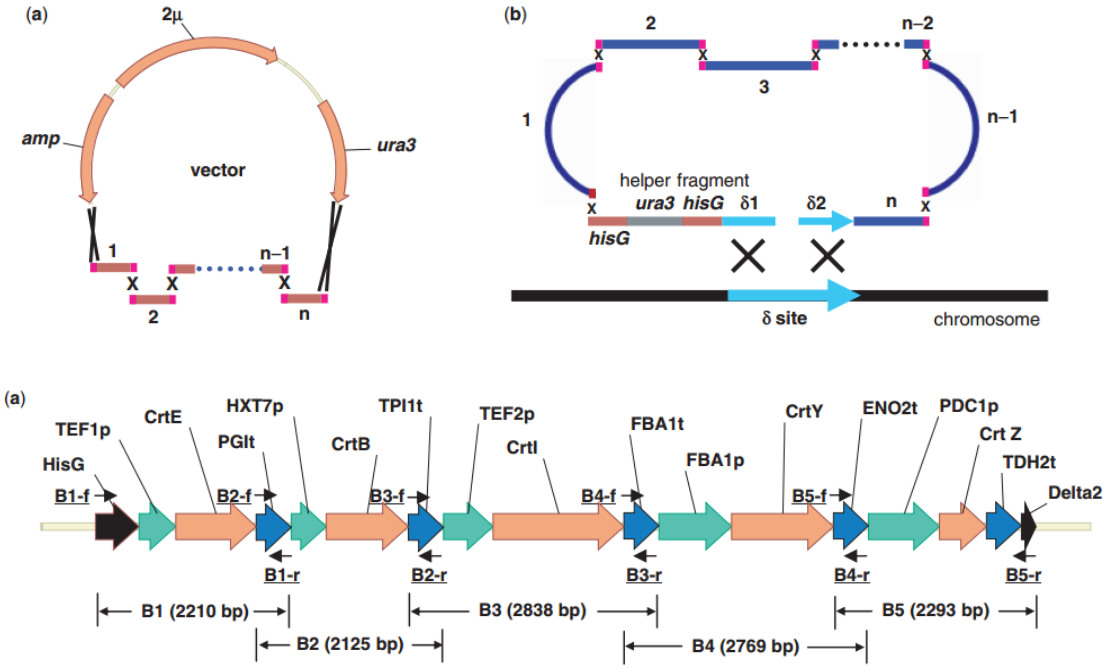


図 1-21.　DNA assembler による zeaxanthin 生合成遺伝子クラスターの再構築

さらに、2013 年、Tang らはこの手法を利用し、neosartoricin B の生合成に関与する全ての遺伝子を *Trichophyton tonsurans* からクローニングした[20]。次に酵母で作成したプラスミドを、*Not*I で線状化し、*A. nidulans* へ導入した。この時、*A. nidulans* の *wA* 遺伝子と相同組換えを起こすようにインサートの配列を設計しておくことで、薬剤や栄養でのスクリーニングの他に、コロニーの色からも形質転換体を選別できるようになる。この研究では、一回目の相同組換えで骨格構築に必要な遺伝子群を導入し、二回目の相同組換えでは、一回目で導入したマーカー遺伝子と *wA* 遺伝子の一部に相同な配列を付加した、修飾酵素を含む遺伝子群を導入した。これにより、*A. nidulans* では本来作らない neosartoricin B に相当する化合物を検出できた(図 1-22)。

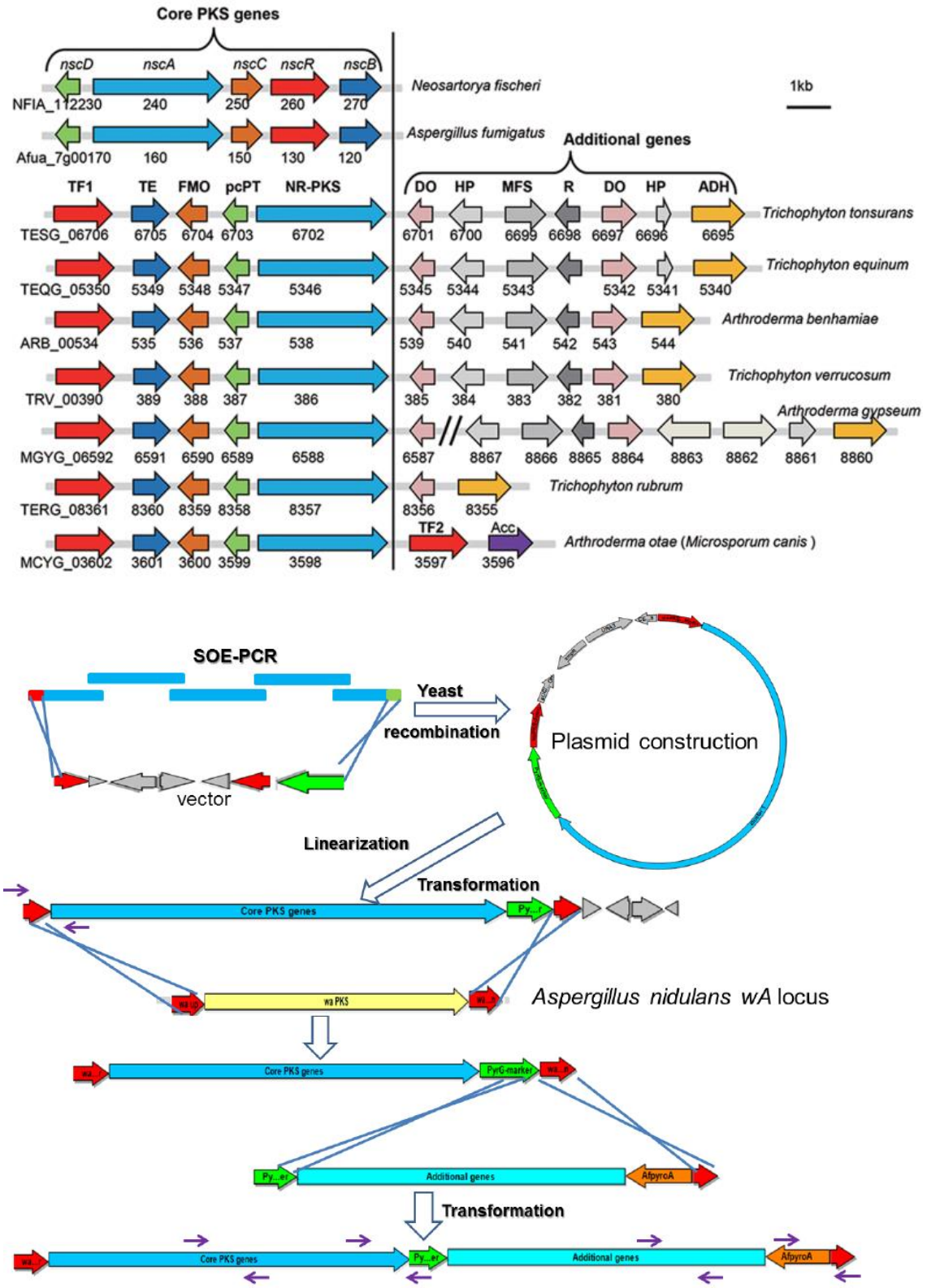


図 1-22.　DNA assembler による neosartoricin B 生合成遺伝子クラスターの再構築

本研究では、機能未知の遺伝子を 1 つずつ解析してきたが、上記のように遺伝子クラスター全体を異種発現し、ゲノムマイニングを行う研究も多数報告されてきた。これらの中には、プラスミドを構築せず、PCR で伸ばした個々の遺伝子を fusion PCR 法で連結し、糸状菌宿主で発現した例も存在する[21]。

2013 年、Oakley らは *A. nidulans* の宿主を改良し、sterigmatocystin や emericellamide などの二次代謝産物の生合成遺伝子を破壊し、余計な代謝産物を作らないクリーンホストを作った。この宿主に対し、*A. terreus* の染色体上に眠った PKS 遺伝子と付随する酵素遺伝子を導入し、網羅的なゲノムマイニングを行った(図 1-23)。このとき、染色体上の *wA* 遺伝子を破壊しつつ目的遺伝子を導入している。すなわち、 *wA* 遺伝子と相同な配列を上流と下流に配置し、その間にマーカー遺伝子(*pyrG*)、プロモーター(PalcA)および目的遺伝子を組み込んでいる。この方法により、彼らは 6 個の PKS 遺伝子を異種発現し、その代謝産物を同定した。この手法は、PCR で DNA 断片を準備できれば、形質転換に利用できるという特性を持つ一方、デメリットも存在する。現在市販されている校正機能を持った DNA ポリメラーゼでも、10kb あたり 1 塩基の変異が入る可能性がある。即ち、長い DNA 断片を PCR し、連結するための fusion PCR として同じ配列を 2 度も PCR すると、変異の入る確率がさらに上昇する。その上、PCR 断片のままでは、保存期間が短かったり、シーケンス解析の信頼性が低かったりと取扱いが不便である。

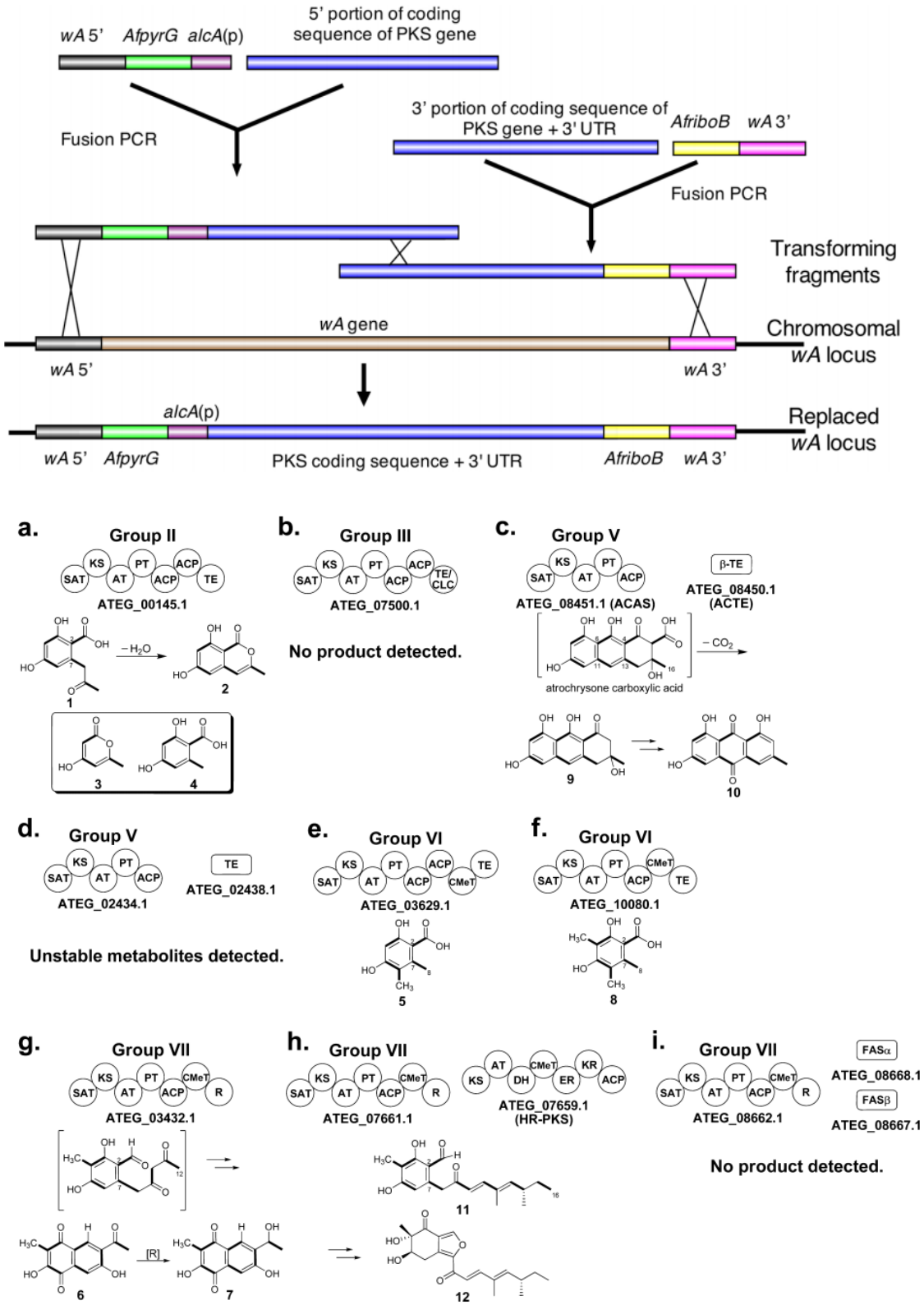


図 1-23.　fusion PCR による相同組換え用カセットの構築と異種発現

このように、様々な生合成遺伝子のクローニング法が開発されてきている。相同組換えを利用する方法では、*A. nidulans* を使用する例が多いが、これは、相同組換えの効率を上げた *nkuA* 破壊株が開発されたためである。同様に Gomi らが非相同組換えを抑えられるように開発した *A. oryzae ligD* 破壊株を作製したため、似た手法でゲノムマイニングをする準備が整ってきている。

さらに、糸状菌発現系の宿主として最近開発されたのが、*Fusarium heterosporum* ATCC 74349 株である。この糸状菌は、Schmidt らが研究しており、corn grit agar 培地で培養すると、equisetin を約 2 g/L 生産する能力を持っている[22]。しかし、これ以外の培地を用いると、生産量が 10 ng/L 程度まで下がる。この生産量の差は、equisetin 生合成遺伝子クラスターに含まれる転写因子 *eqxR* の発現量に起因しており、この転写因子を過剰発現すると、同じ遺伝子クラスターに存在するプロモーターPeqxS が各生合成遺伝子の活性化をするため、生産量が増加する(図 1-24)。彼らは、このプロモーターを強制発現したい遺伝子の直前に挿入したプラスミドを作製し、*F. heterosporum* で異種発現を行った。

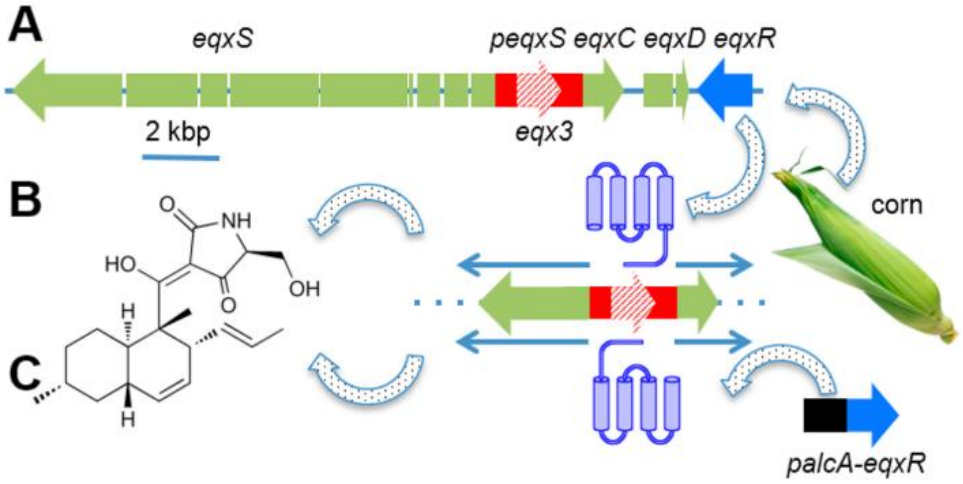


図 1-24.　equisetin 生合成の制御機構モデル

A : equisetin 生合成遺伝子クラスター。eqxS ; PKS-NRPS、eqxC ; ER、eqxD ; メチル基転移酵素

B : 野生株では、トウモロコシ由来の培地でのみ、equisetin の生合成経路が活性化される。

C : 転写因子を alcA プロモーターで過剰発現した際のモデル。この時は、トウモロコシ由来の成分に左右されない。

以上のように、2010 年頃から、複数の遺伝子を糸状菌宿主で機能解析する研究が増えてきた。そこで、先に示した *A. oryzae* 異種発現法の優れた点に着目し、第 2 章では、その汎用性を検討することとした。

参考文献

[1] Toyomasu, T.; Tsukahara, M.; Kaneko, A.; Niida, R.; Mitsuhashi, W.; Dairi, T.; Kato, N.; Sassa, T., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007,** *104* (9), 3084-3088.

[2] Qiao, K.; Chooi, Y.-H.; Tang, Y., *Metab. Eng.* **2011,** *13* (6), 723-732.

[3] Ishiuchi, K. i.; Nakazawa, T.; Yagishita, F.; Mino, T.; Noguchi, H.; Hotta, K.; Watanabe, K., *J. Am. Chem. Soc.* **2013,** *135* (19), 7371-7377.

[4] a) Peters, R. J.; Flory, J. E.; Jetter, R.; Ravn, M. M.; Lee, H. J.; Coates, R. M.; Croteau, R. B., *Biochemistry* **2000,** *39* (50), 15592-15602.; b) Tokiwano, T.; Endo, T.; Tsukagoshi, T.; Goto, H.; Fukushi, E.; Oikawa, H., *Org. Biomol. Chem.***2005,** *3* (15), 2713-2722.

[5] Brundret, K. M.; Hesp, B.; Dalziel, W., *J. Chem. Soc.*,*Chem. Commun.* **1972**, *18*, 1027.

[6] Ikegami, S.; Taguchi, T.; Ohashi, M., *Nature* **1978,** *275* (5679), 458-460.

[7] Toyota, M.; Ihara, M., *Tetrahedron* **1999,** *55* (18), 5641-5679.

[8] Adams, M. R.; Bu'Lock, J. D., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1975,** *10*, 389-391.

[9] Ackland, M. J.; Gordon, J. F.; Hanson, J. R., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1988**, 2009-2012.

[10] Oikawa, H.; Ichihara, A.; Sakamura, S., *Agric. Biol. Chem.* **1989,** *53*, 299-300.

[11] Oikawa, H.; Nakamura, K.; Toshima, H.; Toyomasu, T.; Sassa, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9145-9153.

[12] Oikawa, H.; Toyomasu, T.; Toshima, H.; Ohashi, S.; Kawaide, H.; Kamiya, Y.; Ohtsuka, M.; Shinoda, S.; Mitsuhashi, W.; Sassa, T., *J. Am. Chem. Soc.* **2001,** *123*, 5154-5155.

[13] Toyomasu, T.; Nakaminami, K.; Toshima, H.; Mie, T.; Watanabe, K.; Ito, H.; Matsui, H.; Mitsuhashi, W,; Sassa, T.; Oikawa, H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, *68*, 146-152.

[14] a) Barriuso, J.; Nguyen, D. T.; Li, J. W. H.; Roberts, J. N.; MacNevin, G.; Chaytor, J. L.; Marcus, S. L.; Vederas, J. C.; Ro, D.-K., *J. Am. Chem. Soc.* **2011,** *133*, 8078-8081.; b) Itoh, T.; Tokunaga, K.; Matsuda, Y.; Fujii, I.; Abe, I.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T., *Nat. Chem*. **2010**, *2*, 858-864.

[15] Heneghan, M. N.; Yakasai, A. A.; Halo, L. M.; Song, Z. S.; Bailey, A. M.; Simpson, T. J.; Cox, R. J.; Lazarus, C. M., *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1508-1512.

[16] a) Chiba, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594-597.; b) Tagami, K.; Liu, C.; Minami, A.; Noike, M.; Isaka, T.; Fueki, S.; Shichijo, Y.; Toshima, H.; Gomi, K.; Dairi, T.; Oikawa, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260-1263.; c) Matsuda, Y.; Awakawa, T.; Itoh, T.; Wakimoto, T.; Kushiro, T.; Fujii, I.; Ebizuka, Y.; Abe, I. *ChemBioChem* **2012**, *13*, 1738-1741.

[17] Geu-Flores, F.; Nour-Eldin, H. H.; Nielsen, M. T.; Halkier, B. A., *Nucl. Acids Res.* **2007,** *35* (7).

[18] Nielsen, M. T.; Nielsen, J. B.; Anyaogu, D. C.; Holm, D. K.; Nielsen, K. F.; Larsen, T. O.; Mortensen, U. H., *Plos One* **2013,** *8* (8).

[19] Shao, Z.; Zhao, H.; Zhao, H., *Nucl. Acids Res.* **2009,** *37* (2).

[20] Yin, W.-B.; Chooi, Y. H.; Smith, A. R.; Cacho, R. A.; Hu, Y.; White, T. C.; Tang, Y., *ACS Synth. Biol.* **2013,** *2* (11), 629-634.

[21] Chiang, Y.-M.; Oakley, C. E.; Ahuja, M.; Entwistle, R.; Schultz, A.; Chang, S.-L.; Sung, C. T.; Wang, C. C. C.; Oakley, B. R., *J. Am. Chem. Soc.* **2013,** *135* (20),

7720-7731.
[22] Kakule, T. B.; Jadulco, R. C.; Koch, M.; Janso, J. E.; Barrows, L. R.; Schmidt, E. W., *ACS Synth. Biol*. ASAP.

2 章　ポリケタイドの全生合成研究

2-1.　ポリケタイド合成酵素(PKS)

ポリケタイドの生合成では、酢酸やマロン酸などの単純な短鎖脂肪酸由来の CoA エステルである acetyl-CoA や malonyl-CoA などが、脱炭酸をともなう Claisen 縮合によって進行する主鎖の伸長過程と、鎖上に様々な官能基化が起こる修飾過程が連続して生じる。このようにして生じた鎖状中間体は環化や芳香族化、加水分解などの多様な変換反応によって、様々な骨格をもつ天然物へと導かれる。これらを合成する PKS には、Type I から Type III まで 3 つの種類が存在する[1]。Type I は複数のドメインが一つのポリペプチドとして働く。Type II は別々の酵素が複合体を形成し、ポリケタイド鎖を合成する。Type III はたった一つのドメインがポリケタイド鎖の伸長から環化、切り出しを行う。本研究ではこのうち、全ての糸状菌ポリケタイドに関与する Type I PKS に注目した。

2-1-1.　Type I PKS

Type I と呼ばれる PKS 群は複数の機能ドメインを有しており、構造的特徴が各機能ドメインを繰り返し使用する脂肪酸合成酵素(FAS)と類似している(図 2-1)[2]。

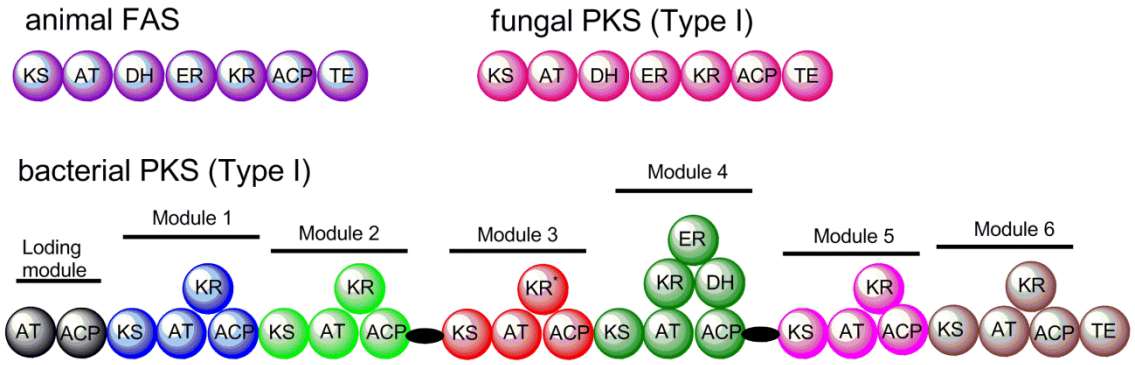


図 2-1.　PKS と FAS の比較

Type I PKS には、放線菌などの細菌に多く見られるマルチモジュラー型と糸状菌などに多く存在する繰返し型がある。マルチモジュラー型の PKS は、一連の機能ドメインをもつモジュールがいくつも連なって、一つの PKS を形成している(図 2-2)。一般に、マルチモジュラー型 PKS では、一つのドメインは一回しか働かず、流れ作業のように、ポリケタイド鎖の伸長と修飾反応が進行する。そのため、ドメインの構成がわかれば、生成するポリケタイド鎖の鎖長および酸化度が推定できる。

ここで、各ドメインの触媒する反応について説明する。初めに、Loading

module の AT (acyltransferase)ドメインが開始単位である基質を ACP (acyl carrier protein)ドメインにローディングする。ACP は、各ドメインの活性部位にアシル基を運ぶ役割を担う。KS (keto synthase)ドメインは上流の ACP ドメインから、自身のシステイン残基にアシル基を受け取る。次に、下流の AT ドメインが同じモジュールの ACP に伸長単位のマロン酸を載せる。すると、KS ドメインが ACP 上のマロン酸の脱炭酸を伴う Claisen 縮合を触媒する。こうして ACP 上には、2 炭素伸長したアシル鎖が生成する。生じたβ-ケト基は KR (β-keto reductase)ドメインが還元し、DH (dehydrogenase)ドメインは生じたアルコールの脱水を触媒する。そして、生成したα,β-不飽和チオエステルは、ER (enoyl reductase)ドメインが飽和なアシル鎖に還元する。最後に、TE (thioesterase)ドメインが伸長したポリケタイド鎖を分子内の水酸基によるマクロ環化もしくは加水分解によって、酵素から切り出す。

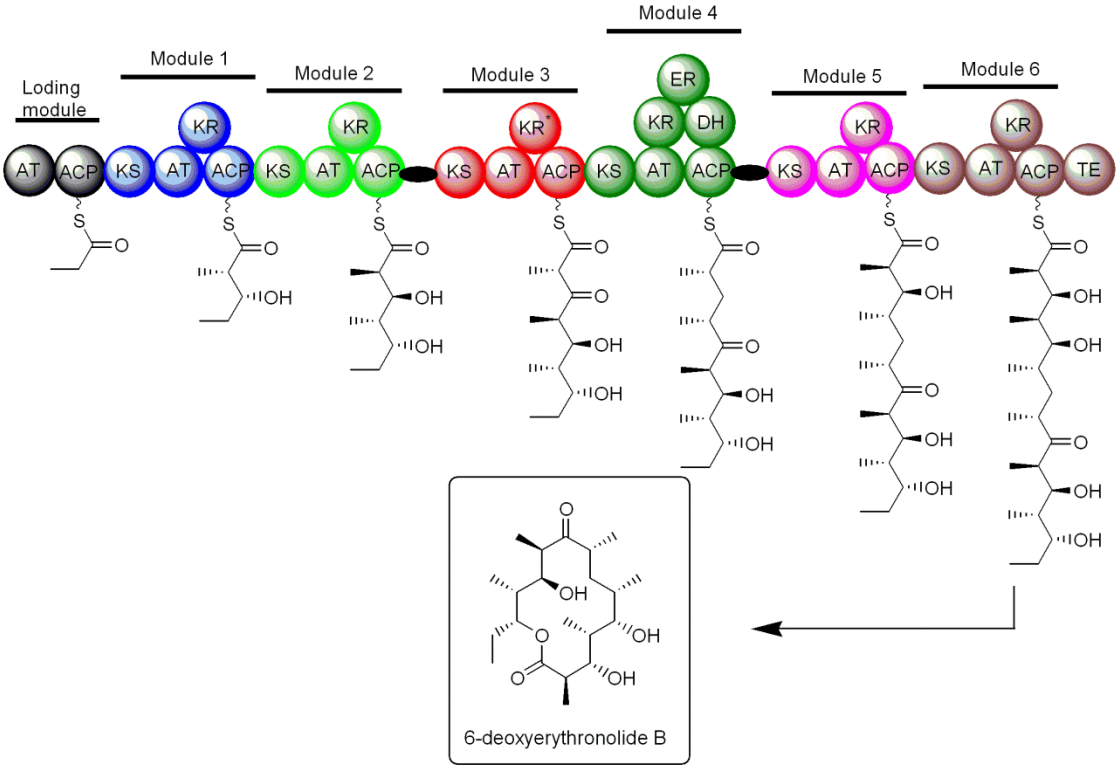


図 2-2.　マルチモジュラー型 Type I PKS の反応

これに対し、糸状菌の繰返し型 PKS はモジュールが一つしかない。これは、一つのモジュールが一連の反応を何度も触媒することで、ポリケタイド鎖の伸長と修飾を行う(図 2-3)。しかし、伸長したポリケタイド鎖の酸化度が異なる場合が多く、複雑な制御機構が働いていると予想されるが、その詳細は不明である。

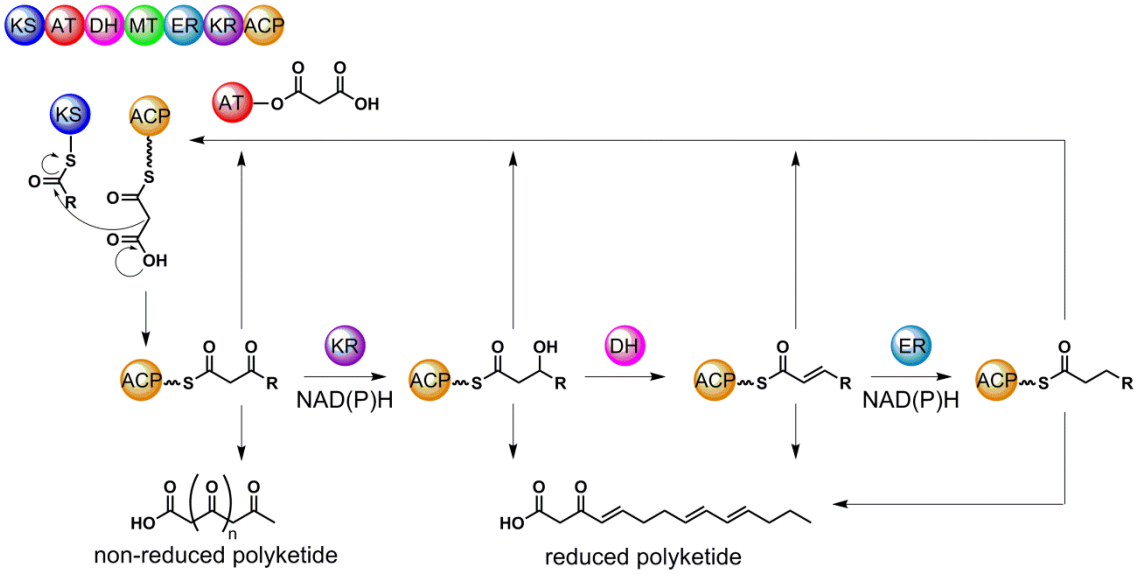


図 2-3.　繰返し型 Type I PKS の反応

ACP ドメインは phosphopantetheinyl transferase (PPTase)による翻訳後修飾を受けて、セリン残基にホスホパンテテニル基を連結される。これにより、導入された置換基は、アシル鎖を各ドメインに運ぶ腕の役割を担う(図 2-4)。

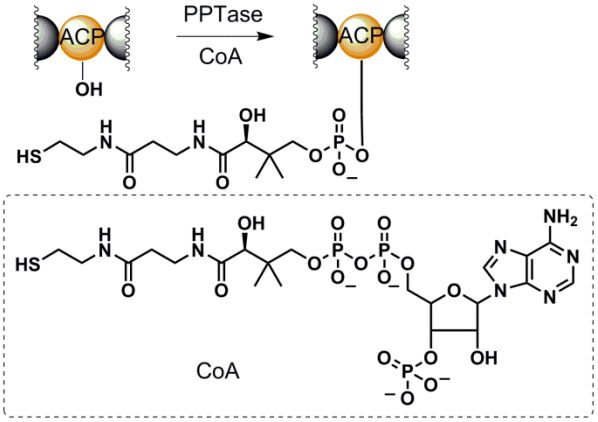


図 2-4.　ACP ドメインの翻訳後修飾

糸状菌の繰返し型 PKS は、ポリケタイド鎖の還元の有無によって、1) nonreducing PKS (NR-PKS)、2) partial-reducing PKS (PR-PKS)、3) highly reducing PKS (HR-PKS)とさらに細かく分類される[3]。

NR-PKS のドメイン構成は、図 2-5 のようになっている。N 末端に開始単位となる基質をローディングする SAT (starter unit-ACP transacylase)ドメインがあり、ACP ドメインの直前に PT (product template)ドメインがある。このドメインは、ある程度伸長が進んだポリケタイド鎖を認識し、芳香環の形成を触媒する。酵素からの切り出しは、TE ドメインもしくは、Claisen 環化を触媒す

る CLC (Claisen cyclase)ドメインが担う。その他、ACP ドメインの後ろに MT (methyl transferase)ドメインを持つものや、チオエステルからの還元的な切り出しを触媒する R (reductase)ドメインを持つものも報告されている。KR や ER など、β-ケトエステルや不飽和結合を還元するドメインは存在しない。また、NR-PKS の SAT ドメインは基質認識が多様で、通常の開始単位である acetyl-CoA の他、ヘキサン酸(norsolorinic acid)や別の PKS によって作られた長鎖のポリケタイド鎖(zearalenone など)も基質としてローディングできる。

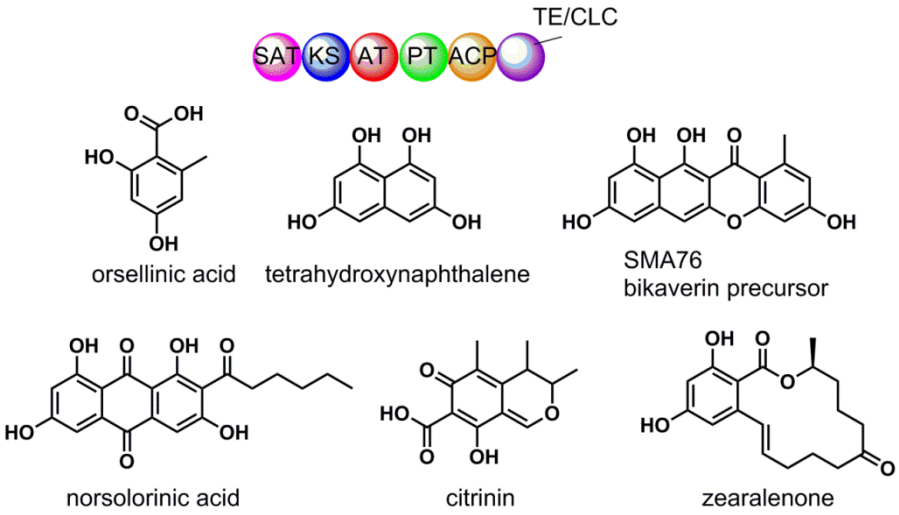


図 2-5.　NR-PKS のドメイン構成と最終生成物の構造

PR-PKS のドメイン構成は図 2-6 のようになっており、哺乳類の FAS と似ている。NR-PKS とは異なり、SAT や PT ドメインはないが、酵素二量体を形成する際に重要な Core ドメインをもつ。また、切り出しを触媒するドメインも持っていないため、合成されたアシル鎖は、ベンゼン環やピロン環を形成しつつ酵素から切り出される。

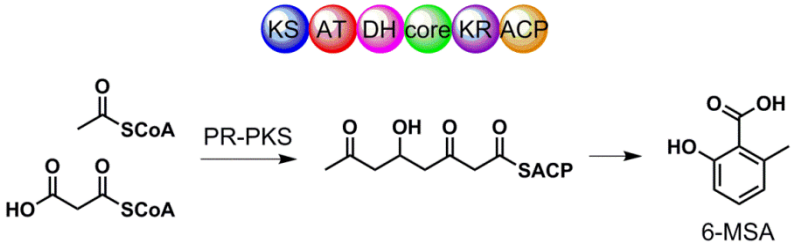


図 2-6.　PR-PKS のドメイン構成と最終生成物の構造

HR-PKS は ER や KR といった還元ドメインを有し、多様な酸化度のポリケタイド鎖を合成する。また、モジュール内の ER ドメインが機能せず、独立した酵素(trans-ER)として働くものも知られている。酵素からの切り出しには、

TE ドメインや R ドメインが働く場合もあるが、PR-PKS のように環化して切り出されることもある。さらに、一分子のアミノ酸をポリケタイド鎖に組み込める NRPS (non-ribosomal peptide synthetase)モジュールを持った PKS-NRPS ハイブリッドも HR-PKS に属する(図 2-7)。

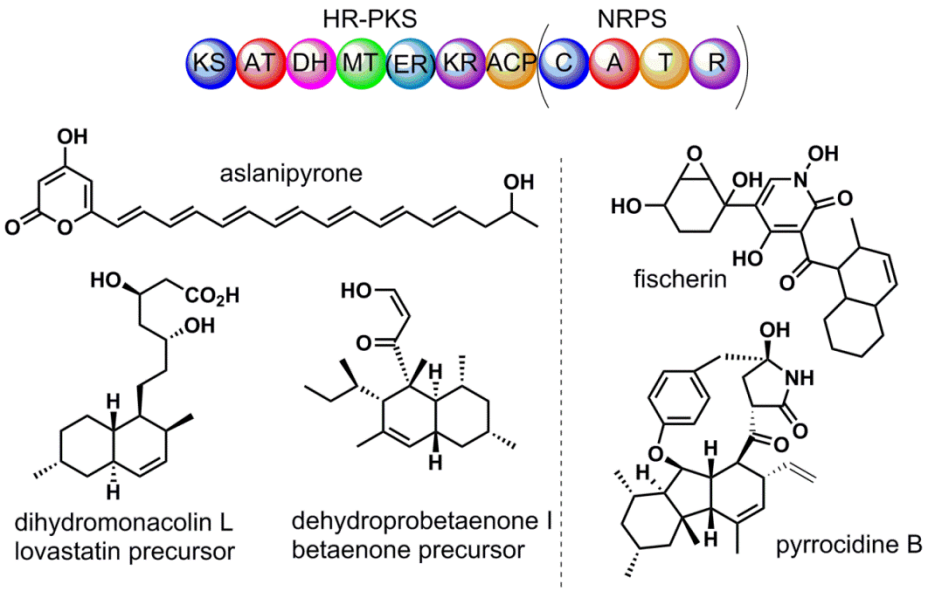


図 2-7.　HR-PKS のドメイン構成と最終生成物の構造

PKS と融合している NRPS モジュールに存在する基本ドメインは 4 種あり、特定のアミノ酸を選択し、ATP を用いて活性化する A (adenylation)ドメイン、活性化したアミノ酸を保持する T (thiolation)ドメイン、上流のアシル鎖と T ドメインに結合したアミノ酸を縮合する C (condensation)ドメイン、そして R ドメインである。

Type I PKS の系統樹解析から、ドメイン構成によってこれらの PKS が異なる Clade に分類される。また、この解析結果から、HR-PKS と FAS はドメイン構成が似ているにもかかわらず、遠縁であることがわかる(図 2-8)[4]。

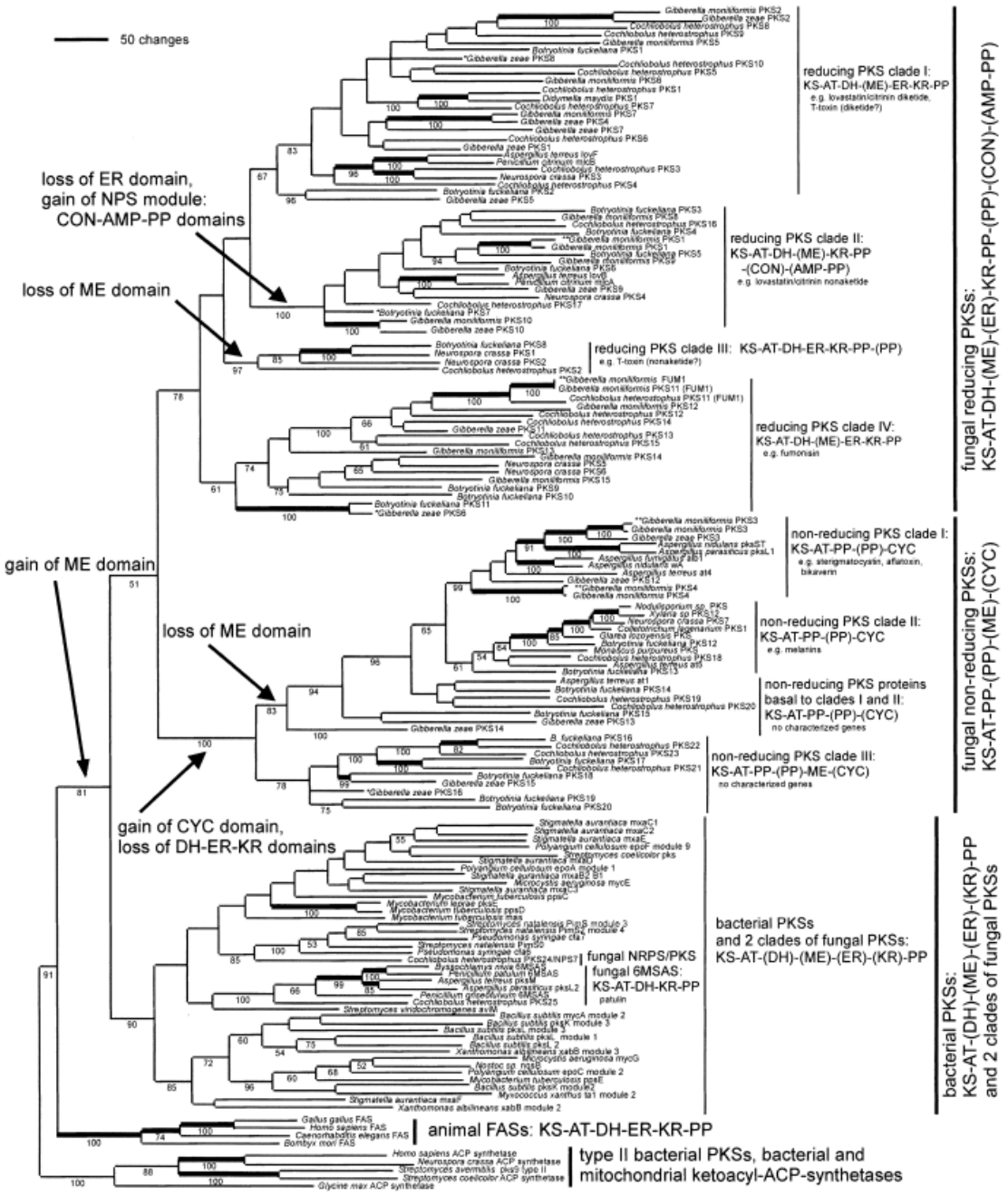


図 2-8.　PKS の系統樹解析

2-2.　solanapyrone の全生合成の検討

馬鈴薯夏疫病菌 *Alternaria solani* ASP-2 から単離された植物毒素 solanapyrone A(**6**)は、ピロン環とデカリン骨格を有するポリケタイドである。代表的な生理活性として、真核生物の DNA polymerase βの阻害活性が知られている[5]。**6** の生合成では、Diels-Alder 反応の関与が実験的に証明されており[6]、Oikawa らの詳細な生合成研究により、全ての生合成中間体が合成されている[7]。

さらに、2010 年、Kasahara らは、solanapyrone 生合成遺伝子クラスターには、PKS 遺伝子 *sol1*、メチル基転移酵素遺伝子 *sol2*、脱水素酵素遺伝子 *sol3*、転写因子 *sol4*、フラビン依存性酸化酵素遺伝子 *sol5*、P450 遺伝子 *sol6* が含まれていることを見出した[8]。彼らは麹菌および酵母を宿主に、Sol1 と Sol5 を発現し、その機能解析を行なった。その結果、**6** の生合成では、PKS によって生じた中間体 **7** がメチル化と水酸化を受け、Sol5 がアルコールをアルデヒドに酸化した後、Diels-Alder 反応を触媒してデカリン骨格を構築するという生合成経路を解明した(図 2-9)。また、Sol3 は **6** のアルデヒドを還元し、solanapyrone B を与えると考えられる。

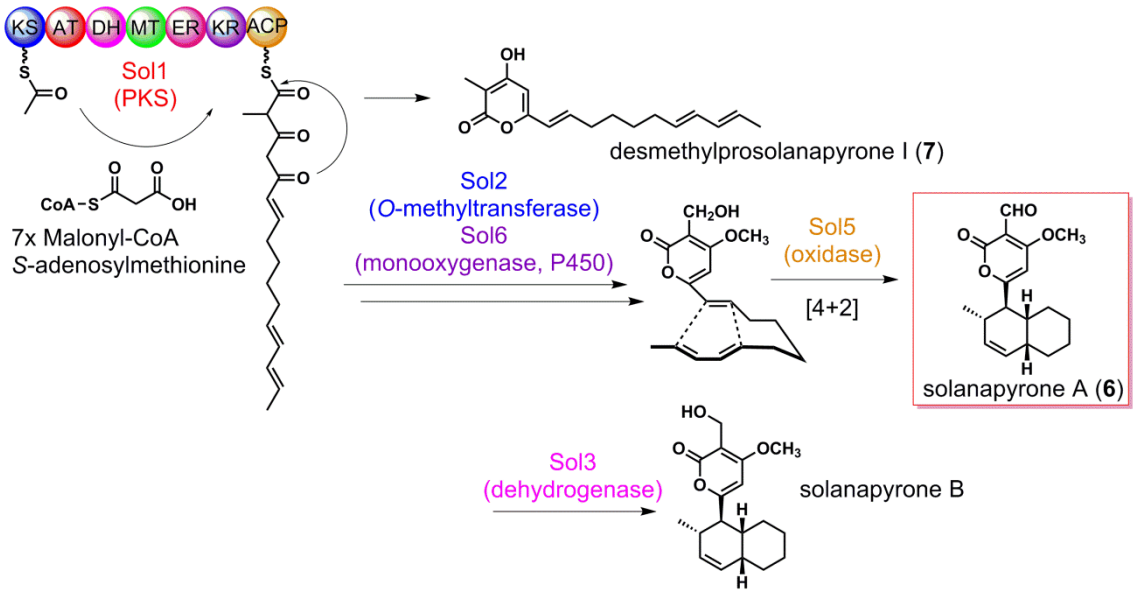


図 2-9.　solanapyrone の生合成経路

本研究では、2 種の修飾酵素の基質と生成物の同定および天然物の全生合成を行った。最初に導入する PKS 遺伝子がテルペン環化酵素に比べ、8 kb と大きいため、形質転換効率は低くなることが懸念された。

2-3. 実験結果と考察

2-3-1.　プラスミド構築

sol1/pTAex3 と *sol5*/pTAex3 は、岩手医大の藤井勲教授から譲り受けた[8]。*sol1* 以外の遺伝子は、既に構築されたプラスミドもしくは *A. solani* ASP-2 のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、それぞれ別のベクターに In-Fusion 法を用いて挿入した。aphidicolin のときと同様に、プロモーター領域を持たないベクターに遺伝子を導入する際は、一度 pTAex3 に遺伝子を挿入し、PamyB-TamyB を含む領域を PCR で増幅した後、目的のベクターに組み込んだ。このようにして、

sol1/pTAex3、*sol2*/pPTRI、*sol6*/pUSA、*sol5*/pAdeA の 4 種のプラスミドを作製した。

また、後述するが、NCBI に掲載されていた *sol6* の遺伝子配列は誤りであった。そのため、*sol6* は 3'末端を長くした領域でクローニングし直した。その際、*sol2* 遺伝子も再導入することで、二重形質転換体も再調製することとした。この時、2 つの遺伝子を一つのベクターに載せられる pUSA2 を入手していたため、*sol2* 遺伝子をセレクションに制限のある pPTRI から pUSA2 に移し変えた。これら二つの遺伝子のクローニングでは、*sol2*/pUSA2 と *sol6*/pUSA2 を最初に構築し、次に *sol6* 遺伝子を *sol2*/pUSA2 に挿入して *sol2*+*sol6*/pUSA2 を構築した。

2-3-2.　形質転換体の作製と代謝産物の解析

sol1 形質転換体

初めに、*sol1*/pTAex3 を *A. oryzae* NSAR1 に導入した。取得した 7 コロニーのうち、4 つの *sol1* 形質転換体を CMP 培地で 1 週間培養し、代謝産物を抽出した。この菌体抽出物をメチル化した後、prosolanapyrone I (**8**)の標品と比較した。

HPLC 解析の結果、 2 つの形質転換体からの抽出物のメチル化物に **8** の標品と保持時間が一致するピークを検出した。したがって、*sol1* 形質転換体が **7** を生産していることが判明した(図 2-10)。このうち生産量の高い株を米培地で培養した結果、米 1 kg 当たり 120 mg の収量で目的物を得た。

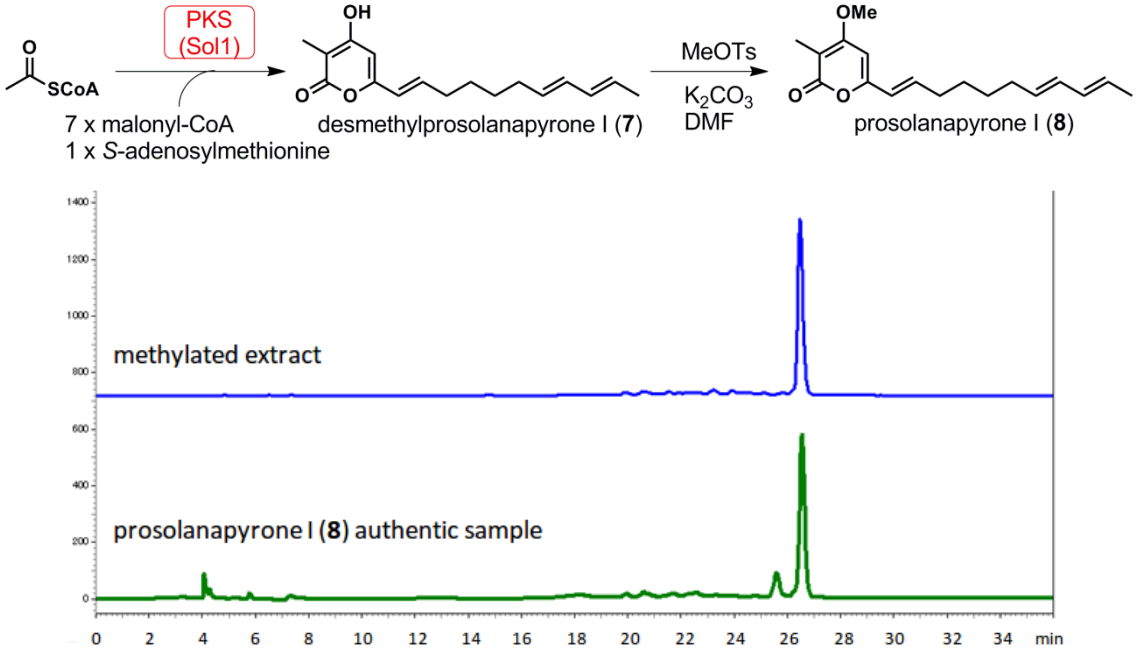
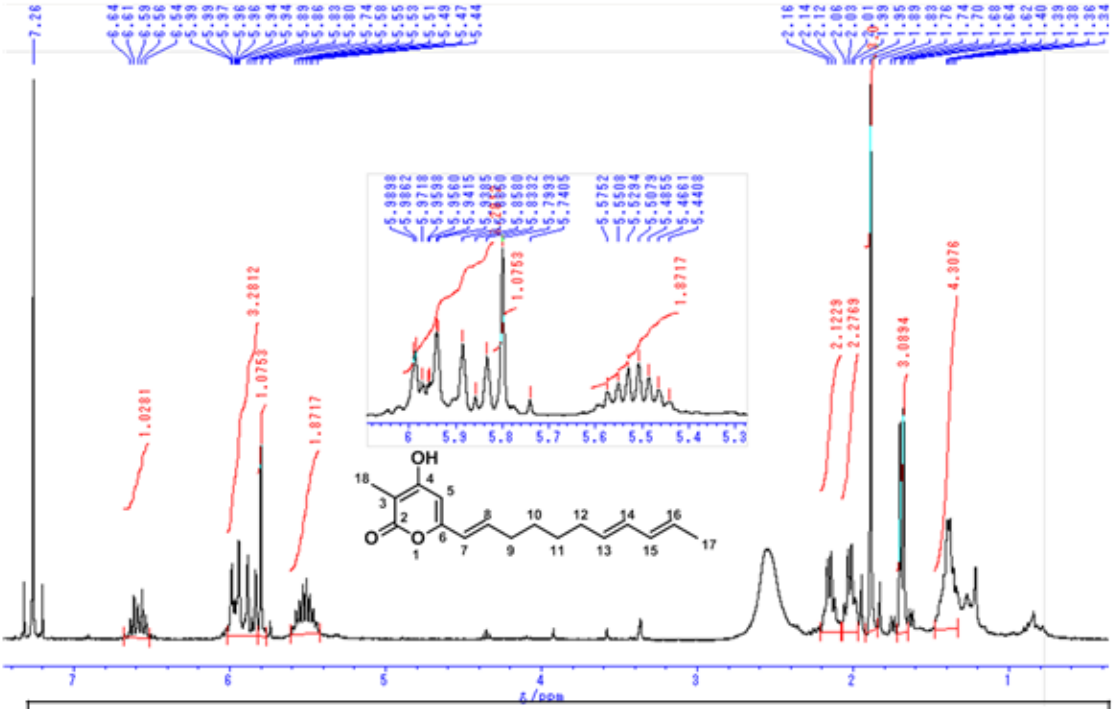


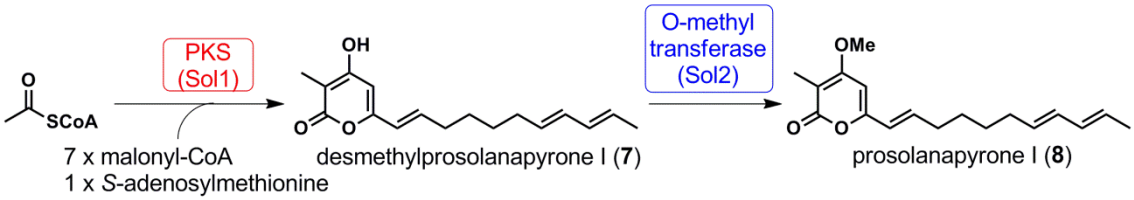
図 2-10.　*sol1* 形質転換体代謝産物の HPLC チャート



^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm					
H-5	5.80 (s, 1H)	H-11	1.38 (m, 2H)	H-16	5.50 (m, 1H)
H-7	5.90-6.01 (m, 1H)	H-12	2.02 (q, *J* = 6.5 Hz, 2H)	H-17	1.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H)
H-8	6.59 (dt, *J* = 16, 7.1 Hz, 1H)	H-13	5.52 (m, 1H)	H-18	1.89 (s, 3H)
H-9	2.15 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H)	H-14	5.81-6.01 (m, 1H)		
H-10	1.39 (m, 2H)	H-15	5.81-6.01 (m, 1H)		

図 2-11.　単離した desmethylprosolanapyrone I(**7**)の ^{1}H NMR スペクトル

sol1 + *sol2* 二重形質転換体



sol2/pPTRI を *sol1* 形質転換体に導入した。取得した 20 コロニーのうち、4 コロニーを MPY 培地で培養し、代謝産物を HPLC で解析した(図 2-12)。一つの形質転換体の抽出物から新たに検出した代謝産物を MS および NMR で解析した。MS 解析から、**7** の分子量(274.16)にメチル基と 2 つの酸素原子が増加した *m/z* 345.17 $[M+Na]^+$のピークと、脱水したとみられる *m/z* 305.16 $[M-H_2O+H]^+$のピークが観測された。^{1}H-NMR スペクトルを測定した結果、3.87 ppm に 3 H 分のシグナルが観測された。従って、水酸基にメチル基が導入され

た構造が支持された(図 2-13)。また、ピロン部位に相当するシグナルには変化がなく、5.81-6.01 ppm の 1 H(15 位)、5.50 ppm の 1 H(16 位)さらに 1.69 ppm の 1 H(17 位)のシグナルが消失し、それぞれ 4.01 ppm(15 位)、3.85 ppm(16 位)、1.13 ppm(17 位)に新たなシグナルが観測された。これにより、末端の二重結合がジオールに変換された prosolanapyrone-15,16-diol (**9**)が得られたと考えられる。さらに、その上、この構造は、**8** を mCPBA 酸化して得られた位置異性体(1:1)を加水分解した化合物の一方と一致することからも確認した。

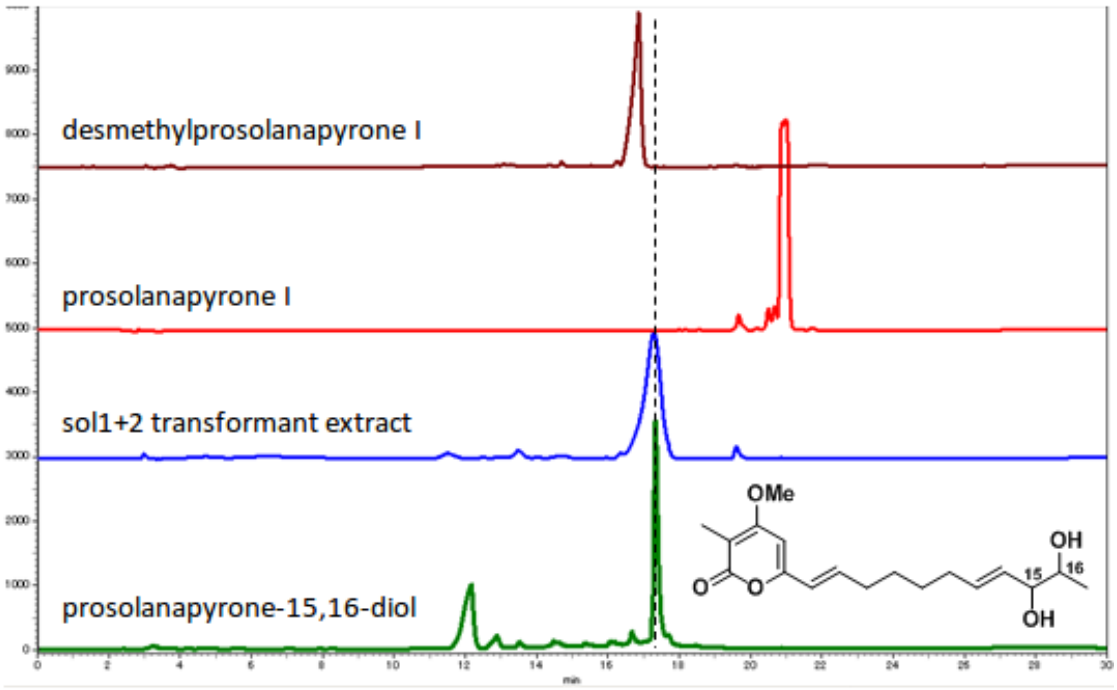
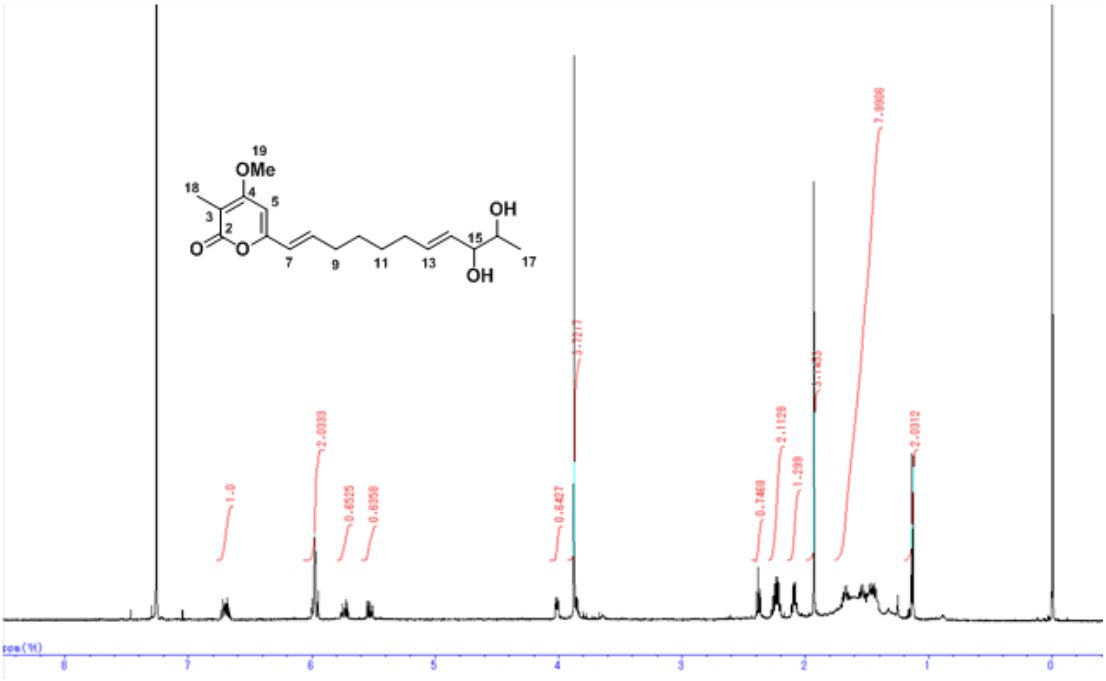


図 2-12.　*sol1*+*sol2* 形質転換体代謝産物の HPLC チャート



^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm					
H-5	5.98 (s, 1H)	H-11	1.46-1.67 (m, 2H)	H-16	3.85 (m, 2H)
H-7	5.97 (m, 1H)	H-12	2.09-2.38 (m, 2H)	H-17	1.13 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H)
H-8	6.70 (m, 1H)	H-13	5.74 (dt, *J* = 16, 6.9 Hz, 1H)	H-18	1.93 (s, 3H)
H-9	2.23 (dt, *J* = 13, 6.8 Hz,, 2H)	H-14	5.53 (dd, *J* = 16, 7.0 Hz, 1H)	H-19	3.87 (s, 3H)
H-10	1.46-1.54 (m, 2H)	H-15	4.01 (dd, *J* = 7.0, 4.0 Hz, 1H)		

図 2-13.　単離した prosolanapyrone-15,16-diol (**9**)の ^{1}H NMR

この二重形質転換体に *sol6* 遺伝子を導入したところ、新規代謝産物は得られなかった。Sol6 による水酸化反応が観測されなかった原因として、遺伝子の読み枠である open reading frame (ORF)が何らかの原因で異なっていることが考えられた。そこで、イントロンを予測できる web ツールである AUGUSTUS の機能を組み込み、ゲノム DNA の配列を導入すると、エキソン領域や転写の向き、予想タンパク質のアミノ酸配列、そして既知配列との相同性が一度に検出できる 2ndFind (http://biosyn.nih.go.jp/2ndfind/)を用いて、solanapyrone 生合成遺伝子クラスター全長を解析すると、NCBI に記載されていた *sol6* 遺伝子よりも 3'側が長い配列が ORF として検出された(図 2-14)。

A

B

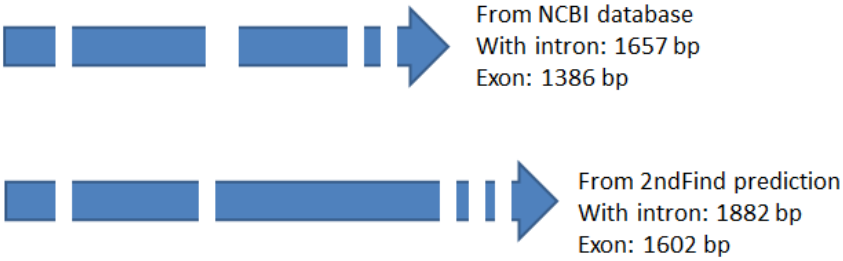


図 2-14.　A : *sol6* 遺伝子 3'末端の比較。上段 : 2ndFind による予測。下段 : NCBI 記載の DNA 配列。B : *sol6* 遺伝子のイントロン位置の予測。

図 2-14-B に予測されたイントロンの位置を示した。これにより、5'側から 2 つ目のイントロンの長さが異なっているため、終止コドンの位置が変わったと推測できる。このようにイントロンの位置が変わると、全く別のポリペプチドが作られるようになる。このことから、新たに推定された *sol6* 遺伝子の再クローニングを検討した。

次に前述したように調製したプラスミド(*sol2*/pUSA2, *sol6*/pUSA2, *sol2*+*sol6*/ pUSA2)を用いて再度 *sol1* 導入株を形質転換した。

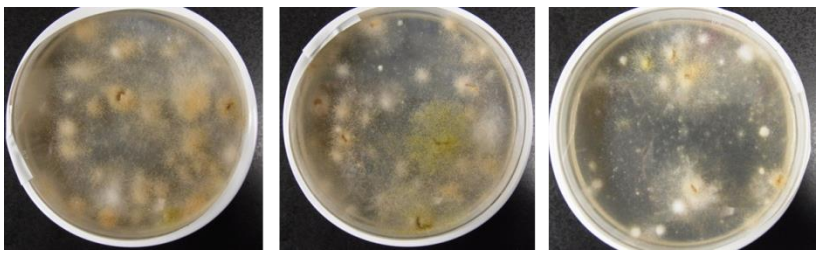


図 2-15.　各形質転換体の生育状況。右 : *sol1*+*6*。中央 : *sol1*+*2*。左 : *sol1*+*2*+*6*。

各形質転換体は、MPY 培地で 1 週間、30 ℃で振盪培養し、代謝産物を HPLC で解析した。また、全ての化合物は、HPLC で精製し、^{1}H NMR にて構造を同定した。

sol1+*sol2* 二重形質転換体

新たに調製した二重形質転換体 18 コロニーのうち、6 コロニーを MPY 培地で培養した。得られた菌体抽出物からは、prosolanapyrone (**8**)が検出され、培養条件によっては問題になったジオール(**9**)は、主生成物として得られなかった(図 2-16-A)。**8** が観測された 3 つの形質転換体のうち、最も生産量の高かった形質転換体を米培地で培養した。その結果、**8** を 26 mg/kg、**9** を 9.0 mg/kg の収量で生産した。さらに、培養日数を変えることによる **9** と **8** の生成比の変化を観測した結果、1 週間では **9** の生成量が **8** に比べて 0.5 倍であったのに対し、2 週間では 1.3 倍、 4 週間では 3.6 倍となった。

sol1+*sol6* 二重形質転換体

観測された 15 個の形質転換体のうち、6 コロニーを MPY 培地で培養した。これらの菌体抽出物を解析した結果、desmethylprosolanapyrone I (**7**)が主生成物として得られた(図 2-16-B)。これよりも溶出時間の早い位置に新たなピークが観測されたが、不安定なためか精製できず、構造を決定できなかった。ただし、UV の吸収スペクトルから、ピロン環を有する化合物であることが支持された(図 2-16-C)。

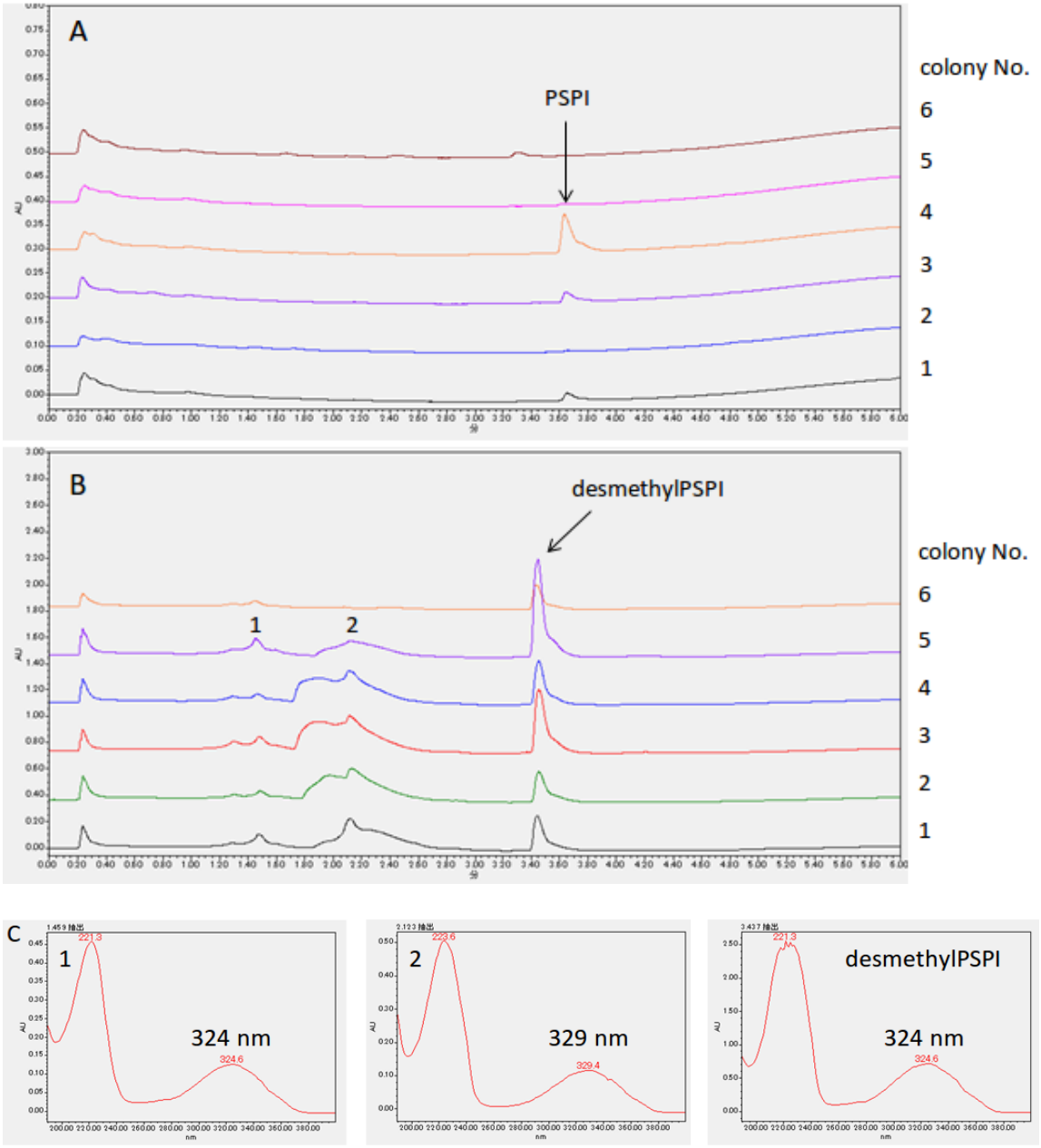


図 2-16.　二重形質転換体の代謝産物の HPLC チャート(320 nm)。A: *sol1*+*sol2* 形質転換体。B: *sol1*+*sol6* 形質転換体。C: *sol1*+*sol6* 形質転換体で観測されたピークの UV スペクトル

sol1+*sol2* 二重形質転換体からは、**8** の他にジエンがエポキシ化を受けさらに加水分解したジオールが検出された。このように *A. oryzae* を宿主としたときにポリケタイド鎖末端のオレフィンが酸化された例が他にも存在する。2011 年、Cox らは、*A. oryzae* M-2-3 を宿主に bassianin 生合成遺伝子のひとつである *dmbS* を異種発現した際に、共役オレフィンが酸化された proto-DMB や

prototenellin C が得られることを報告した[9]（図 2-17)。また Cox 研究室の博士論文でも同様の現象を報告している。*Magnaporthe grisea* に存在する PKS-NRPS 遺伝子 *ace1* を異種発現した際、アミノ酸の縮合が起こらず、PKS 部分で鎖伸長が停止した。このアシル中間体はピロン環形成により、酵素から切り出された後、共役オレフィンに同様の酸化修飾を受けた[10]。先の実験結果と合わせて考えると、このジオールはエポキシドを経由して生成すると考えられる。また、導入した遺伝子の機能から推測すると、エポキシ化および開環反応は宿主の持つ酸化酵素が触媒すると思われる。エポキシドの開環反応は、pyripyropene A や paxilline の生合成中間体でも観測されている[11]。

このような副反応は *A. oryzae* 異種発現系の問題点となりうるため、酸化酵素の特定を試みた。まず、このエポキシ化を触媒する酵素として P450 を想定した。九州大学の Ichinose らは、*A. oryzae* に存在する 155 個の P450 を酵母で発現したライブラリーを所有しており[12]、迅速なスクリーニング法を用いた活性試験を共同で行った。その結果、3 個の P450 が **8** を変換したが、ジオールもしくはエポキシドとは一致しなかった。この結果から、それ以外の酸化酵素、例えばフラビン依存型の酸化酵素なども候補として挙げられる。

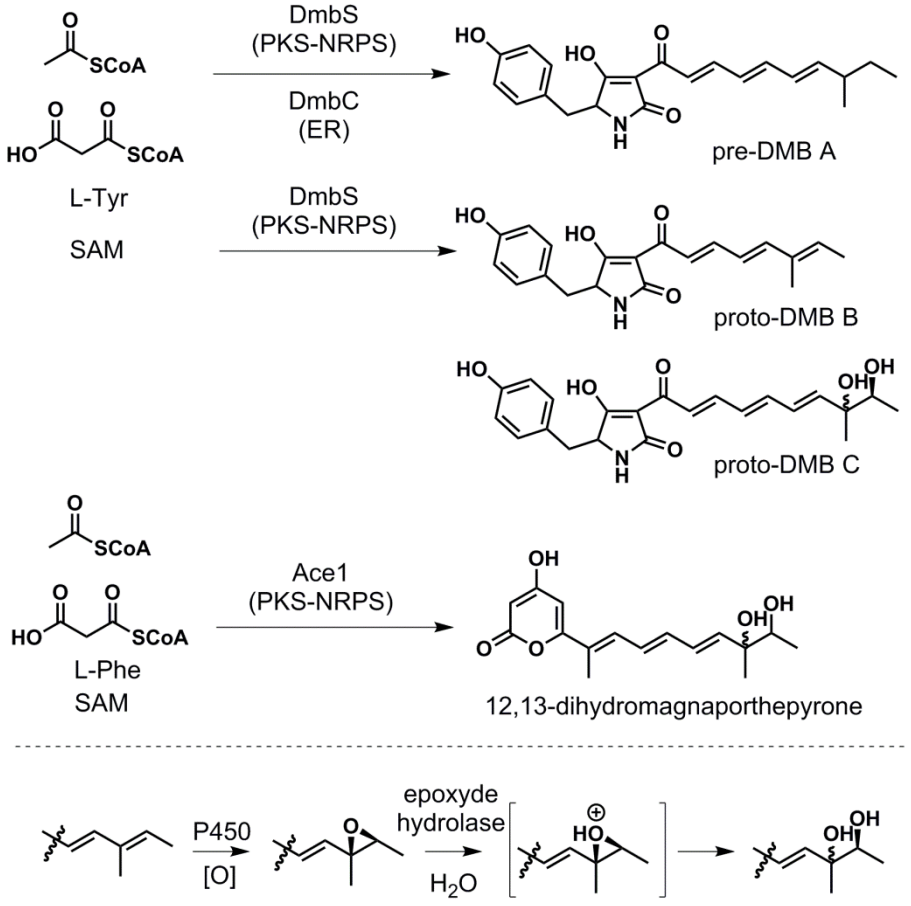


図 2-17.　異種発現により得られたポリケタイド中間体からのジオール生成機構

このエポキシ化反応の不思議な点は、**8** では進行し、O-メチル化されていない **7** では進行しなかった点である。また、共役オレフィンが *A. oryzae* によってエポキシ化されなかった例も報告されている（図 2-18）[13]。これらの構造から、エポキシ化を触媒する宿主由来の酸化酵素は、PKS もしくは PKS-NRPS によって生合成された化合物に対して働き、共役オレフィンの末端を酸化するが、基質の全体的な構造を認識しており、活性部位にうまく収まらなかった化合物は酸化しないと考えられる。このように、基質との親和性が低いことは、**8** から **9** への変換が遅いという実験事実と一致している。

sol1+*sol6* 二重形質転換体では、**7** が残っていたことから、Sol2 による O-メチル化が先に進行し、次に Sol6 による水酸化が起こることがわかった。

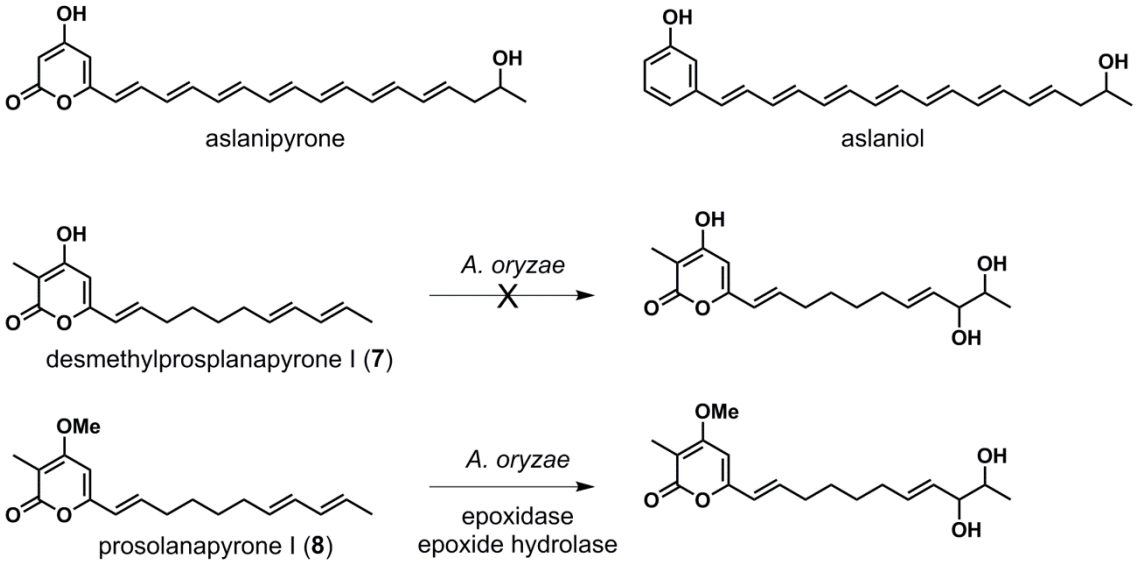
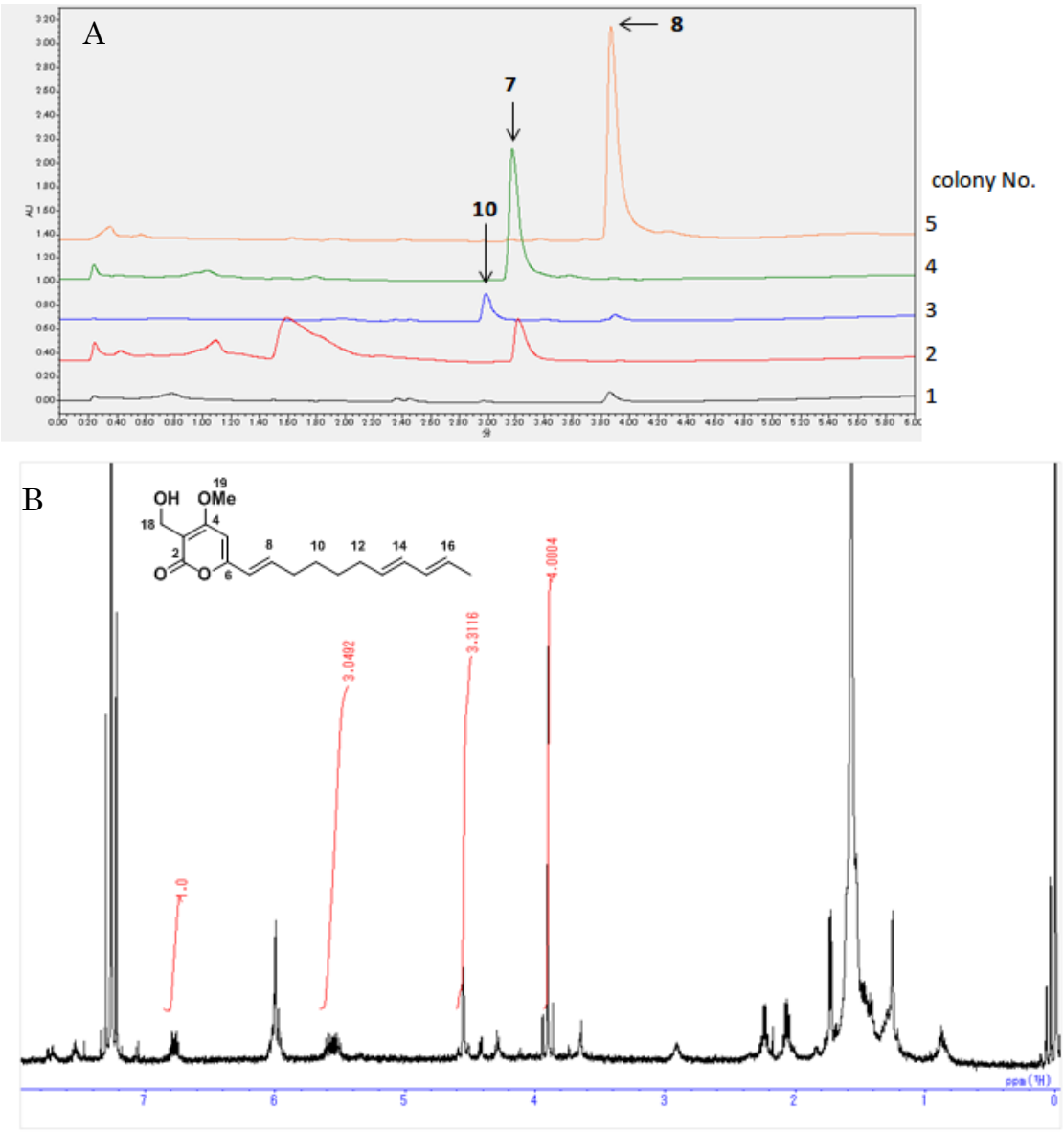


図 2-18.　宿主由来の酸化酵素の基質特異性

sol1+*sol2*+*sol6* 三重形質転換体

sol1 形質転換体に対して、2 つの遺伝子を *sol2*+*sol6*/pUSA2 を使って導入した。こうして得られた形質転換体 30 コロニーのうち、5 コロニーの代謝産物を解析した。その結果、3 番のコロニーで新たなピークが検出されたため、^{1}H NMR で構造を確認した(図 2-19)。すると、prosolanapyrone I (**8**)のピロン環に結合しているメチル基のシグナルが消失し、4.55 ppm に新たに水酸化されたメチレンに相当するシグナルが観測され、標品 NMR データと一致したため[6]、メチル基が水酸化された prosolanapyrone II (**10**)が得られたことを確認した。また、2 つの遺伝子を導入したにも関わらず、Sol2 のみが働いて **8** が得られた形質転換体や、Sol6 のみが働いたと思われる形質転換体も観測された。この 3 番の形質転換体を米培地で培養した結果、1 kg 当たり 12.5 mg の収量で **10** が得られた。



^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm					
H-5	5.98 (s, 1H)	H-11	1.46-1.67 (m, 2H)	H-16	5.95-6.05 (m, 1H)
H-7	5.97 (m, 1H)	H-12	2.07 (dd, *J* = 15, 7.5 Hz, 2H)	H-17	1.73 (d, *J* = 6.0 Hz, 3H)
H-8	6.70 (dt, *J* = 15, 7.0 Hz, 1H)	H-13	5.95-6.05 (m, 1H)	H-18	4.55 (br s, 3H)
H-9	2.23 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H)	H-14	5.53 (dd, *J* = 14, 7.0 Hz, 1H)	H-19	3.90 (s, 3H)
H-10	1.46-1.54 (m, 2H)	H-15	5.59 (dd, *J* = 14, 7.0 Hz, 1H)		

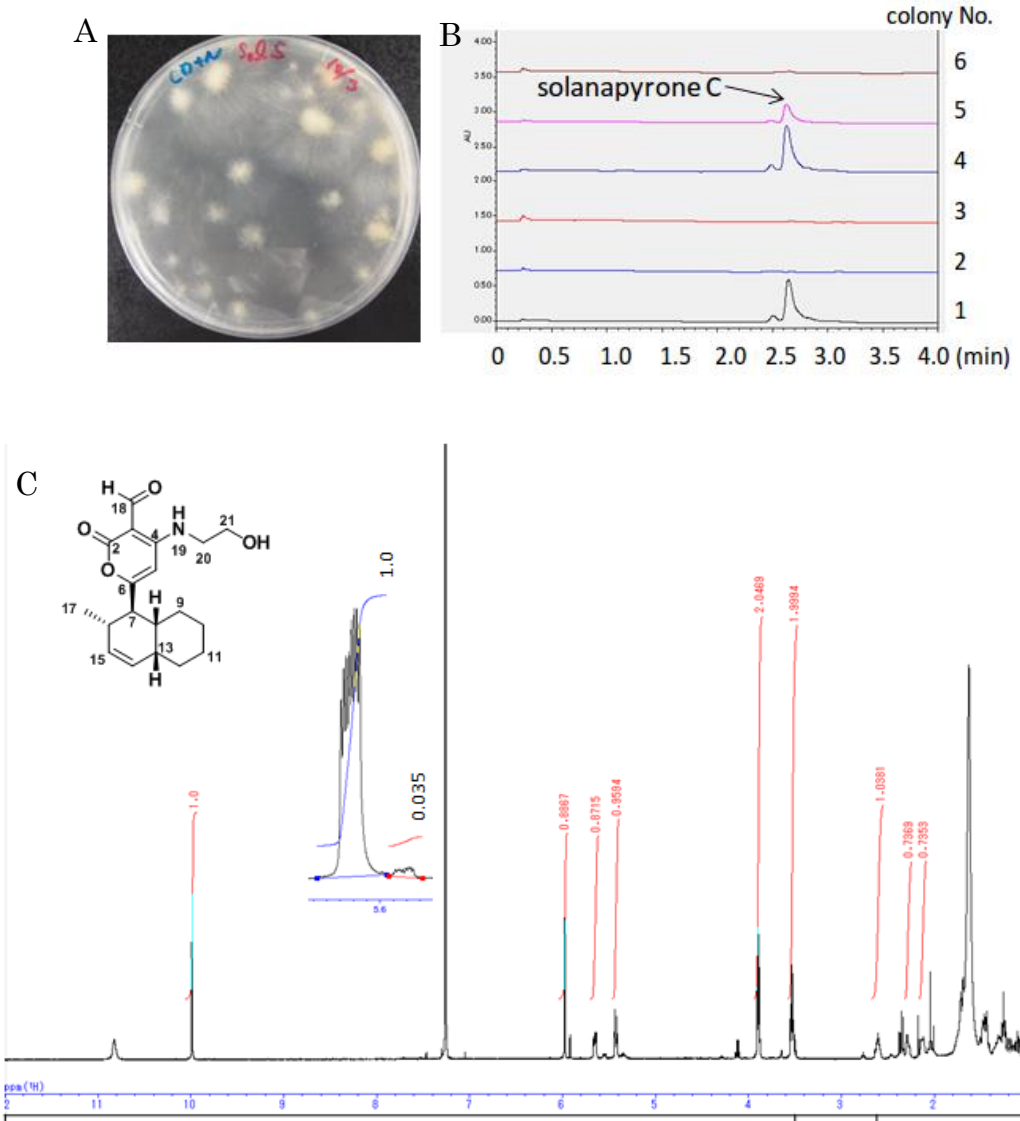
図 2-19.　A: *sol1*+*sol2*+*sol6*形質転換体の代謝産物の HPLC チャート(320 nm)。
B：prosolanapyrone II (**10**)の ^{1}H NMR スペクトル

sol1+*sol2*+*sol6* 三重形質転換体の HPLC チャートでは、様々な中間体が得られていた。コロニー4 番は、desmethylprosolanapyrone I (**7**)のみを生成していたことから、バックグラウンドとして生えてきた、遺伝子の導入されなかったコロニーであったか、導入されたにも関わらず、遺伝子がうまく機能しなかったとみられる。1 番と 5 番は、**8** を生成していたため、Sol2 は機能したが、Sol6 が働かなかったと思われる。反対に、2 番は、Sol6 のみが機能したと考えられる。このように導入した遺伝子が働かない理由として、次のことが考えられる；1) 染色体上の転写されにくい位置に遺伝子が導入された；2) タンパク質をコードする領域でプラスミドが切れ、組換えが起こった。これらの原因を明らかにするには、染色体上のどの位置に遺伝子が挿入されたかを確認する必要がある。

この形質転換体 3 番は、目的の生合成中間体である **10** を生成していた。この株では、導入した二つの酵素が正しく機能したものと考えられる。さらに、**8** から生成するジオール(**9**)が検出されなくなったことから、宿主由来の酸化反応よりも、Sol6 の反応が効率よく進行したと推定された。これは、宿主の酸化酵素が幅広い基質認識をもつため、**8** への親和性が Sol6 よりも低いためとも考えられる。従って、宿主由来の酵素による副反応は、下流の酵素を導入することで抑制できることが示唆された。

sol1+*sol2*+*sol6*+*sol5* 四重形質転換体

sol5/pAdeA を用いて、上記の 3 番の形質転換体を形質転換した(図 2-20-A)。この形質転換株は 1 枚のプレート当り 20 コロニーほど生えてきた。そのうち、6 コロニーを MPY 培地で 1 週間、30 ℃で振盪培養した。これらの代謝産物を HPLC で解析した結果、6 個中、3 個のコロニーで新たな化合物を検出した(図 2-20-B)。これを HPLC で精製した後、MS 解析を行った結果、分子量 331 (*m/z* 332 $[M+H]^+$)の化合物を検出した。さらに ^{1}H NMR で構造の解析を行うと、9.99 ppm にアルデヒドのシグナルを検出した。高磁場側は、H-H COSY 等で解析した結果、デカリン骨格を有していると判明したことから、Sol5 は正しく機能し、アルコールからアルデヒドへの酸化および、Diels-Alder 反応を触媒したと考えられる。しかし、OMe のシグナルが消失し、10.8 ppm, 3.89 ppm, 3.53 ppm に新たなシグナルが観測された(図 2-20-C)。各種スペクトルデータが文献値と一致したため、得られた化合物は solanapyrone A ではなく、solanapyrone C (**12**)であると判明した。最も生産量の高かった形質転換体を米培地で培養した結果、**12** を 1 kg 当たり 47.3 mg の収量で得た。



^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm				H-16	2.60 (m, 1H)
H-5	5.98 (s, 1H)	H-11	1.70 (m, 2H)	H-17	0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)
H-7	2.35 (dd, *J* = 12, 10 Hz, 1H)	H-12	1.07-1.13 (m, 2H)	H-18	9.99 (s, 1H)
H-8	2.29 (m, 1H)	H-13	2.13 (m, 1H)	H-19	10.8 (brs, 1H)
H-9	1.46 (m, 2H)	H-14	5.43 (dt, *J* = 9.8, 1.5 Hz, 1H)	H-20	3.53 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H)
H-10	1.15-1.22 (m, 2H)	H-15	5.65 (ddd, *J* = 9.8, 5.0, 2.6 Hz, 1H)	H-21	3.89 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H)

図 2-20.　A: *sol1*+*sol2*+*sol6*+*sol5* 四重形質転換体の回復培養後の様子。
B: *sol1*+*sol2*+*sol6*+*sol5* 形質転換体の代謝産物の HPLC チャート(320 nm)。
C: solanapyrone C の NMR スペクトル。拡大図は H-15 のプロトンシグナル。

Sol5 の機能は既に解明されており、**10** の水酸基をアルデヒドに酸化し、Diels-Alder 反応によりデカリン骨格を合成する [6]。この Diels-Alder 反応は、酵素がなくても進行し、水中で 3 時間後には、endo 型と exo 型の比が 23:1 にな

る。しかし、Sol5 存在下では、endo：exo = 1:5 の比で環化生成物が得られる。今回の研究では、endo 体は単離していないが、**12** の NMR スペクトルで、5.55 ppm に観測されたシグナルは、endo 体に由来するシグナルである[14]。従って、本研究においても、少なくとも endo：exo =1:28 の比で endo 体が生成していることが確認された。

solanapyrone C は、solanapyrone A に対して非酵素的にエタノールアミンが置換して生じることが知られている[14]。今回の場合も、solanapyrone A が生成した後、宿主内に存在するエタノールアミンが置換したと考えられる(図 2-21)。

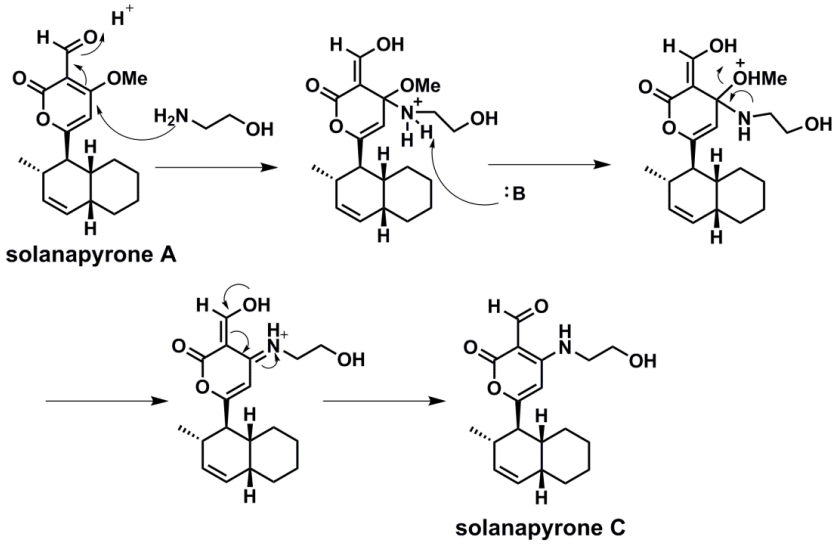


図 2-21.　solanapyrone A から solanapyrone C への変換反応

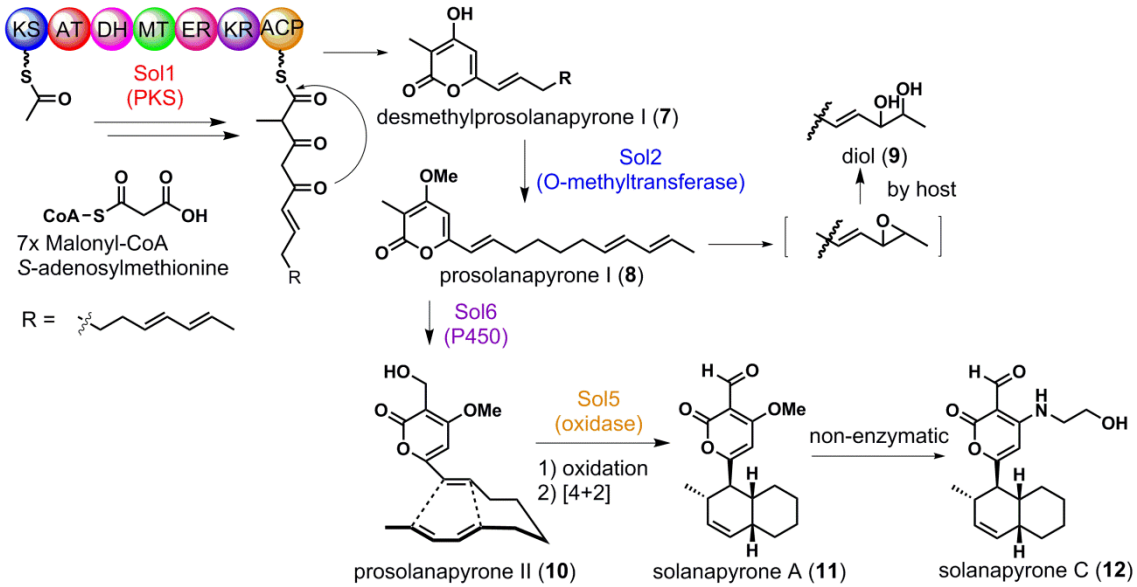


図 2-22.　solanapyrone C 生合成経路

このように、4 種の遺伝子を異種発現し、solanapyrone C の全生合成を達成した(図 2-22)。序章で提示した問題点について、以下のように明らかにすることができた；1) 導入した 4 種の遺伝子は正しく転写、翻訳された；2) 生成物による宿主へのダメージは観測されなかった；3) PKS の翻訳後修飾や P450 の還元を担う補完酵素は正しく働いた；4) 本研究により、*A. oryzae* 異種発現系はテルペンだけではなく、ポリケタイドにも適用可能であるとわかった；5) 同じプロモーターで 4 種の遺伝子を同時発現することは可能であると確認できた；6) 宿主由来の酵素による副反応は観測されたが、下流の酵素を発現することで抑制できることがわかった。

2)に関して、solanapyrone A は DNA ポリメラーゼβの阻害活性が知られているが、aphidicolin のように体外に排出されるという現象は観測されなかった。さらに、細胞内では、エタノールアミンによって solanapyrone C に変換されてしまうため、Sol5 によって生成した直後の、微量存在する程度では、顕著なダメージを与えなかったと考えられる。

6)に関して、今回検出された副反応は、鎖状ポリケタイド末端に存在するオレフィンの酸化および開環反応であった。このような宿主由来の反応は、本来の酵素反応よりも遅いことが確認された。

また、上記以外の問題点として、*sol1* の形質転換では、遺伝子のサイズが大きいことから、成功率が下がると考えられた。これは、*A. oryzae* の染色体上に遺伝子が組み込まれる際、プラスミドの任意の位置で切れて挿入されるため、長い遺伝子では、目的遺伝子の領域で切れる確率が上がるからである[15]。ACS の形質転換体は 8 コロニー中 2 コロニーで生産が確認され、12.5%の形質転換効率だったのに対し、*sol1* 形質転換体は 50%の確率で desmethylprosolanapyrone I (**7**)の生産を確認できたことから、遺伝子の大きさによって形質転換効率は変わらないことが示唆された。但し、当研究室で行われた他の実験では、効率が低下する傾向も見られる。

さらに、新たな知見も得られた。aphidicolin (**1**)や **7** の生合成では、100 mg/kg を越える収量だったことから、テルペンやポリケタイドの基質供給系は、十分に備わっていることが推察された。また、論文やデータベースの遺伝子情報には誤りを含むものも存在するため、様々なツールや実験的な手法を用いて確認する必要があることもわかった。

本研究では実際に既知の遺伝子クラスター2 種を異種発現し天然物の全生合成を行った。この中で、本手法が化合物の生産に問題なく使用できることを見出し、様々な問題点を検討した。また、この過程で、ゲノム情報から遺伝子クラスターを解析するツールの開発や、発現ベクターの拡充、および迅速なプラスミド構築法の開発により、*A. oryzae* 異種発現系の検討を開始した当初よりも

効率的に全生合成研究を行えるようになった。具体的には、プラスミドの構築に 1 週間程度、一つの形質転換体の作製と代謝産物の解析に 2-3 週間程度かかるとすると、遺伝子数に依存するが、4-5 ヶ月で全生合成も可能になる。この期間は、複数遺伝子の同時導入も併用するなどの工夫で、さらに短縮できる。本手法は前述した aphidicolin の例を含め、多くの化合物種に対して使用可能であると推測されるため、生合成研究において非常に強力なツールとなることがわかった。

2-4. cytochalasin E 生合成研究の背景

cytochalasin E は、糸状菌 *Aspergillus clavatus* や *Rosellina necatrix* などから単離された化合物[16]で、穀物に検出されるカビの生産するマイコトキシンとして有名で、哺乳類に対して血管新生の阻害活性を有する。cytochalasin 系天然物には数多くの類縁化合物が知られており、構造的な特徴として、ピロリドン環を含む 5-6-13 または 5-6-11 員環をもつ(図 2-23)[17]。

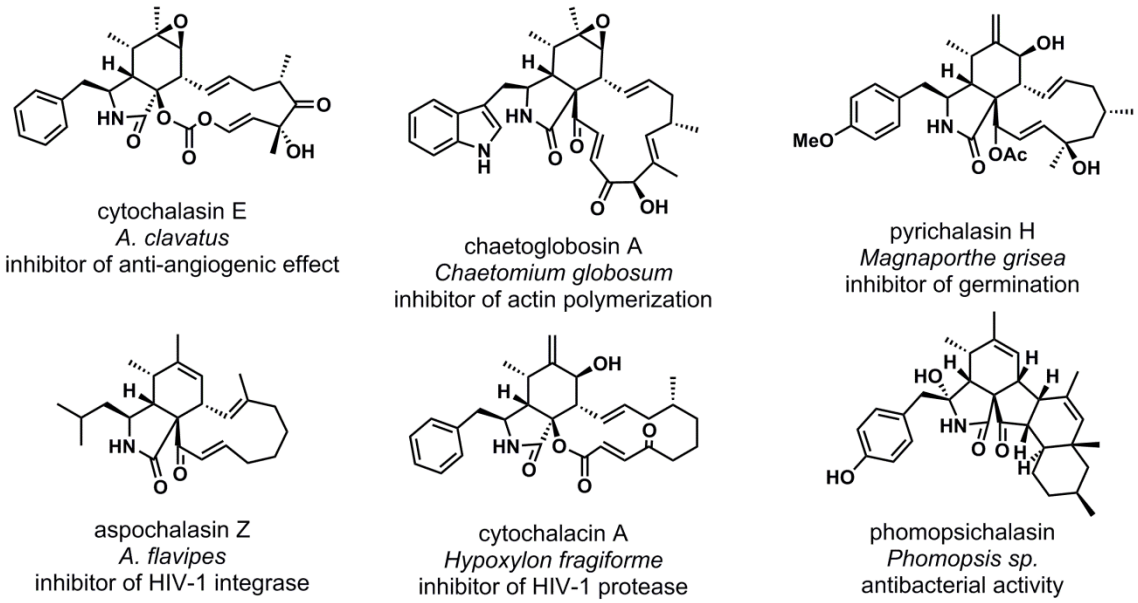


図 2-23. cytochalasin 系天然物の構造と生理活性

構造の類似性から、cytochalasin 系天然物は普遍的な生合成経路で生産されると推測できる。1992 年に Oikawa らは、chaetoglobosin A 生産菌 *Chaetomium subaffine* への P450 の阻害剤投与実験により、最も酸化度の低い生合成中間体を単離した。この中間体を逆生合成解析した結果、Diels-Alder 反応による生成物であると予測された(図 2-24)。同時にこの中間体が PKS-NRPS によって生合成されることも推定した[18]。その後 2007 年に Hertweck らは、*Penicillium expansum* の PKS-NRPS 遺伝子 *cheA* を RNA 干渉で不活性化することに成功

し、この遺伝子が chaetoglobosin A の生合成に関与することを突き止めた[19]。これにより、cytochalasin 系化合物の生合成には、PKS-NRPS と trans-ER および、いくつかの修飾酵素が必要であると推測できるようになった。2011 年、Tang らは、*A. clavatus* の PKS-NRPS 遺伝子 *ccsA* を破壊し、この遺伝子が cytochalasin E の生合成に関与することを突き止めた[20]。そこで本研究ではこの *ccsA* と ER 遺伝子 *ccsC* を異種発現し、cytochalasin 系化合物の生合成機構の解明をすることにした。

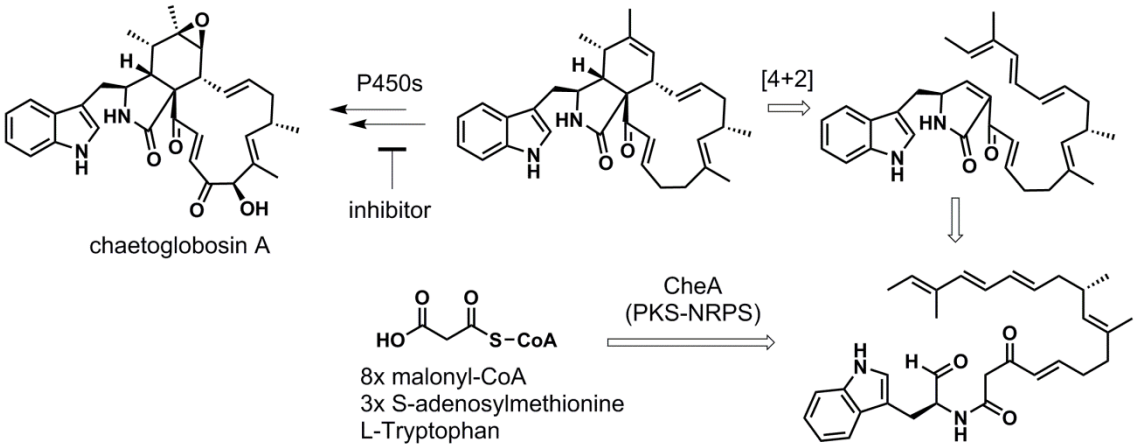


図 2-24.　P450 阻害剤投与実験によって得られた生合成中間体とその逆生合成解析

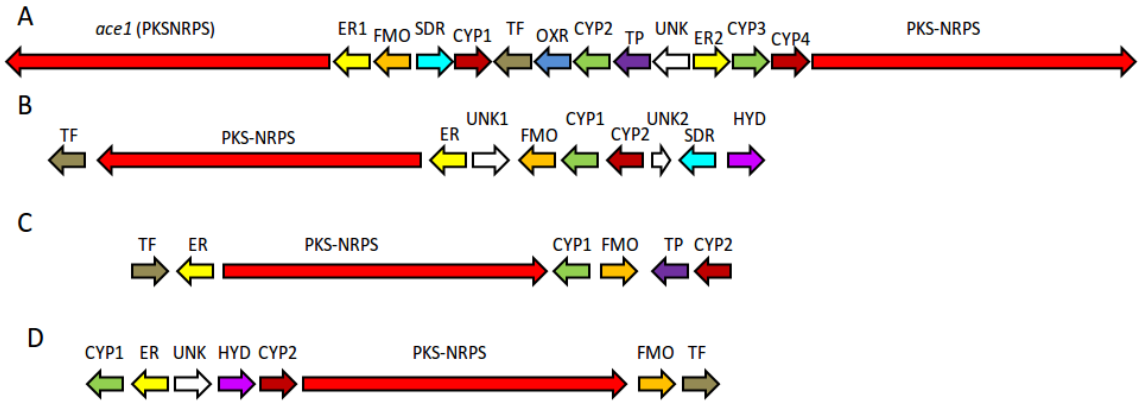


図 2-25.　cytochalasin 系化合物の推定生合成遺伝子クラスターの比較

A: *M. grisea* 由来 *ace1* 遺伝子クラスター。**B**: *C. globosum* 由来 chaetoglobosin A 生合成遺伝子クラスター。**C**: *P. expansum* 由来 chaetoglobosin A 生合成遺伝子クラスター。**D**: *A. clavatus* 由来 cytochalasin E 生合成遺伝子クラスター。

SDR: short chain dehydrogenase/reductase, CYP: cytochrome P450, TF: transcriptional factor, OXR: oxidoreductase, TP: transporter, UNK: unknown, HYD: α/β hydrolase

cytochalasin 系化合物の特徴的な骨格の形成機構には、Diels-Alder 反応が関与していると予測されたが、これに関して 2 つの疑問点があった。すなわち；1) ジエノフィル部分であるピロリノンの生合成機構；2) Diels-Alder 反応を触媒する酵素の正体、である。

1)に関して、経路 A では、チオエステルが還元されてアルデヒドとして切り出された後、Knoevenagel 反応によってピロリノン環を持つ中間体に変換される。経路 B では、Dieckmann 環化によって酵素から切り出された後、テトラミン酸部位が還元、脱水を経てピロリノン環に至る(図 2-26)。これら 2 つの経路を区別するには、アシル中間体を切り出す R ドメインの機能解析が重要となる。R ドメインは通常、還元的にアシル鎖を切り出す機能のほか、Dieckmann 環化を触媒(DKC ドメイン)する機能も知られている。これらの違いは、このドメインに含まれる short chain dehydrogenase/reductase (SDR)モチーフに特徴的な Ser-Tyr-Lys の Tyr が Phe などに置換されている点である。しかし、例外的に *Fusarium heterosporum* の生産する fusaridione A の PKS-NRPS は、Dieckmann 環化を触媒するにも関わらず、Tyr 残基が残ったままという例も知られるため、実験によって証明する必要があった(図 2-27)。

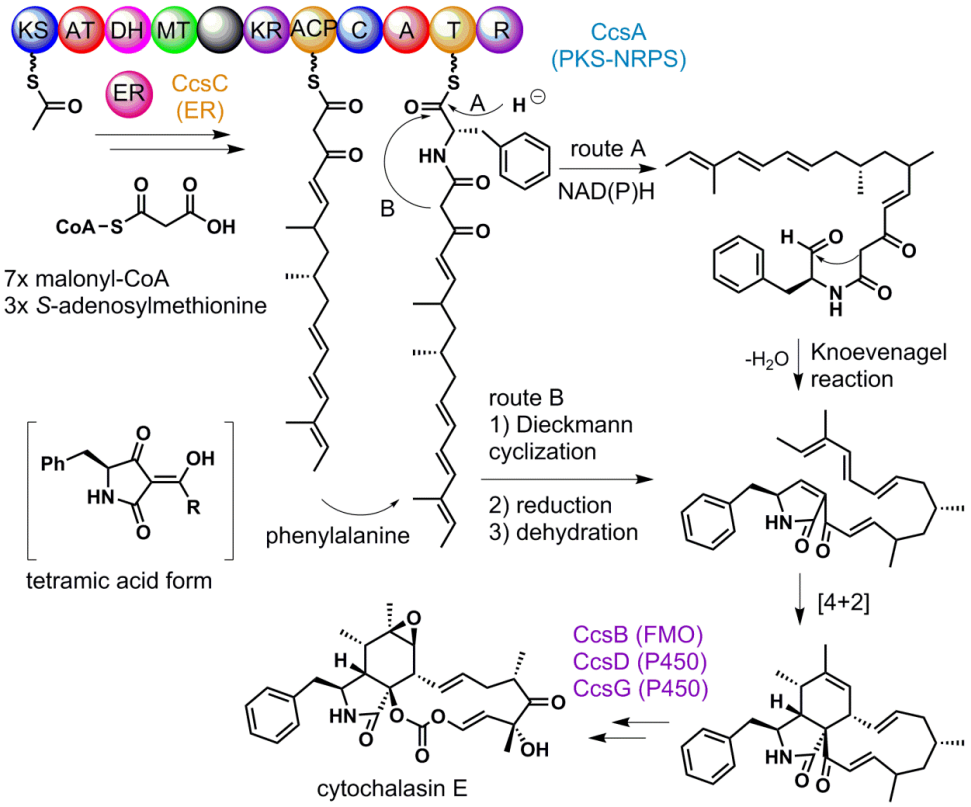


図 2-26.　cytochalasin E の推定生合成経路

図 2-27.　DKC ドメインと R ドメインのアミノ酸配列の比較

2)に関しては、6-11 員環を構築する Diels-Alder 反応はどの酵素が触媒するかという点である。これまでに知られている Diels-Alder 酵素は大きく 2 つの種類に分けられる。すなわち、特定の酵素が反応性の高い基質を供給するとともに、同一活性部位で環化するものと、特定の酵素が Diels-Alder 反応のみを触媒するものである。前者には solanapyrone の Sol5、lovastatin の LovB、macrophomate synthase[21]、riboflavin synthase[22]などが挙げられる。一方、後者には、spinosyn A の SpnF が挙げられる[23]。しかし、これらに共通する特徴的な配列はなく、相同性から Diels-Alder 酵素を特定することは困難である。そこで本研究では、cytochalasin 系化合物の推定遺伝子クラスターに高く保存される、機能不明のタンパク質 CcsE (α/β hydrolase)および CcsF (unknown)に着目した。CcsE は、Tang らによって cytochalasin E を cytochalasin K に変換する酵素であると予測されていた。一方、*ccsF* と相同性の高い遺伝子は、chaetoglobosin A 生合成遺伝子クラスター(CHGG_01241)や equisetin 生合成遺伝子クラスター(*eqx3*)など、Diels-Alder 反応が生合成に関与する天然物の遺伝子クラスターによく保存されている。従って、CcsF を Diels-Alder 酵素の第一候補として、異種発現を検討した。

2-5.　実験結果と考察

ccsA と *ccsC* は *A. clavatus* NRRL1 のゲノム DNA を鋳型にクローニングした。ベクターへの組み込みには全て In-Fusion 法を使用している。*ccsA* は 12 kb と長いため、3 断片に分けて PCR を行い、一断片ずつ順次 pTAex3 に導入した。*ccsC* は pUSA の *Kpn*I サイトへ組み込んだ。*ccsF* は、合成 DNA を原料にクローニングした。導入する pAdeA にはプロモーターとターミネーター領域がないため、pTAex3 を鋳型にこれらを別々に増幅した。その後、合成 DNA のプラスミドから *Eco*RI で切り出した *ccsF* と Fusion PCR で連結し、pAdeA の *Pst*I サイトに導入した。各遺伝子の挿入は PCR にて確認し、エラーがないことはシーケンス解析で確認した。

*ccsC*形質転換体

PKS-NRPS の補助酵素として働く CcsC は、特定の生成物を与えないため、転写量の多いものを選抜した。得られた形質転換体は、12 コロニーあり、そのうち 6 コロニーを MPY 培地で培養した。これらの菌体から、total RNA の抽出を行った。この際、全てのサンプルで 18S rRNA と 28S rRNA のバンドを確認できた(図 2-28)。また、それらの濃度と純度を以下の表に示す。

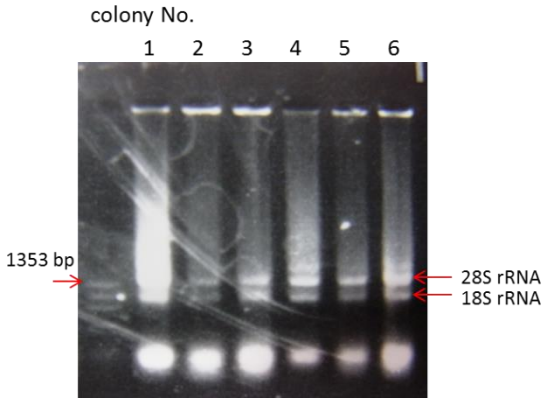


図 2-28.　抽出後の total RNA

表 2-1.　total RNA の濃度と純度

	濃度(mg/mL)	純度(A260/A280)
1	2.54	1.89
2	1.13	1.82
3	1.48	1.86
4	1.29	1.84
5	1.17	1.80
6	1.86	1.90

濃度は 260 nm の吸光度より表 2-1 のように算出した。これらのサンプルを cDNA に逆転写した。cDNA を用いて遺伝子の発現量を比較する際、恒常的に発現している遺伝子として histone H4 の発現量をコントロールとして各サンプルの *ccsC* の発現量を比較したところ、1 番の形質転換体で最も高く発現していることがわかった(図 2-29)。

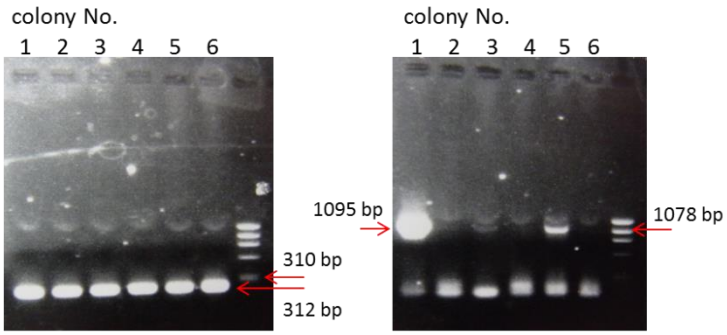


図 2-29.　発現量の比較

左：histone H4 のエキソン配列(312 bp)。右：*ccsC* のエキソン配列(1095 bp)

ccsA+ccsC 二重形質転換体

上記の 1 番の形質転換体の胞子を用い、*ccsA* を導入した。取得した形質転換体は、プレート 1 枚当たり 12 コロニーで、このうち 6 コロニーを選択し、*ccsC* と同様に発現量を比較した(図 2-30)。ここで最も発現量の高い形質転換体を米培地で培養し、代謝産物を HPLC で解析した。すると、遺伝子を導入していない野生株(Wild Type, WT)にはないピークが検出された。それらを HPLC で精製し、各種 NMR および MS 解析にて構造を決定した(図 2-31)。

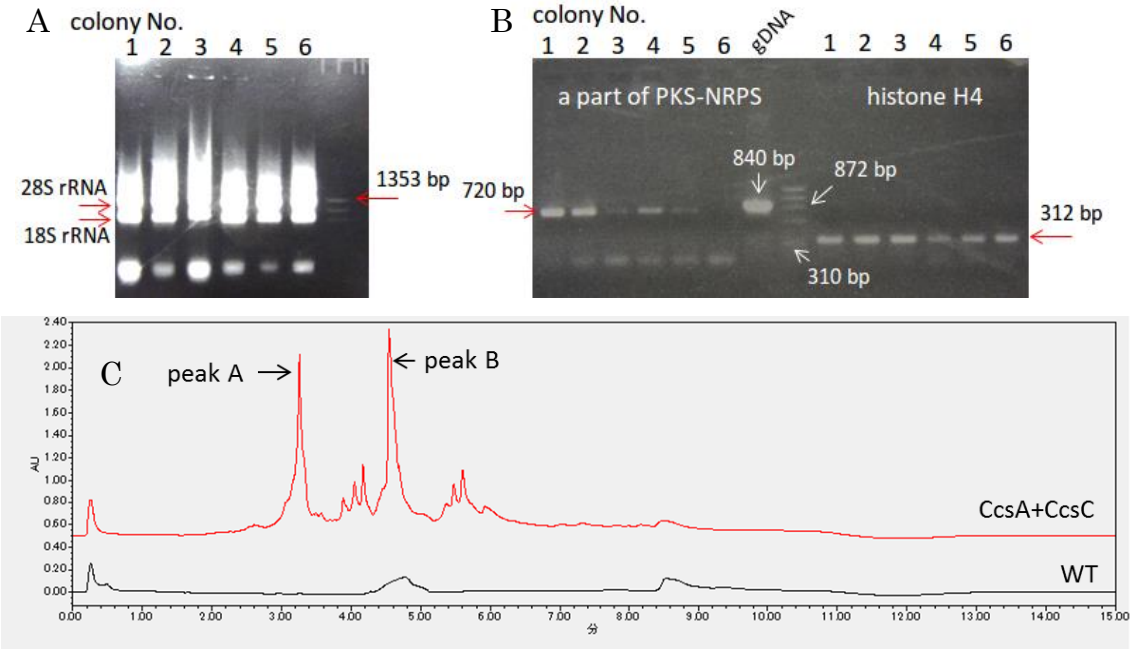
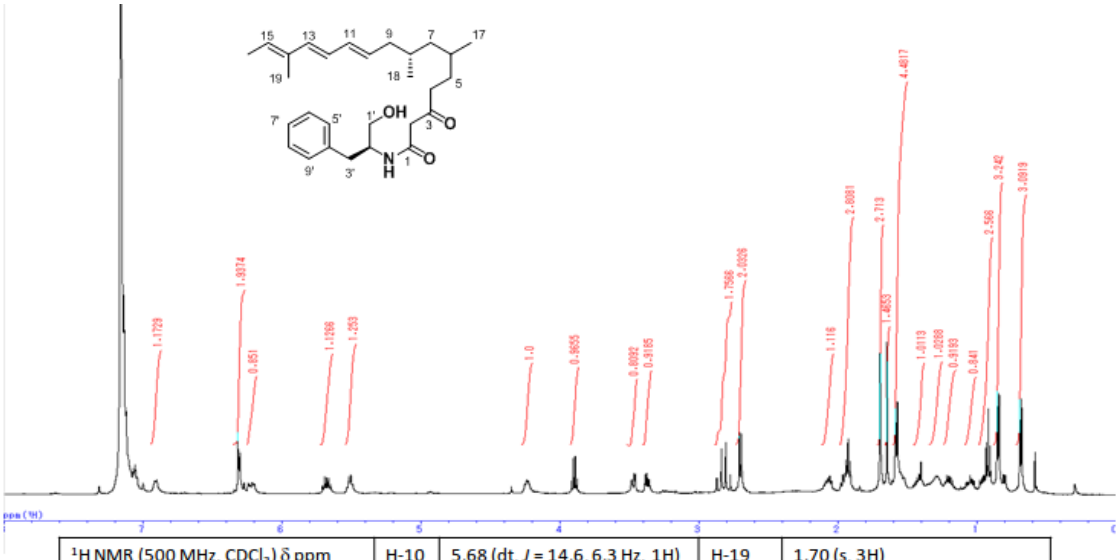


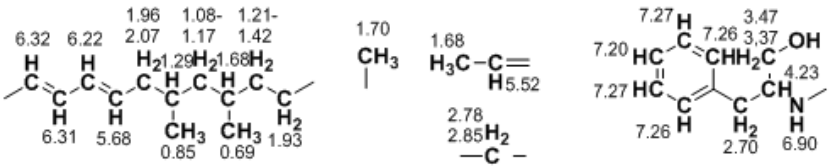
図 2-30.　A: 抽出後の total RNA。B: cDNA を鋳型にして PCR した結果;左側: PKS-NRPS の転写確認。右側：histone H4 の転写確認。C: 二重形質転換体の代謝産物の HPLC チャート(270 nm)



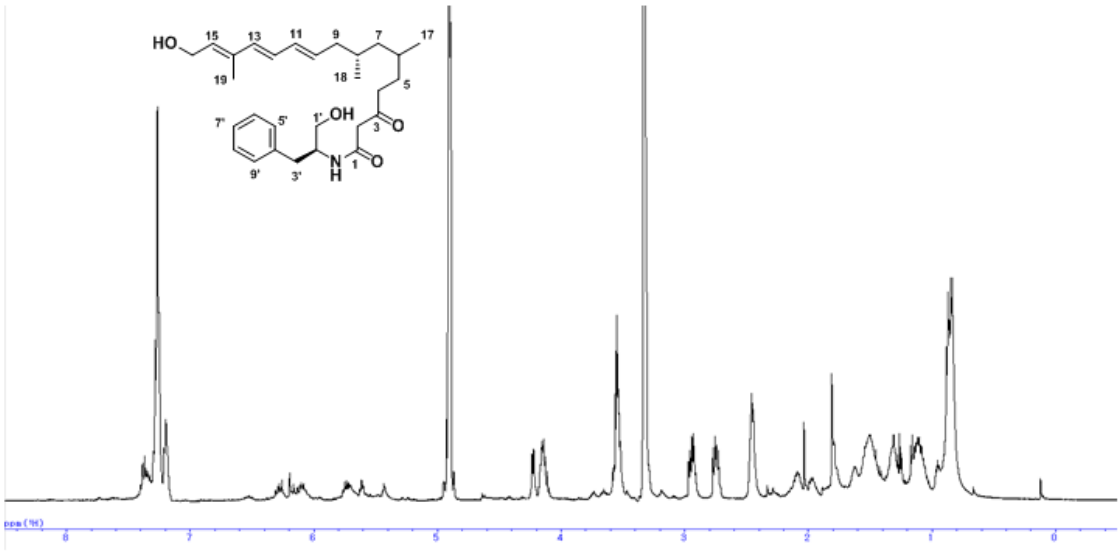
^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm		H-10	5.68 (dt, *J* = 14.6, 6.3 Hz, 1H)	H-19	1.70 (s, 3H)
H-2	2.78 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H) 2.85 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H)	H-11	6.22 (dd, *J* = 14.6, 7.0 Hz, 1H)	H-1′	3.47 (dd, *J* = 10.9, 3.8 Hz, 1H) 3.37 (dd, *J* = 10.9, 5.3 Hz, 1H)
H-4	1.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H)	H-12	6.31 (m, 1H)	H-2′	4.23 (m, 1H)
H-5	1.21-1.42 (m, 2H)	H-13	6.32 (m, 1H)	H-3′	2.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H)
H-6	1.68 (m, 1H)	H-15	5.52 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H)	H-5′,9′	7.26 (m, 2H)
H-7	1.08-1.17 (m, 2H)	H-16	1.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H)	H-6′,8′	7.27 (m, 2H)
H-8	1.29 (m, 1H)	H-17	0.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H)	H-7′	7.20 (m, 1H)
H-9	1.96 (dd, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H) 2.07 (dd, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H)	H-18	0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H)	NH	6.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H)

図 2-31.　新規代謝産物 (**13**)の ^{1}H NMR スペクトル

peak B の化合物は HR-MS 解析の結果、*m/z* 440.3147 であり、分子式は $C_{28}H_{42}NO_3$ $[M+H]^+$ (m/z 440.3165)と予測された。次に、^{1}H NMR から、以下のことがわかった；1) 7.20-7.27 ppm に 5H 分の芳香環に連結したプロトンを有している；2) 5.52-6.31 ppm に 5 つのビニルプロトンがある；3) アルデヒドに相当するシグナルはない。さらに H-H COSY から、次の部分構造が推定された。



次に、^{13}C NMR スペクトルから、207.5 ppm と 167.2 ppm に 2 つのカルボニル炭素の存在が支持され、HMBC 相関によって、予想されたアルデヒドの還元体 **13** の構造が導き出された。



^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm		H-10	5.74 (dd, *J* = 15.5, 6.3 Hz, 1H)	H-1′	3.55 (m, 2H)
H-2	3.32 (m, 2H)	H-11	6.10 (dd, *J* = 15.5, 9.6 Hz, 1H)	H-2′	4.16 (m, 1H)
H-4	2.45 (m, 2H)	H-12	6.28 (dd, *J* = 15.5, 9.6 Hz, 1H)	H-3′	2.75 (dd, *J* = 14.0, 8.4 Hz, 1H) 2.95 (dd, *J* = 14.0, 6.5 Hz, 1H)
H-5	1.31 (m, 1H), 1.50 (m, 1H)	H-13	6.18 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H)		
H-6	1.62 (m, 1H)	H-15	5.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H)	H-5′,9′	7.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H)
H-7	1.11 (m, 2H)	H-16	4.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H)	H-6′, 8′	7.28 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H)
H-8	1.47 (m, 1H)	H-17	0.84 (m, 3H)	H-7′	7.37 (m, 2H)
H-9	1.96 (dd, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H) 2.08 (dd, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H)	H-18	0.86 (m, 3H)	NH	7.12 (m, 1H)
		H-19	1.81 (s, 3H)		

図 2-32.　新規代謝産物 (**14**)の ^{1}H NMR スペクトル

HPLC で顕著なピークとして検出された A の化合物は、HR-MS より、*m/z* 456.3161 であり、分子式は $C_{28}H_{42}NO_4$ $[M+H]^+$ (m/z 456.3114)と決定された。^{1}H NMR から、**13** の C16 位のメチル基のシグナルが消失し、新たに 4.23 ppm に水酸化されたメチレンに相当するシグナルが現れた。従って、この化合物は、ポリケタイド鎖の末端が水酸化されたアリルアルコール **14** であると推定され、各種二次元 NMR データより、その構造を決めた。

主要化合物二種の収量は米 1 kg 当たり、**13** が 50 mg で、**14** が 18 mg であった。さらにこのほか、フェニルアラニンの部分がチロシンに置き換わった化合物も微量成分として得られた(4 章参照)。

cytochalasin 系化合物の生合成における最初の反応は、ピロリノン環形成の際、酵素からの切り出しが還元的に進行するか、Dieckmann 環化によって進行するかという点が問題となる。本研究では PKS-NRPS と trans-ER を異種発現し、鎖状の化合物を得た。Dieckmann 環化で一度テトラミン酸構造を形成した場合、鎖状の **13** を与える機構は考え難いため、酵素からの切り出しが還元的に進行し、アルデヒドがさらに還元されたと考えるほうが妥当である。過去に

lyngbyatoxin A の生合成に関与する NRPS の R ドメインがチオエステルから 1 級アルコールを生成する例は知られるが[24] (図 2-33)、これは本来触媒すべき反応であるため、今回の事例と異なる。CcsA の R ドメインがアルコール体まで還元すると仮定すれば、Knoevenagel 反応の前に別の酵素による酸化を受ける必要がある。cytochalasin 系天然物の生合成遺伝子クラスターには、相当する酸化酵素が見当たらない。従って、R ドメインはアルデヒドを生成するのが本来の反応で、過剰還元は宿主由来の酵素が触媒していると考えられる。

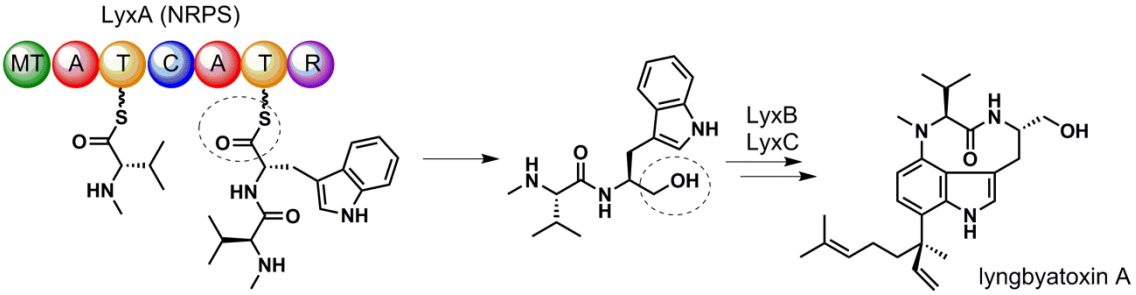


図 2-33.　lyngbyatoxin A の生合成に関与する R ドメインの機能

13 はさらに予想中間体のα,β-不飽和結合も還元されている。cytochalasin E の構造から、α,β-不飽和結合が一度還元された後に酸化される経路は合理的ではない。従って、この過剰還元も、宿主の持つ酵素が触媒している可能性がある。実際に、CcsC のアミノ酸配列をクエリに、*A. oryzae* の染色体にある ER を検索したところ、17 個のタンパク質が候補に挙がった。これらは今後発現解析を行うなどして絞り込む必要がある。

二重形質転換体の主要代謝産物のひとつに、**13** のポリケタイド鎖の末端が水酸化された **14** も得られた。この原因は、前述したように、宿主の持つ酸化酵素が働いていると考えられる。今回観測された酸化反応は、共役したトリエンの末端アリル位に対して起こったが、以前に観測された共役オレフィンの酸化では、エポキシ化を経由するジオール化が観測された。従って、今回の酸化は別の酵素によって進行したと考えられる。

このように、鎖状中間体が酵素から切り出されたことは、ピロリノン環の形成に至る Knoevenagel 反応は、PKS-NRPS ではなく、別の酵素が触媒する可能性を支持する結果となった。本研究では、他の遺伝子クラスターにも高く保存されている、機能未知な CcsF が Knoevenagel 反応と続く Diels-Alder 反応を触媒する新しい酵素であると考え、三重形質転換体を調製した。

ccsA+ccsC+ccsF 三重形質転換体

上記の *ccsA*+*ccsC* 二重形質転換体に対し、*ccsF* を導入した。得られたコロニーは 1 プレート当り 50 コロニー以上で、そのうち 5 個の形質転換体について cDNA を調製し、*ccsF* の転写を確認した(図 2-34-A)。その結果、4 つの形質転換体で *ccsF* の転写を確認できたため、これらを MPY 培地で培養し、代謝産物を HPLC で解析した(図 2-34-B)。

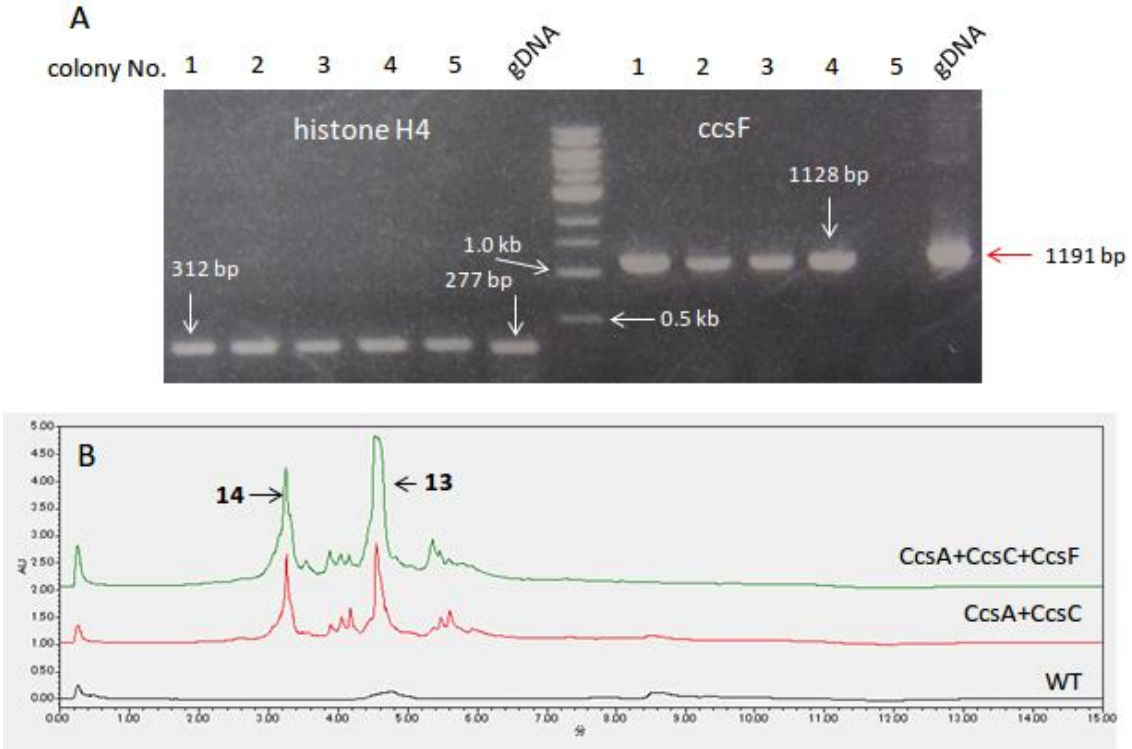


図 2-34.　*ccsF* の転写確認と、三重形質転換体代謝産物の HPLC チャート

HPLC による解析の結果、新たな代謝産物は検出されなかった。従って、*ccsF* 導入株において、Diels-Alder 反応は進行しなかったとみられる。この原因として、以下のことが推測できる；1) 鎖状中間体が CcsF の基質にならなかった；2) CcsF の ORF 領域が間違っている。

1)に関しては、Knoevenagel 反応は別の酵素が触媒し、CcsF が Diels-Alder 反応に関わっている可能性がある。即ち、CcsA から切り出されたばかりのアルデヒドは別の酵素の基質となる。2013 年、Humpf らは、*Fusarium fujikuroi* の fusarin C 生合成遺伝子の破壊実験を行った。その結果、PKS-NRPS の生成物であるアルデヒドが過剰還元を受け、1 級アルコールが生成したこと、および α/β hydrolase が Knoevenagel 反応を触媒する可能性があることを報告した（図 2-35)[25]。これを cytochalasin E の遺伝子クラスターに適用すると、*ccsE* がα/β hydrolase に相当する。CcsE は、cytochalasin E のエポキシドを開環し、

cytochalasin K を生成すると予測されているが、この知見から考察すると、Knoevenagel 反応を触媒する可能性がある。

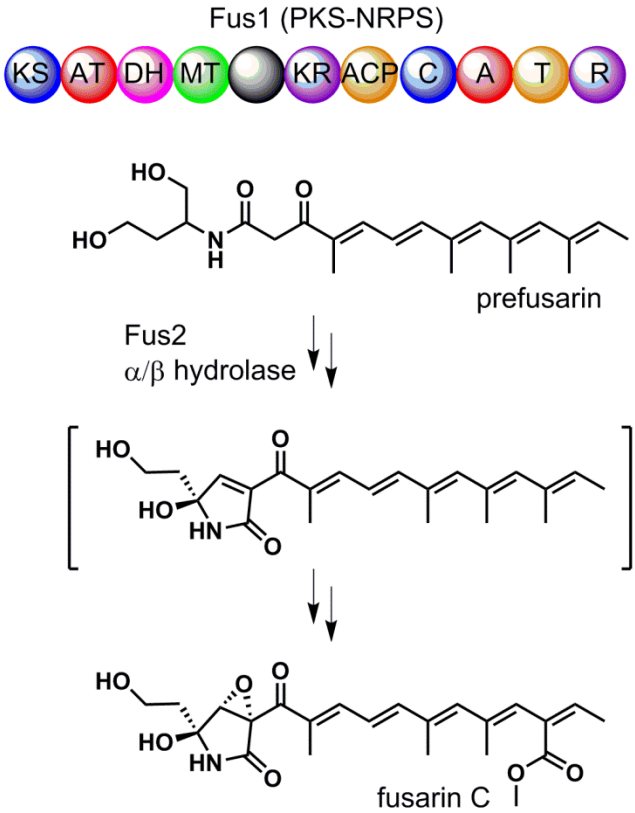


図 2-35.　fusarin C の推定生合成経路

2 つ目の可能性として *ccsF* の ORF 領域が異なっていることが考えられる。本研究では、NCBI に登録されている塩基配列を頼りに合成 DNA を注文したが、Sol6 のクローニング時に効果を発揮した 2ndFind による解析では異なる結果が得られた。すなわち、*ccsF* の 5'末端が 100 bp ほど長い配列がいくつかの条件で検出される。但し、これを確認するには、cDNA を調製し、RACE(rapid amplification of cDNA ends)法を行い、開始コドンと終止コドンを確認する必要がある。

以上のように、cytochalasin 系化合物の生合成における鍵反応は Diels-Alder 反応であり、PKS-NRPS と trans-ER を異種発現し、鎖状中間体を捕捉することで、ジエノフィル部分の生合成に知見を与えた。この鎖状化合物 **13** は、本来の基質であるアルデヒドに誘導可能であるため、今後 *in vitro* の解析を行うことで、Diels-Alder 反応を触媒する酵素の同定につながる可能性がある。本研究までに得られた知見を元に cytochalasin E の生合成経路を推定すると以下のようになる(図 2-36)。

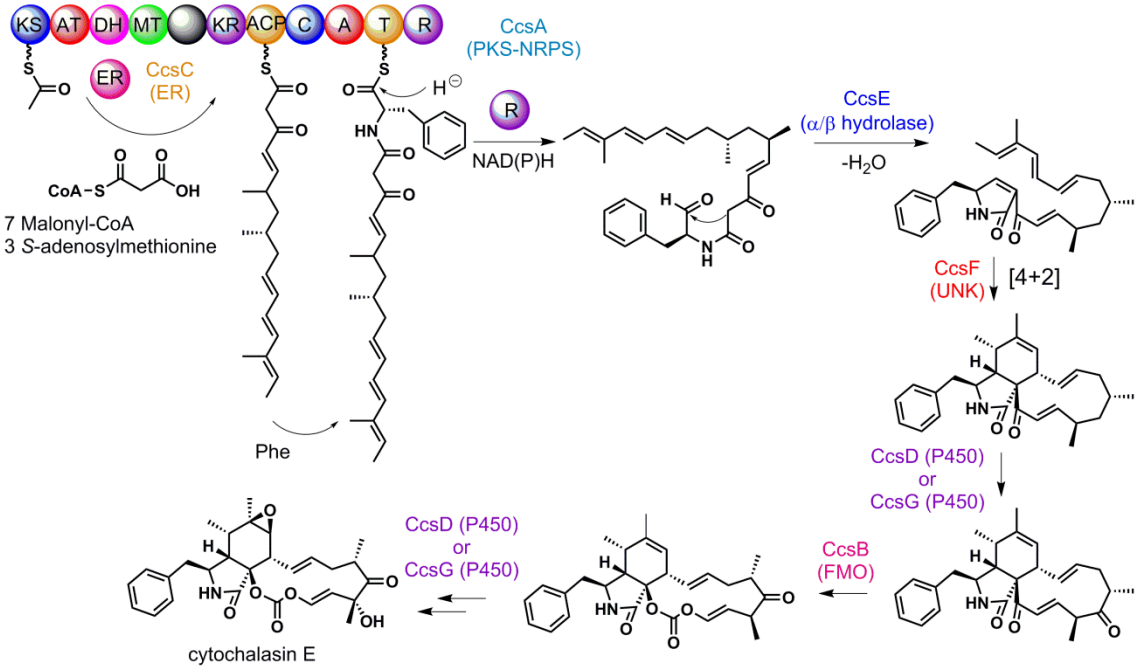


図 2-36.　cytochalasin E の推定生合成経路

参考文献

[1] Fujii, I., *Nat. Prod. Rep.* **2009,** *26* (2), 155-169.
[2] Hopwood, D. A., *Chem. Rev.* **1997,** *97* (7), 2465-2497.
[3] Cox, R. J., *Org. Biomol. Chem*. **2007**, *5*, 2010-2026.
[4] Kroken, S.; Glass, N. L.; Taylor, J. W.; Yoder, O. C.; Turgeon, B. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003,** *100* (26), 15670-15675.
[5] a) Mizushina, Y.; Kamisuki, S.; Kasai, N.; Shimazaki, N.; Takemura, M.; Asahara, H.; Linn, S.; Yoshida, S.; Matsukage, A.; Koiwai, O.; Sugawara, F.; Yoshida, H.; Sakaguchi, K., *J. Biol. Chem.* **2002,** *277* (1), 630-638.; b) Hohl, B.; Weidemann, C.; Hohl, U.; Barz, W., *J. Phytopathology* **1991,** *132* (3), 193-206.
[6] Oikawa, H.; Kobayashi, T.; Katayama, K.; Suzuki, Y.; Ichihara, A., *J. Org. Chem.* **1998,** *63* (24), 8748-8756.
[7] Oikawa, H.; Suzuki, Y.; Katayama, K.; Naya, A.; Sakano, C.; Ichihara, A., *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **1999,** (9), 1225-1232.
[8] Kasahara, K.; Miyamoto, T.; Fujimoto, T.; Oguri, H.; Tokiwano, T.; Oikawa, H.; Ebizuka, Y.; Fujii, I., *Chembiochem* **2010,** *11* (9), 1245-1252.
[9] Heneghan, M. N.; Yakasai, A. A.; Williams, K.; Kadir, K. A.; Wasil, Z.; Bakeer, W.; Fisch, K. M.; Bailey, A. M.; Simpson, T. J.; Cox, R. J.; Lazarus, C. M., *Chem. Sci.* **2011,** *2* (5), 972-979.
[10] Bakeer, W., Doctoral Dissertation, University of Bristol, Bristol, **2011**.
[11] a) Tagami, K.; Liu, C.; Minami, A.; Noike, M.; Isaka, T.; Fueki, S.; Shichijo, Y.; Toshima, H.; Gomi, K.; Dairi, T.; Oikawa, H., *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260-1263.; b) Itoh, T.; Tokunaga, K.; Matsuda, Y.; Fujii, I.; Abe, I.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T., *Nat. Chem*. **2010**, *2*, 858-864.
[12] Ichinose, H., *Biol. Pharm. Bull.* **2012,** *35* (6), 833-837.
[13] Kasahara, K.; Fujii, I.; Oikawa, H.; Ebizuka, Y., *Chembiochem* **2006,** *7* (6), 920-924.
[14] Oikawa, H.; Yokota, T.; Sakano, C.; Suzuki, Y.; Naya, A.; Ichihara, A., *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **1998**, *62* (10), 2016-2022.
[15] Lubertozzi, D.; Keasling, J. D., *Biotech. Adv.* **2009,** *27* (1), 53-75.
[16] a) Demain, A. L.; Hunt, N. A.; Malik, V.; Kobbe, B.; Hawkins, H.; Matsuo, K.; Wogan, G. N., *Appl. Environ. Microbiol.* **1976,** *31* (1), 138-140.; b) Kajimoto, T.; Imamura, Y.; Yamashita, M.; Takahashi, K.; Shibata, M.; Nohara, T., *Chem. Pharm. Bull.* **1989,** *37* (8), 2212-2213.
[17] Scherlach, K.; Boettger, D.; Remme, N.; Hertweck, C., *Nat. Prod. Rep.* **2010,** *27* (6), 869-886.
[18] Oikawa, H.; Murakami, Y.; Ichihara, A., *Tetrahedron Lett.* **1991,** *32* (35), 4533-4536.
[19] Schuemann, J.; Hertweck, C., *Journal of the American Chemical Society* **2007,** *129* (31), 9564-9565.
[20] Qiao, K.; Chooi, Y.-H.; Tang, Y., *Metab. Eng.* **2011,** *13* (6), 723-732.
[21] Watanabe, K.; Mie, T.; Ichihara, A.; Oikawa, H.; Honma, M., *J. Biol. Chem.* **2000,** *275* (49), 38393-38401.
[22] Eberhardt, S.; Zingler, N.; Kemter, K.; Richter, G.; Cushman, M.; Bacher, A., *Eur. J. Biochem.* **2001,** *268* (15), 4315-4323.
[23] Kim, H. J.; Ruszczycky, M. W.; Choi, S.-h.; Liu, Y.-n.; Liu, H.-w., *Nature* **2011,**

473 (7345), 109-112.
[24] Read, J. A.; Walsh, C. T., *J. Am. Chem. Soc.* **2007,** *129* (51), 15762-15763.
[25] Niehaus, E.-M.; Kleigrewe, K.; Wiemann, P.; Studt, L.; Sieber, C. M. K.; Connolly, L. R.; Freitag, M.; Gueldener, U.; Tudzynski, B.; Humpf, H.-U., *Chem. Biol.* **2013,** *20* (8), 1055-1066.

3 章　nonadride 系天然物の生合成機構の解明

3-1.　生合成研究の背景

糸状菌の生産する天然物には、無水マレイン酸構造をもつ化合物が存在している(図 3-1)。例えば、chaetomellic anhydride は、farnesyl protein transferase の強い阻害活性を持ち、制癌剤として機能する。また、glauconic acid などの nonadride 系天然物は、抗真菌活性や抗細菌活性を有しているものが多い[1]。

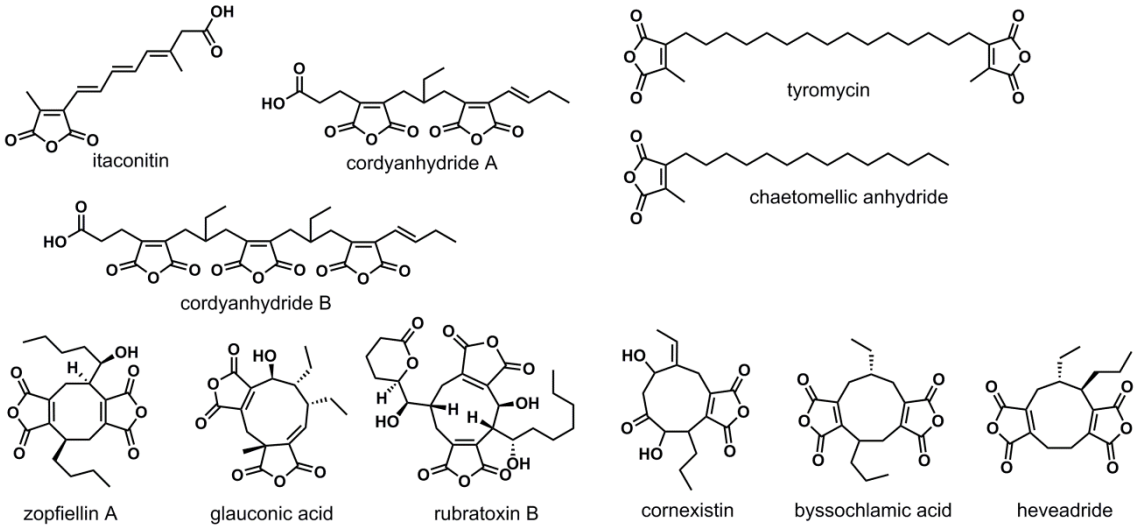


図 3-1.　無水マレイン酸構造をもつ天然物

これらの天然物のうち、cordyanhydride A, B、zopfiellin、nonadride 系天然物は、chaetomellic anhydride に構造が類似した無水マレイン酸構造をもつモノマーの二量化もしくは三量化によって生合成される機構が提唱されている[2]。1965 年、Sutherland らは、glauconic acid の逆生合成解析により、モノマーの構造と生合成経路を予測している(図 3-2)[3]。

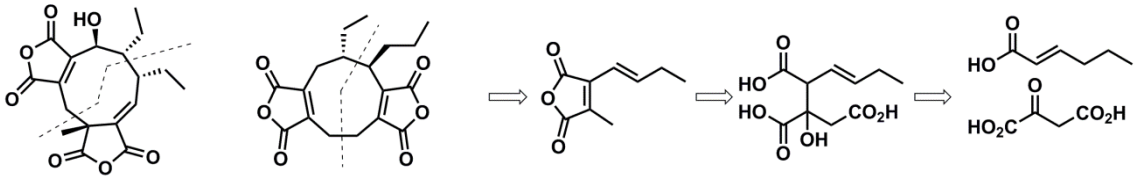


図 3-2.　glauconic acid と heveadride の逆生合成解析

このモノマーは、ポリケタイドもしくは脂肪酸とオキサロ酢酸(OAA)の縮合によって生合成されると予測された。2000 年、Sulikowski らは、安定同位体標識した生合成原料([2,3-$^{13}C_2$]-succinic acid、[1,4-$^{13}C_2$]-succinic acid、[2-^{13}C] acetyl SNAC、[1,2-$^{13}C_2$] acetyl SNAC)を *Phoma* sp.に投与し、標識された phomoidride を単離した[4]。これにより、彼らは、OAA の CoA エステルと遊離したポリケタイドもしくは脂肪酸がアルドール縮合することでモノマーが生合成されると推

定した(図 3-3)。

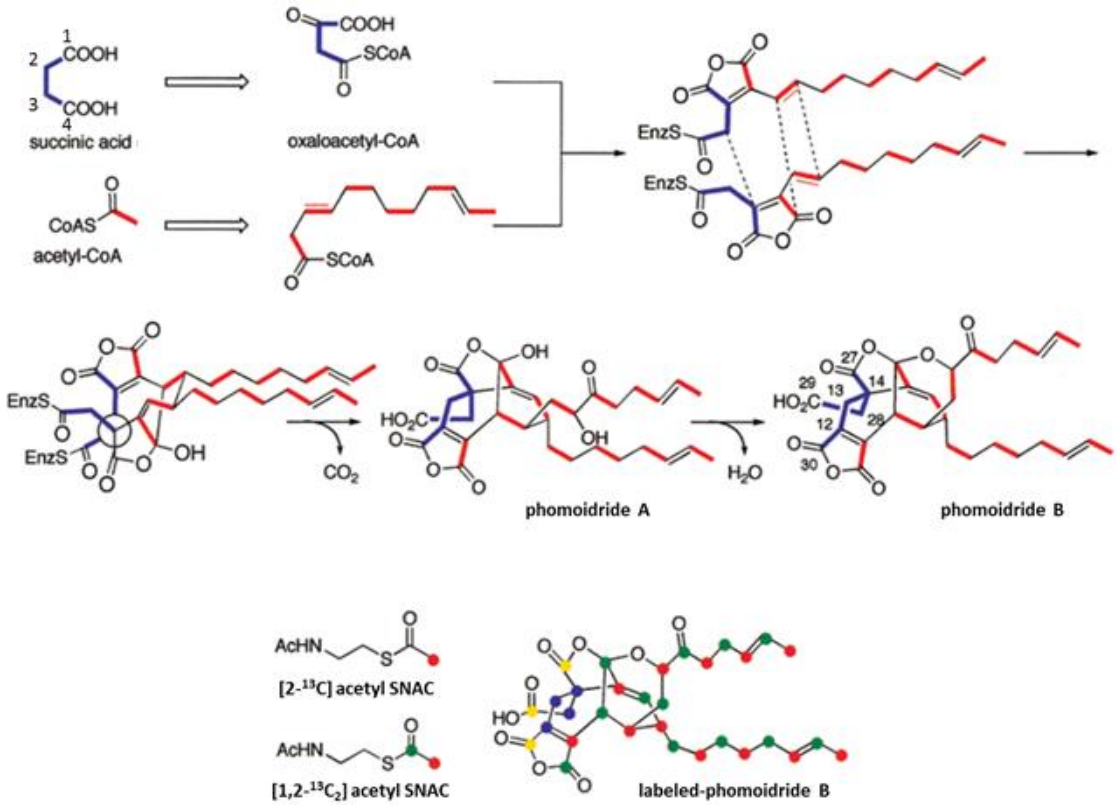


図 3-3.　phomoidride の標識化実験とモノマーの推定生合成経路

ポリケタイドもしくは脂肪酸と OAA がアルドール反応する機構は、クエン酸合成酵素の反応としてよく知られている[5]。クエン酸合成酵素は始めに OAA を受容すると、構造が変化し、アセチル CoA を受容できるようになる。次に、アセチル CoA のα位のプロトンが Asp 残基によって引き抜かれ、エノール中間体が生成する。続いてアルドール反応により、シトロイル CoA が生じる。最後に CoA エステルの加水分解が進行してクエン酸が生合成される(図 3-4)。

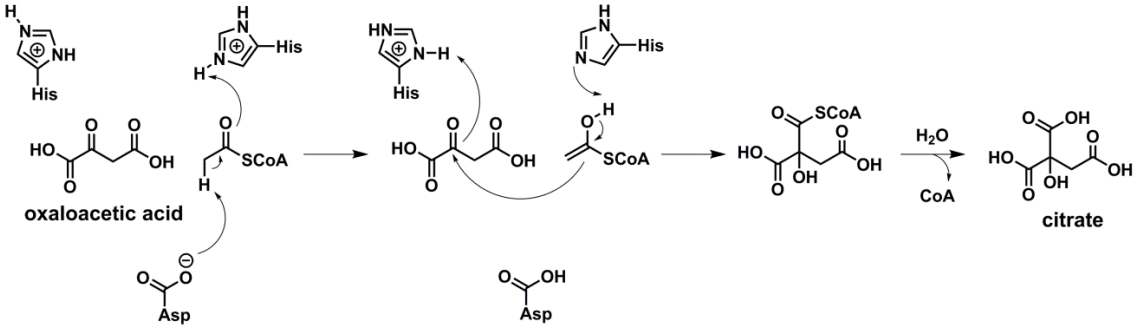


図 3-4.　クエン酸合成酵素の反応機構

1966 年、Sutherland らは提唱した二量化機構を裏付けるため、生産菌である *Penicillium purpurogenum* に対して、^{14}C ラベルされたモノマーの脱炭酸体を投与し、生成物にラベル化された炭素が効率的に取り込まれたことを示した[6]。1981 年には Tamm らが rubratoxin B 生産菌である *Penicillium rubrum* に放射性同位体標識したモノマーの脱炭酸体を投与したが、ラベル化はランダムに入ったという結果が得られた[7]（図 3-5)。

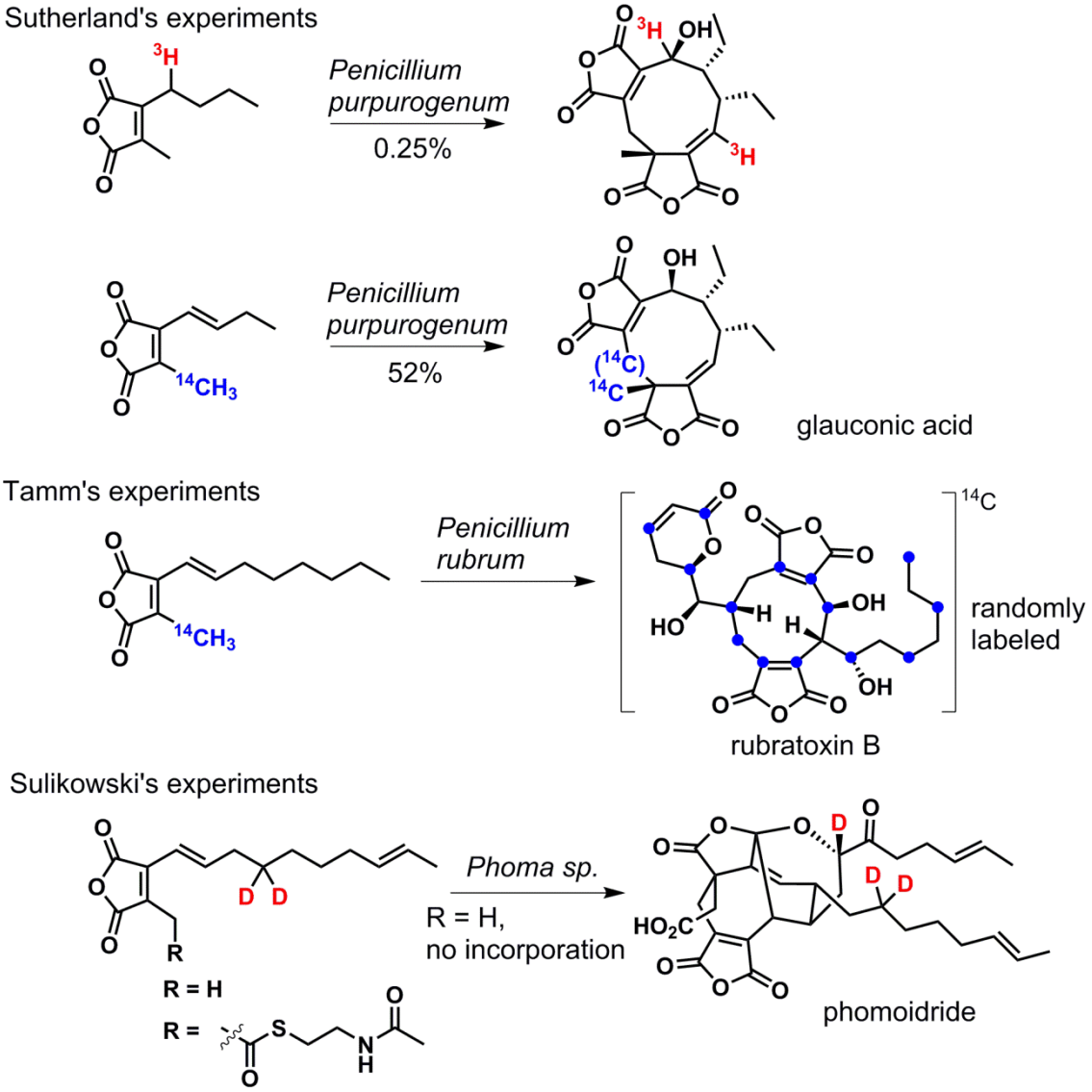


図 3-5.　放射性同位体標識した中間体の取り込み実験

Sulikowski らは、代表的な nonadride として、phomoidride に着目し、重水素化ラベルされたモノマーの *N*-acetylcysteamine thioester (SNAC)を合成した[8]。これを生産菌 *Phoma* sp. (ATCC74256)に投与した結果、期待した場所に重水素が導入された phomoidride が得られた。しかし、SNAC 体ではなく、過去

に生合成中間体と推定されたモノマーを投与した場合、重水素化ラベルされた phomoidride は得られなかった。Sutherland らの取り込み実験では、真の基質がモノマーか、その脱炭酸体かを区別できなかったが、この研究から、彼らは、脱炭酸していないモノマーが二量化の基質となり、脱炭酸を出発とする二量化機構を提唱した(図 3-6)。

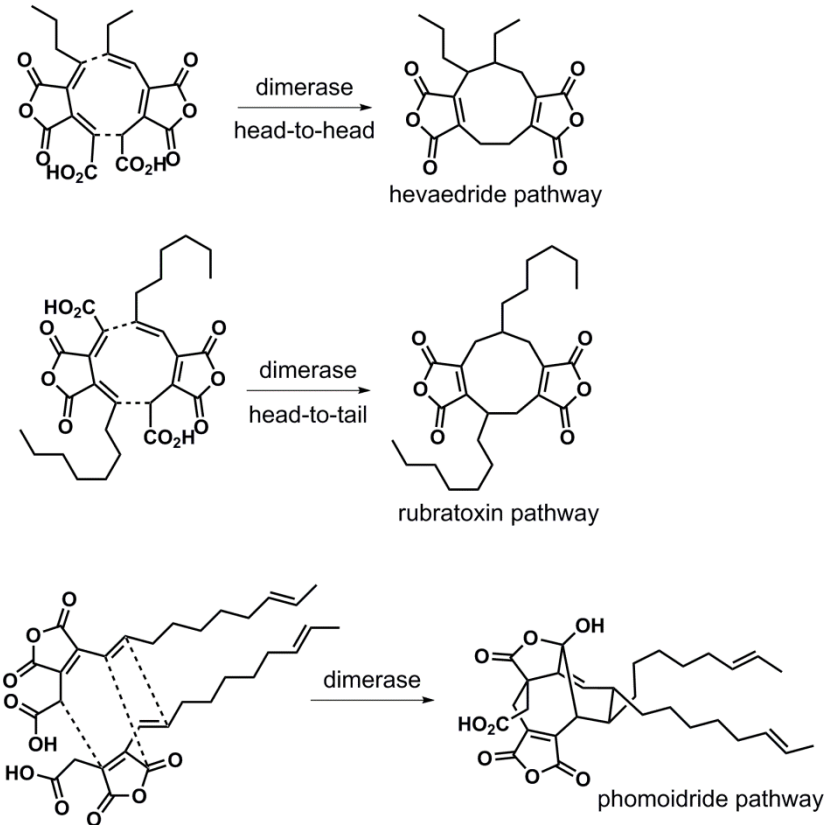


図 3-6.　推定されたモノマーの二量化機構

このような背景のもと、本研究では phomoidride B の生合成遺伝子の同定と、二量化酵素の機能解析を目的として、*A. oryzae* を用いた異種発現を行った。特に、以下の点について検証した；1) Sulikowski らは、脱炭酸体がモノマーであるという可能性を否定し、新たな二量化機構を提唱しているが、全ての実験事実を、統一的に説明できていない；2) Sulikowski らの二量化機構において、モノマーの反応点は説明できるが、二重結合の異性化機構および脱炭酸のタイミングについて明示されていない。

3-2.　実験結果と考察

3-2-1.　phomoidride B の生産確認

初めに、入手した菌株 *Phoma* sp. (ATCC74256)の phomoidride B 生産能を確

認した。糸状菌は、pH によって二次代謝産物の生合成を制御できる遺伝子 *pacC* を有している[9]。Sulikowski らは、pH を変えて *Phoma* sp.を培養したところ、pH を 3~4 に下げた時に、phomoidride B の生産量が増加することを報告した。実際に pH を下げなかったものと比較すると、菌体の様子が異なることがわかった。まず、pH を下げたものは培養液が黒く変色したが、下げないものは、黄色がかっており、PG 培地そのものの色に似ていた。次に pH を下げたものは、培養液の粘性が低いのに対し、下げないものは、極端に粘性が上がり、集菌の際に濾紙がすぐに詰まってしまった。集めた菌体からの抽出物を HPLC で解析した結果、pH を下げた場合に、UV 241 nm に極大吸収を持つ化合物が生成したと判明した。また、抽出物の一部を HPLC で精製し、分子量を測定したところ、phomoidride B に相当するマススペクトルを得た。従って、*Phoma* sp.は pH を下げた時に phomoidride B を生産することを確認できた。これにより、生合成遺伝子の転写を確認することができた。

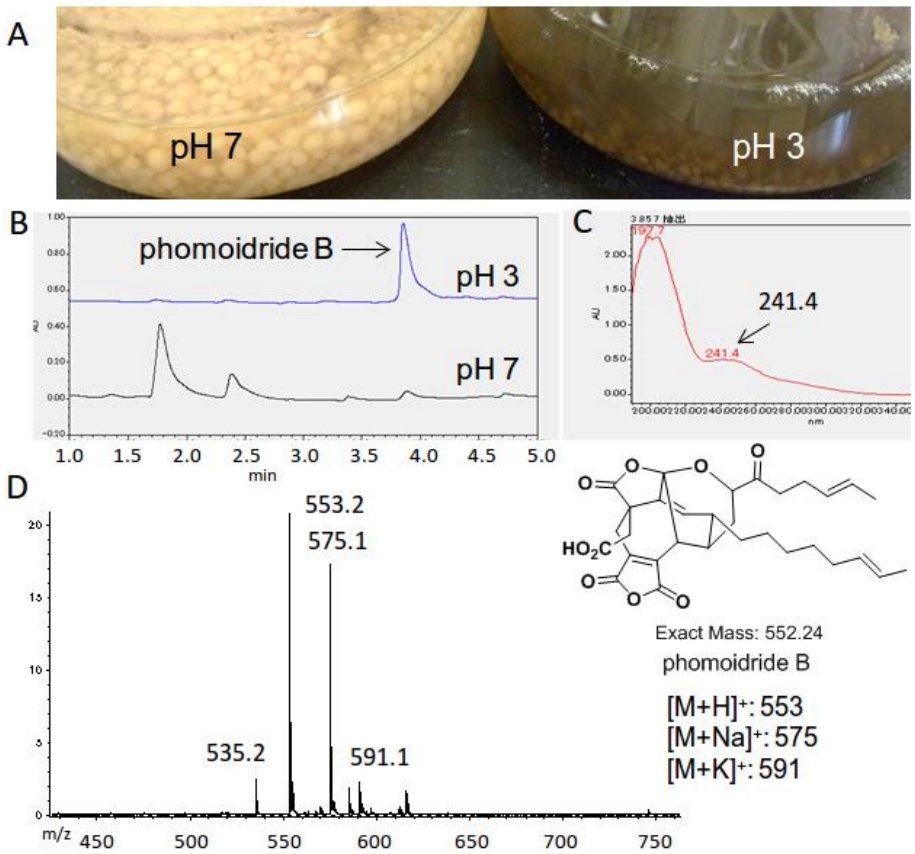


図 3-7.　phomoidride B の生産確認。A：培養液の様子。左は pH を下げなかったもの、右は pH を下げたもの。B：HPLC チャート。C：phomoidride B の UV スペクトル。D：phomoidride B のマススペクトル。

3-2-2.　phomoidride B 生合成遺伝子クラスターの探索

前述したとおり、モノマーの生合成、すなわち脂肪酸部位とオキサロ酢酸との反応はクエン酸合成酵素の反応に類似している。糸状菌には、クエン酸回路の他に、2-メチルクエン酸回路が知られている[10]。これは、脂肪酸のβ酸化によって生じたプロピオン酸からピルビン酸を生成する経路である。

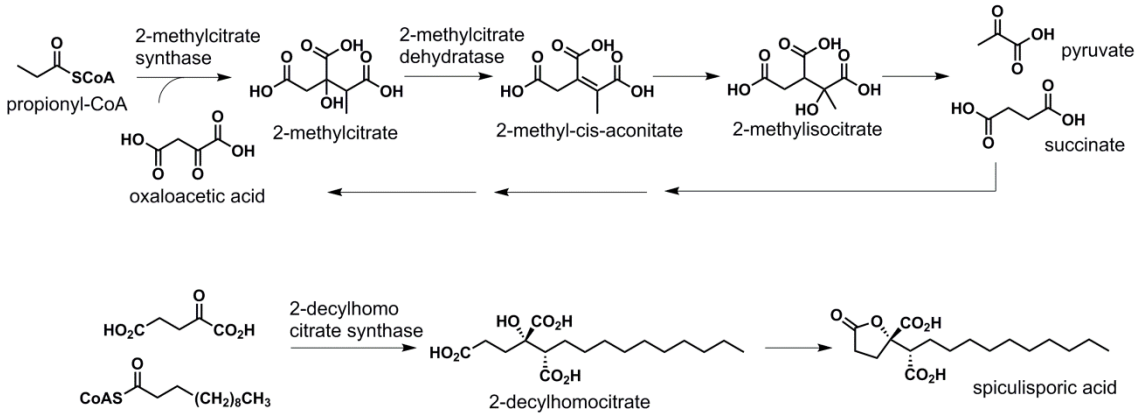


図 3-8.　2-methylcitrate cycle の反応経路と spiculisporic acid の生合成経路

モノマーの予想生合成機構は、2-methyl-*cis*-aconitate の生合成機構に類似しているため(図 3-8)[11]、phomoidride の生合成遺伝子には、2-methylcitrate synthase (CS)に類似した酵素遺伝子と、2-methylcitrate dehydrogenase (MCD)に類似な酵素遺伝子が必要であると思われた。

糸状菌が生産する天然物には、2-methylcitrate synthase のメチル基が長鎖アルキル基に置き換わったアルキルクエン酸型の化合物が多数報告されている[12]。spiculisporic acid は、デカン酸とα-ケトグルタル酸がアルドール反応によって結合した後、ラクトンを形成した構造をしている。この化合物の生合成においてアルドール反応を触媒する酵素は CS であると予想されるが、脂肪酸を合成する酵素は、FAS もしくは PKS の両方の可能性が考えられる。但し、phomoidride B のアルキル鎖には、2 個のオレフィンが存在することを考慮すると、FAS の関与は考えにくい。これらのことから、phomoidride B の生合成には、PKS と CS および MCD が必要であると推測できる。しかし、*Phoma* sp.は、NCBI などのデータベース上にゲノム情報が公開されている菌株ではなかったため、自らゲノム解析を行う必要があった。

Phoma sp.を PG 培地で培養し、菌体からゲノム DNA を抽出した。これを用いて、ドラフトシーケンス解析を行った。ドラフトデータは、染色体全ての塩基配列がつながっているわけではなく、断片化された配列情報であるが、おおよその遺伝子情報を得ることができる。これを Blast Station という相同配列の検索ソフトを用いてデータベース化した。代表的な繰り返し型 PKS である LovB

の塩基配列をクエリにこのデータベースを探索すると、およそ 34 個の遺伝子が候補に挙がった。次に、*Salmonella tryphimurium* LT2 の CS である PrpC[9] をクエリにすると、相同性は低いながらも、これらの候補の中に、CS を持つクラスター(*phi* クラスター)を発見した。このクラスターを 2ndFind にて解析した結果、PKS の近傍に CS と MCD が存在していると判明した。同時期にゲノム解析を行った zopfiellin 生産菌 *Zopfiella curvata* の染色体にも同様の遺伝子クラスター(*zop* クラスター)が存在しており、これらを比較すると、互いに相同性が高いことがわかった(表 3-1-A)[13]。これらを踏まえ、予想した生合成経路を図 3-9 に示す。見つかった PKS には、MT ドメインがあるが、予想生合成中間体のポリケタイド鎖にメチル基はない。このような機能を持たない MT を持つ PKS は、前述した aslanipyrone や aslaniol を生合成する PksF や sorbicillinoid を生合成する SobA でも観測されている[14,15]。

モノマーの生合成には、PKS、CS、MCD の関与が示唆されるが、二量化酵素に関する知見は皆無であった。*zop* クラスターとの比較により、これら 3 種以外に保存されている遺伝子が 5 種見つかった(表 3-1-B)。そのうち *phiD* と *phiL* は耐性遺伝子と考えられるため、残った *phiB*、*phiC*、*phiM* の中に二量化酵素が含まれていると予想される。

表 3-1. A：phomoidride の推定生合成遺伝子クラスター；B：zopfiellin 推定生合成遺伝子クラスターとの相同性の比較

A

gene	conserved domain/function	size in AA	homology (% identity/% similarity)
orf(-1)	methyltransferase	403	LEMA_P093740.1 (56%, 70%)
phiA	polyketide synthase	2577	TSTA_048430 (63%, 76%)
phiB	PEBP superfamily	208	TSTA_048450 (63%, 75%)
phiC	hypothetical protein	226	TSTA_048460 (69%, 81%)
phiD	MFS multidrug transporter	659	TSTA_048470 (60%, 75%)
phiE	methyltransferase	300	TSTA_048480 (61%, 77%)
phiF	DUF1115 superfamily	301	ACA1_153620 (40%, 55%)
phiG	α/β hydrolase	363	SNOG_10482 (64%, 76%)
phiH	membrane protein	279	GLAREA_03912 (33%, 46%)
phiI	2-methylcitrate dehydratase	504	AFUA_2G13610 (62%, 78%)
phiJ	citrate synthase	457	TSTA_048490 (59%, 73%)
phiK	hypothetical protein	276	TSTA_048540 (63%, 75%)
phiL	bicyclomycin resistance protein	424	TSTA_048530 (60%, 76%)
phiM	hypothetical protein	224	TSTA_048520 (48%, 66%)

phiN	PEBP superfamily	226	TSTA_048510 (42%, 58%)
phiO	transcriptional factor	440	AN9221.2 (26%, 39%)
orf1	hypothetical protein	317	SNOG_14253 (37%, 56%)

B

phi gene cluster	zop gene cluster	homology (% identity/% similarity)
PhiA	Zop8	54%, 70%
PhiB	Zop7	47%, 57%
PhiC	Zop4	41%, 63%
PhiD	Zop2	56%, 74%
PhiI	Zop3	59%, 77%
PhiJ	Zop11	57%, 70%
PhiL	Zop5	48%, 68%
PhiM	Zop9	42%, 62%

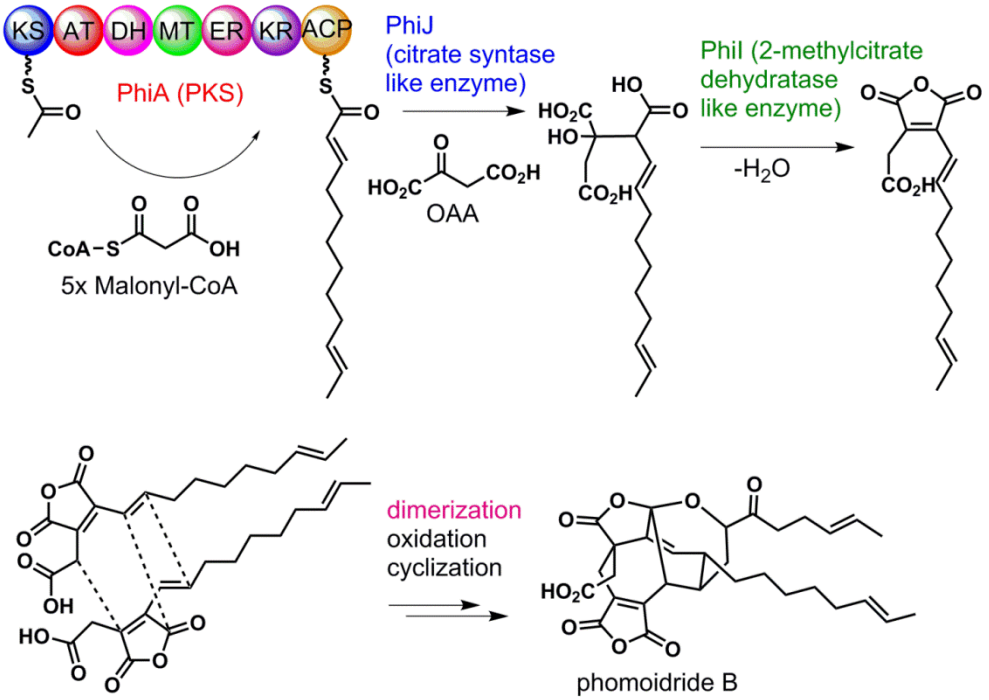


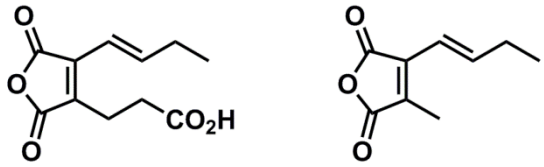
図 3-9.　phomoidride B の推定生合成経路

3-2-3.　プラスミドの構築と各形質転換体代謝産物の解析

各遺伝子は *Phoma* sp.のゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、*phiA* は全長が 8kb と長いために、２断片に分割して pTAex3 に導入した。また、*phiI* と *phiJ* は二段階で pUSA2 に組み込んだ。ベクターへの挿入には In-Fusion 法を用い、

phiA/pTAex3 と *phiI*+*J*/pUSA2 の２種類のプラスミドを調製した。これらのプラスミドに目的遺伝子が挿入されたかは、PCR によって確認し、目的遺伝子に変異がないことはシーケンス解析で確認した。

得られる化合物として、モノマーおよび、モノマーの脱炭酸体が考えられた。天然から得られている無水マレイン酸構造を持つ化合物の UV 吸収は、脱炭酸したものが UV 300 nm を越えるのに対し[2]、脱炭酸していないモノマーでは、UV 268 nm と大きく異なっている(図 3-10)[16]。形質転換体からの代謝産物を解析する際は、これらの UV 吸収を手がかりにモノマーの探索を行った。



λmax. 211 and 268 nm　　λmax. 303 nm

図 3-10.　無水マレイン酸型モノマーおよび脱炭酸体の UV 吸収波長

<u>*phiA*+*I*+*J* 三重形質転換体</u>

DPY 培地で培養した *A. oryzae* NSAR1 をプロトプラスト化し、形質転換を行った。形質転換体は 1 枚のプレート当り 20 コロニー程度生育し、このうち 6 コロニーについて代謝産物を解析した。これら 6 個の形質転換体を MPY 培地で 7 日間振盪培養した。予想中間体はカルボン酸であるため、菌体のアセトン抽出物から、液-液分配により中性物質を除去後、水層の pH を 1 に下げ、酢酸エチルの抽出により酸性物質画分を得た。得られたサンプルを HPLC で解析した結果、ひとつの形質転換体から、ごくわずかながら、UV 312 nm に極大吸収を持つピークを観測した。後述する標品との保持時間および UV スペクトルが一致したことから、得られた化合物は phomoidride 型モノマーの脱炭酸体であると判明した。従って、*phi* 遺伝子クラスターは phomoidride の生合成に関与していることがわかった。

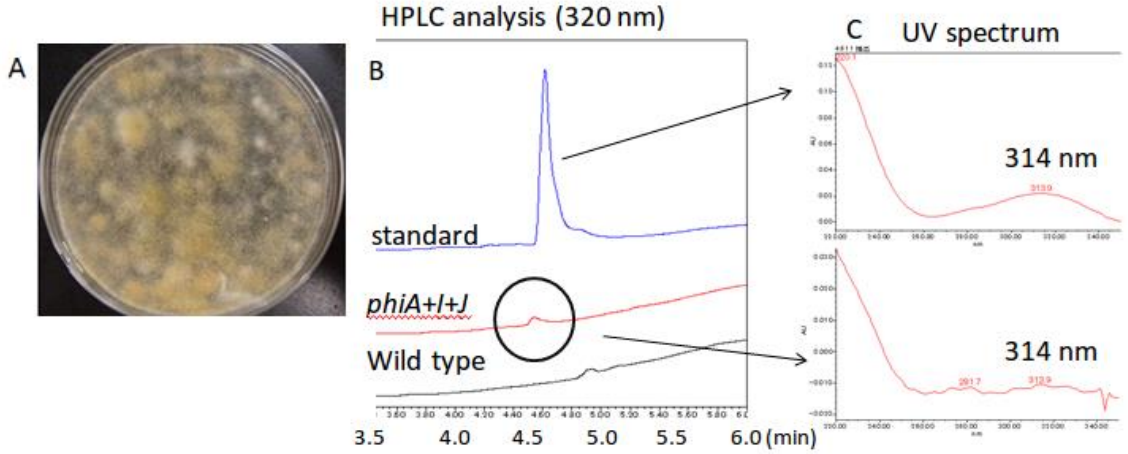


図 3-11.　*phiA+I+J* 三重形質転換体と HPLC チャート
A: 回復培養後の様子。B: UV 320 nm でのクロマトグラム。C: 4.5 min の UV スペクトル。

これまで nonadride 系天然物はどのような酵素によって生合成されるか不明であった。本研究では、*A. oryzae* 異種発現系を用い、実際に nonadride 系天然物のモノマーの脱炭酸体が PKS、CS、MCD によって生合成されることを証明した。

得られた化合物は、モノマーそのものではなく、脱炭酸体であった。これまでに知られている酸無水物型モノマーの中で、オキサロ酢酸由来のものは全て脱炭酸体として得られている。例えば、図 3-1 の chaetomeric anhydride、itaconitin、tyromycin などが挙げられる。一方、脱炭酸していないものとして、cordyanhydride A, B がある。オキサロ酢酸由来の酸無水物型モノマーは、マロン酸のビニログと考えることができ、容易に脱炭酸することが予想される。実際に Adlington らは、無水マレイン酸に共役した二重結合を持つモノマーを合成した際、カルボン酸までの炭素数が 1 つのものは収量が低いのに対し、2 つのものは高収率で得られたことを報告している(図 3-12)[17]。

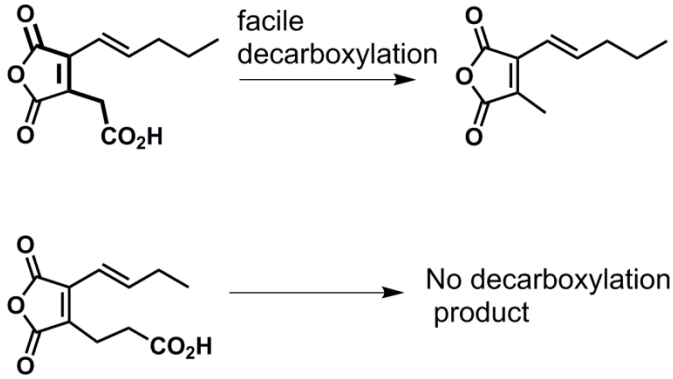


図 3-12.　モノマーの脱炭酸

しかし、phomoidride は二量化するモノマーの片方が脱炭酸し、もう片方はカルボン酸が残っている。他の酸無水物型二量体がカルボン酸を持たないことから、二量化以前に脱炭酸が進行すると予測できることに対し、phomoidride の場合、一方が脱炭酸しない機構があると推測される。但し、これに関しては今後、二量化酵素を詳細に研究する必要がある。

以上のことから、nonadride 系天然物の生合成遺伝子には、PKS、CS、MCD そして二量化酵素をコードする遺伝子が含まれていることがわかった。この情報は、今後、染色体上に眠っている nonadride 系天然物の生合成遺伝子に対してゲノムマイニングする際に利用できる。

3-3. *Talaromyces stipitatus* に存在する nonadride 生合成遺伝子のゲノムマイニング

Talaromyces 属菌は、*Penicillium* 属菌の親類に当たる菌であり、これらに属する糸状菌のいくつかは glauconic acid や rubratoxin を生産する[18]。本研究で注目したゲノム公開株 *T. stipitatus* には、*phi* クラスターと高い相同性をもつ遺伝子クラスターが存在しており、phomoidride の生合成遺伝子クラスターの探索過程において、BLAST 検索で頻度高く検出された。この菌は、酸無水物二量体型天然物を生産しないにもかかわらず、PKS、CS、MCD が揃った nonadride 系天然物生合成遺伝子クラスターが 2 種類も存在している(図 3-13)。そこで、*A. oryzae* 異種発現系を用い、これらの眠っている生合成遺伝子を強制発現することで、ゲノムマイニングを行うこととした。

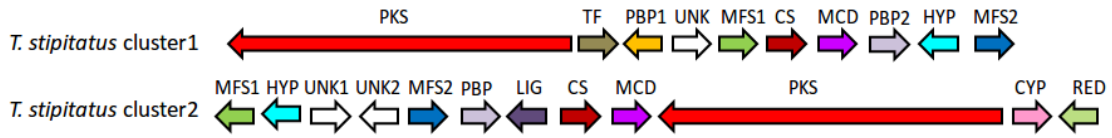


図 3-13. *T. stipitatus* にある *phi* クラスターに相同な二つの遺伝子クラスター
PBP: PEBP superfamily, MFS1: multidrug transporter, MFS2: bicyclomycin resistant protein, LIG: AMP dependent ligase, RED: reductase, HYP: hypothetical protein

表 3-2.　*T. stipitatus* にある二つの生合成遺伝子クラスター

Cluster 1 (*tst* cluster)

gene	conserved domain/function	size in AA	homology
tstA	polyketide synthase	2601	Zop8, PhiA
tstO	transcriptional factor	587	Zop1, PhiO
tstB	PEBP superfamily	208	Zop7, PhiB
tstC	hypothetical protein	225	Zop4, PhiC
tstD	MFS multidrug transporter	554	Zop2, PhiD
tstJ	citrate synthase	437	Zop11, PhiJ
tstI	2-methylcitrate dehydratase	491	Zop3, PhiI
tstN	PEBP superfamily	198	PhiN
tstM	hypothetical protein	231	Zop9, PhiM
tstL	bicyclomycin resistance protein	489	Zop5, PhiL

Cluster 2 (*sti* cluster)

gene	conserved domain/function	size in AA	homology
stiD	MFS multidrug transporter	1402	Zop2, PhiD
stiM	hypothetical protein	221	Zop9, PhiM
stiC	hypothetical protein	264	Zop4, PhiC
stiP	isochorismatse family protein	171	Zop6
stiL	bicyclomycin resistance protein	534	Zop5, PhiL
stiN	PEBP superfamily	228	PhiN
stiQ	AMP dependent ligase	587	
stiJ	citrate synthase	443	Zop11, PhiJ
stiI	2-methylcitrate dehydratase	491	Zop3, PhiI
stiA	polyketide synthase	2604	Zop8, PhiA
stiR	cytochrome P450	491	
stiS	reductase	614	

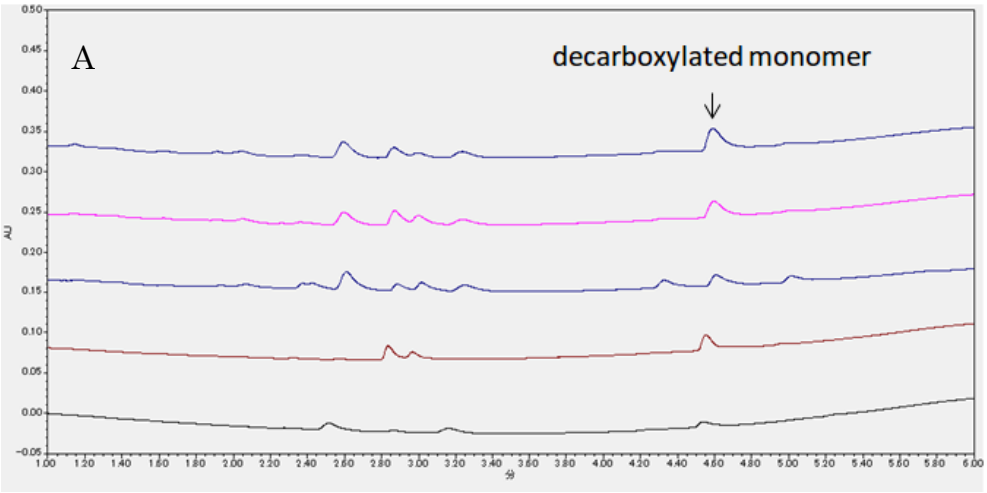
これら二つの遺伝子クラスターのうち、本研究で着手したのは、遺伝子クラスターの構成が *phi* クラスターにより高い相同性を示した *tst* クラスターである。初めに、最初の生合成中間体を得るため、*tstA*、*tstJ*、*tstI* を導入した株を調製し、その後、二量化に関わる酵素遺伝子を探索するため、*phi* クラスター、*zop* クラスターに高く保存された遺伝子に相当する *tstB*、*tstC*、*tstD*、*tstM*、*tstL* の異種発現を検討した。

3-4.　異種発現および各形質転換体の代謝産物の解析

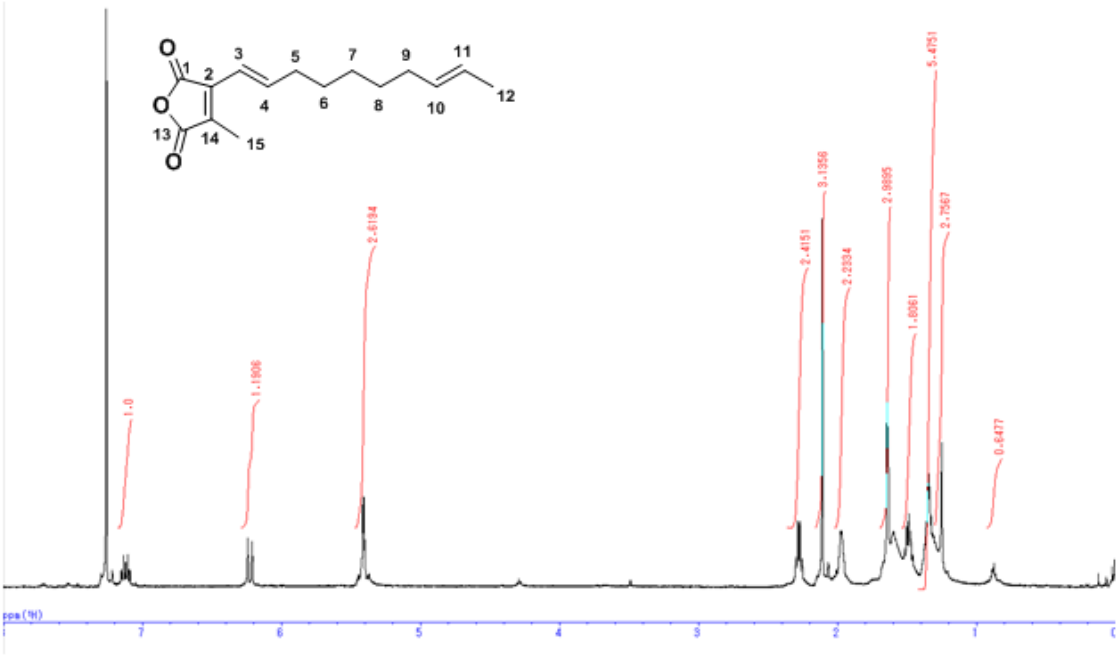
T. stipitatus NBRC9186 から得たゲノム DNA を鋳型とし、PCR にて目的遺伝子のクローニングを行った。*tstA* は 2 分割して pTAex3 に導入し、*tstI*, *J* は順次 pUSA2 に組み込んだ。これらの構築には In-Fusion 法を使用し、インサートの確認には PCR 法を用いた。また、各遺伝子に変異がないことはシーケンス解析によって確認した。*tstJ*/pUSA2 の構築の際、異なるコロニーから 2 種類の PCR 産物が得られた。シーケンス解析の結果、*tstJ* の他に、check point protein kinase という酵素をコードする遺伝子が増幅されたと判明した。従って、*tstJ* が正しく挿入されたプラスミドに対して *tstI* を組み込んだ。このようにして、*tstA*/pTAex3 および *tstJ*+*tstI*/pUSA2 を構築した。

<u>*tstA*+*I*+*J* 三重形質転換体</u>

DPY 培地で 3 日間培養した *A. oryzae* NSAR1 をプロトプラスト化し、形質転換を行った。得られた形質転換体のうち、18 コロニーを米培地 20 g に植菌し、7 日間培養した。これを酢酸エチルで抽出し、HPLC で代謝産物の解析をした。その結果、4 つの形質転換体の代謝産物に、*phiA*+*I*+*J* 三重形質転換体で得られた化合物と同じ溶出時間に、UV 312 nm に吸収を持つ化合物を観測した(図 3-14-A)。これを HPLC で精製し、各種 NMR スペクトルおよび MS スペクトルを測定した(図 3-14-B)。



B



^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ ppm					
H-3	6.23 (d, *J* = 16 Hz, 1H)	H-7	1.49 (qu, *J* = 7.5 Hz, 2H)	H-11	5.41 (m, 1H)
H-4	7.12 (dt, *J* = 16, 7.5 Hz, 1H)	H-8	1.35 (m, 2H)	H-12	1.64 (dd, *J* = 3.0, 1.0 Hz, 3H)
H-5	2.28 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H)	H-9	1.95 (m, 1H)	H-15	2.11 (s, 3H)
H-6	1.35 (m, 2H)	H-10	5.41 (m, 1H)		

図 3-14.　A: *tstA*+*I*+*J* 三重形質転換体の HPLC チャート。
B: phomoidride 型モノマーの脱炭酸体 **15** の ^{1}H NMR スペクトル

HR-MS 解析により、この化合物の分子イオンピークは *m/z* 249.1484 で検出されたことから、分子式は $C_{15}H_{21}O_3$ $[M+H]^+$ (m/z 249.1485)と決定された。

^{1}H NMR と ^{13}C NMR 測定の結果、以下のことがわかった。1) 2.11 ppm に 4 級炭素と結合したメチル基がある。2) 二重結合のプロトンは 4 種類である。3) カルボニル炭素が 166.6 ppm と 164.7 ppm に 2 つ存在する。次に、H-H COSY の結果から、図 3-15 のような部分構造が導き出された。

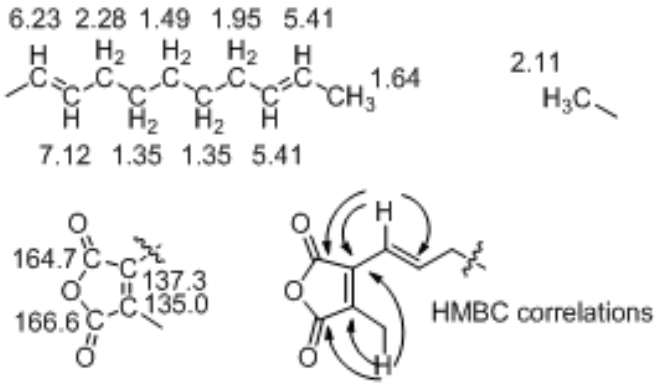


図 3-15.　各種 NMR によって推定された部分構造

最後に、HMBC 相関から全ての部分構造が連結した平面構造が導き出せた。これらのことから、*tstA*+*I*+*J* 三重形質転換体は、主生成物として phomoidride 型モノマーの脱炭酸体 **15** を生産することがわかった。なお、収量は米 1 kg 当たり 1.3 mg であった。

単純な無水マレイン酸は、UV 257 nm 付近に極大吸収を持つが、共役二重結合をもつモノマーは、UV 267 nm に極大吸収を持つことが後述する *in vitro* 実験からも支持されていた。しかし、形質転換体の代謝産物には UV 267 nm 付近に極大吸収をもつピークは検出されず、UV 312 nm 付近に極大吸収を有する **15** が検出された。前述したように、モノマーの脱炭酸体はヘキサン中で、303 nm に吸収を持つことが知られている[2]。このように、脱炭酸が進行すると、無水マレイン酸部の平面性が上がり、UV 吸収が長波長側にシフトすると考えられる。

3-5.　CS、MCD の *in vitro* 活性試験

3-5-1. TstJ および TstI の活性試験

T. stipitatus の生合成遺伝子のゲノムマイニングにより、phomoidride 型モノマーの脱炭酸体が得られたことから、TstJ は炭素数 12 のポリケタイド鎖を変換すると推測できた。そこで、本研究では二次代謝経路の CS について *in vitro* の実験系を構築し、以下のことを検証した ; 1) 基質アナログとして、CoA エステルを使用できるか ; 2) CS と MCD の連続反応でモノマーを得られるか ; 3) TstJ の反応は C12 の基質に特異的か。

1)に関しては、クエン酸回路や 2-メチルクエン酸回路の CS はよく研究されているが、アルキルクエン酸経路の CS で *in vitro* 解析されたものは、spiculisporic acid 生産菌 *Penicillium spiculisporum* の 2-decylcitrate synthase および 2-decylhomocitrate synthase のみである[19,20]。これらの活性試験では、基質に脂肪酸 CoA エステルを使用している。本来アルキルクエン酸経路の CS は、PKS もしくは FAS の ACP ドメインに連結したアシル鎖に対して働き、酵素からの切り出しに関わっていると考えられる。ここで脂肪酸 CoA エステルは酵素とアシル鎖を繋げているホスホパンテテニル鎖を模倣しているため、このアナログ体を利用した。

2)に関しては、2-メチルクエン酸回路では、CS と MCD の連続反応を観測しているが[21]、アルキルクエン酸型の CS および MCD の反応例は、報告されていない。

3-5-2. 実験結果と考察

初めに、*tstJ* と *tstI* の予測されたエキソン配列で合成 DNA を設計した。入手したプラスミドを鋳型にし、PCR で目的遺伝子を pColdI にサブクローニングした。遺伝子の挿入は In-Fusion 法を用い、クローニング用の大腸菌 *E. coli* HST08 に導入した。各プラスミドに目的の遺伝子が挿入されていることを PCR およびシーケンス解析にて確認し、発現用の大腸菌 *E. coli* BL21-Gold (DE3)を形質転換した。この形質転換体を培養し、IPTG (isopropyl-β-D-1- thiogalacto-pyranoside)にてタンパク質の発現誘導をかけた(図 3-16)。これにより、TstJ および TstI は良好に発現し、可溶化することがわかった。

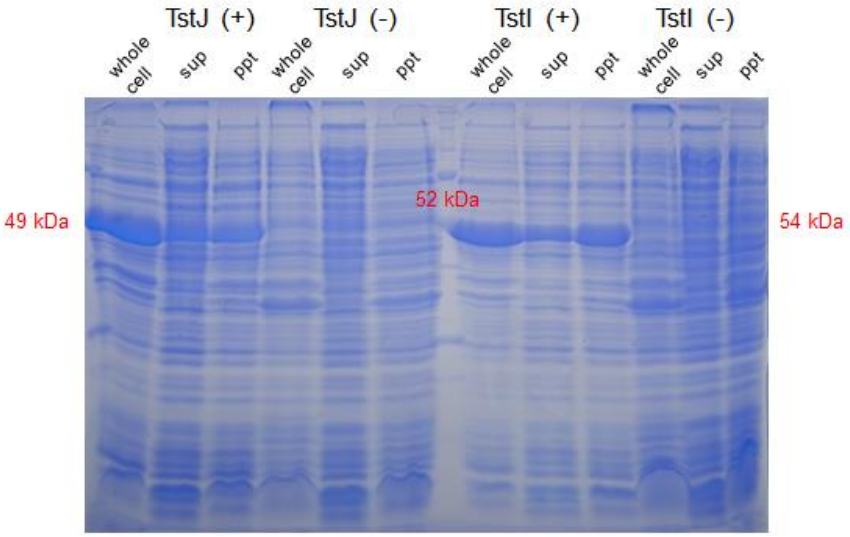


図 3-16.　TstJ と TstI の発現確認。(+): IPTG 誘導有。(−): IPTG 誘導なし。sup: 可溶画分。 ppt: 不溶画分。

次に TstJ と TstI を Ni-NTA カラムで精製した。溶出に用いるイミダゾールは基質のα,β-不飽和結合に 1,4-付加することが判明したため、限外ろ過で濃縮した後、PD-10 カラムで脱塩した。これを濃縮後、得たタンパク質濃度の平均は、TstJ が 165.7 μM、TstI が 173.5 μM であった。

酵素反応は、CS および MCD と、基質として脂肪酸 CoA エステルおよびオキサロ酢酸を使用した。phomoidride 型モノマーには、ポリケタイド鎖の末端側に二重結合が存在するが、この部分を簡略化したα,β-不飽和脂肪酸 CoA エステルもしくは、飽和脂肪酸 CoA エステルを基質として使用した。脂肪酸の鎖長は、C6、C8、C10、C12 の四種類で酵素の基質特異性を検討した(図 3-17)。

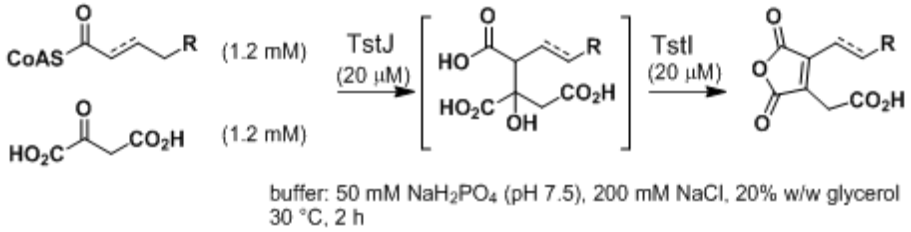


図 3-17.　TstJ と TstI の酵素反応

酵素反応の結果、TstJ と TstI は良好な触媒活性を有し、α,β-不飽和脂肪酸 CoA エステルと OAA との縮合を触媒した。この反応で検出された UV 267 nm の吸収をもつ化合物は、脱炭酸する前のモノマーであることが LC-MS 解析および、TMS ジアゾメタンを用いたトリメチル化によって支持された（図 3-18)。さらに、溶出時間の遅い位置に検出された UV 312 nm に吸収をもつピークは、脱炭酸体であると考えられる（図 3-19)。

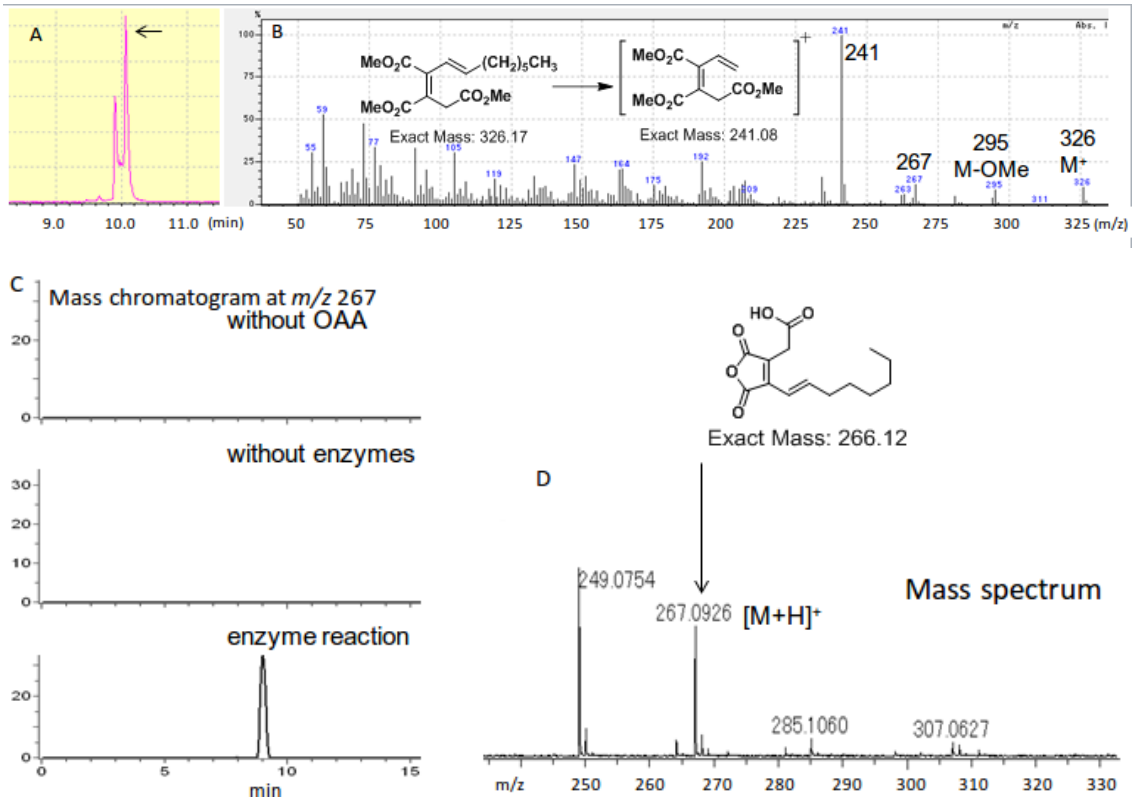


図 3-18.　生成物の質量分析結果。A: GC-MS クロマトグラム(*m/z* 241)；B: GC-MS スペクトル；C: LC-MS クロマトグラム(m/z 267)；D: LC-MS スペクトル。

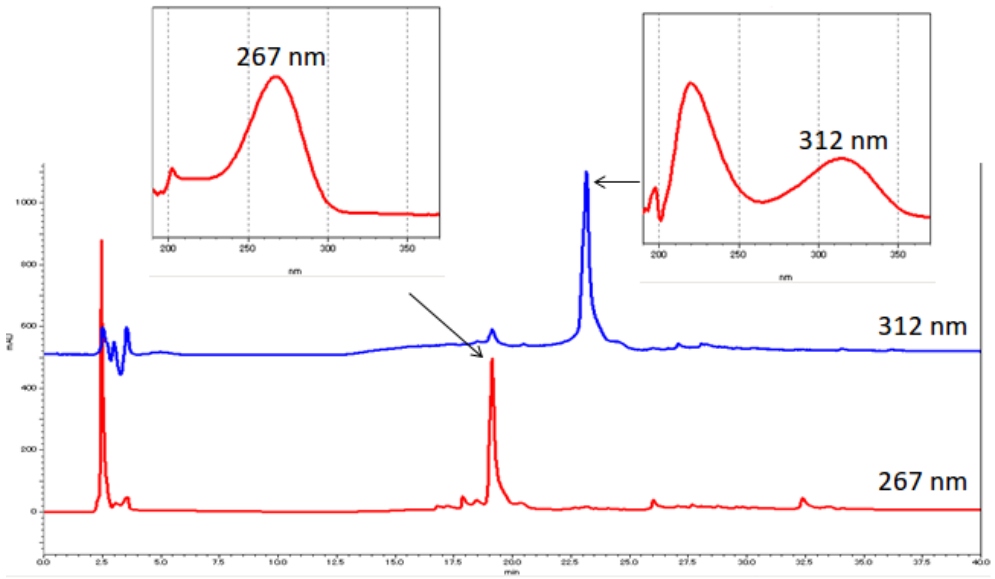


図 3-19.　酵素反応生成物の HPLC クロマトグラム。
上段：UV 312 nm、下段：UV 267 nm

酵素反応の時間を 30 分にし、UV 267 nm の吸収波長でのクロマトグラムの面積値を比較したところ、鎖長 10 のモノマーの生成率を 100%とした場合、鎖長 6 は 0%、鎖長 8 は 17.4%、鎖長 12 は 26.3%となり、C10 > C12 > C8 >> C6 の順となった。(図 3-20)。*in vivo* 実験の結果から推測すると、TstJ および TstI は C12 の基質に対して強い活性を示すと考えられた。ところが、実際は二炭素短い C10 の基質が最も反応性が高かった。従って、TstJ および TstI は基質の鎖長に対してある程度許容範囲が広いといえる。

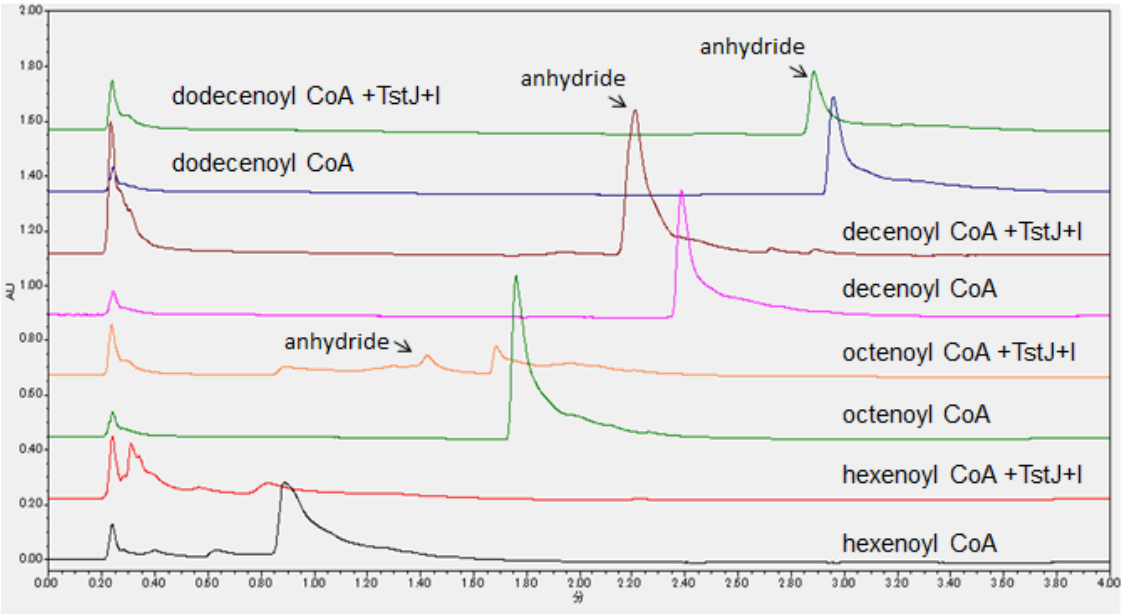


図 3-20.　TstJ と TstI に対して不飽和脂肪酸 CoA エステルを加えた酵素反応の HPLC チャート

飽和脂肪酸 CoA エステルを基質にし、同様の実験を行った結果、基質の減少は観測されたが、anhydride に相当するピークは観測されなかった(図 3-21)。従って、TstJ および TstI は、α,β-不飽和結合を持つ基質のみモノマーへと変換すると推定できる。基質の減少が観測された原因として、非酵素的な加水分解が起こっている可能性は低い。なぜなら、基質と緩衝液のみで 2 時間以上反応させても、基質は減少しなかったからである。それゆえ、基質の加水分解は TstJ によるものか、可能性は低いが、微量に混入した大腸菌由来の夾雑タンパク質によって起こると考えられる。

以上のことから、本研究では以下の知見た；1) 基質アナログに CoA エステルを使用できる；2) CS と MCD の連続反応で生じた酸無水物モノマーは、酵素反応条件では脱炭酸し難い；3) TstJ および TstI による反応は、鎖長の異なる脂肪酸 CoA エステルに対し、厳密な選択性を持たない。特筆すべきことに、本来の基質と同じ、C12 の脂肪酸 CoA エステルよりも C10 の基質に対して高い変換率

を示した。

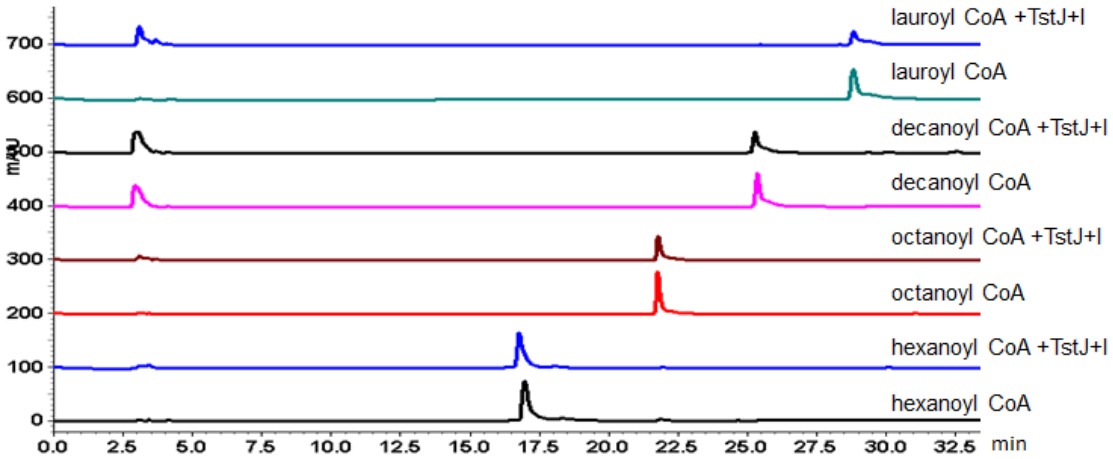


図 3-21.　TstJ と TstI に対して飽和脂肪酸の CoA エステルを加えた酵素反応の HPLC チャート

3-5-3.　*A. niger* の染色体上に存在する CS および MCD の機能解析

Aspergillus niger FH-X-213 は、*Z*-carboxymethyl-3-*n*-hexyl-maleic acid anhydride (以降 asperanhydride と呼称する)を生産することが知られている[22,23]。この化合物は、前述した nonadride 系天然物のモノマーと類似した構造を有しているが、無水マレイン酸部と共役する二重結合を持っていない。このような飽和脂肪酸型基質は、脂肪酸合成酵素 FAS によっても生合成できる。そこで、本研究では asperanhydride の生産菌とは異なる *A. niger* のゲノム情報から、FAS、CS、MCD をコードする遺伝子が近接している遺伝子クラスターを *T. stipitatus* の場合と同様に探索した。その結果、18.5 kb の領域に 5 種の遺伝子からなる一つの遺伝子クラスターが候補として得られた(表 3-3)。

表 3-3.　asperanhydride の推定生合成遺伝子クラスター

gene	conserved domain/function	size in AA
anhA1	FAS subunit α	1705
anhJ	citrate synthase	458
anhO	transcriptional factor	628
anhI	2-methyl citrate dehydratase	483
anhA2	FAS subunit β	2005

この遺伝子クラスターには、PKS 遺伝子の代わりに FAS のαおよびβサブユニットをコードする典型的な FAS 遺伝子が見出された。糸状菌の生産する酸無水物型天然物には、無水マレイン酸に共役した二重結合を持たないものも多数存在する。*anh* 遺伝子クラスターは、飽和アルキル鎖をもつ酸無水物を生合成する典型的な遺伝子クラスターであると推測される。本研究では、この遺伝子クラスターに含まれる CS と MCD を大腸菌発現系にて発現し、天然物である FAS 型のモノマーの酵素的合成を検討した。

3-5-4.　AnhJ と AnhI の発現と活性試験

anhJ と *anhI* は大腸菌で発現させ、*in vitro* 解析するため、一旦 *A. oryzae* NSAR1 で発現させた後、cDNA を鋳型に PCR し、大腸菌発現用ベクターである pColdI に組み込んだ。常法に従い、これらの酵素を大腸菌で発現させると、両酵素とも良好に発現し、可溶化することがわかった(図 3-22)。さらに Ni-NTA で精製し、限外ろ過、脱塩、濃縮を行い、定量したところ、AnhJ が 61 μM、AnhI が 330 μM の濃度で得られた。

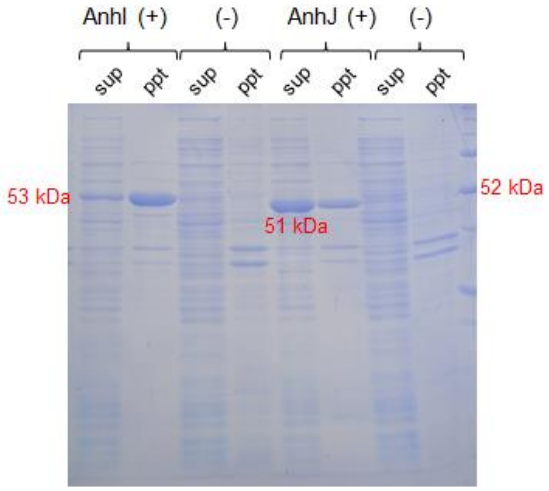


図 3-22.　AnhI と AnhJ の発現および可溶化の確認

酵素反応および解析は、TstJ と TstI の反応と同様の条件で行った（図 3-23)。飽和脂肪酸 CoA エステルと生成物は共に UV 257 nm 付近に吸収を有しており、区別がつけにくく、HPLC で分析時間を長くし、よく分離する条件を用いて分析した。一方、不飽和脂肪酸 CoA エステルを基質に用いた場合、基質は UV 257 nm に、生成物は UV 267 nm 付近に極大吸収を持つので、基質との区別がつきやすい。そのため、高感度で分析時間の短い HPLC 装置(UPLC)で解析した。

酵素反応の結果、AnhJ と AnhI は C8 の飽和脂肪酸 CoA エステルを基質として、天然物 asperanhydride を与えることがわかった(図 3-24)[13]。さらに、C6-12

の脂肪酸 CoA エステルを用い、基質特異性を検討した結果、C10 の飽和脂肪酸 CoA エステルも受容して生成物を与えた。同様に不飽和脂肪酸の CoA エステルを基質にした場合でも、C8 と C10 の基質に対して変換活性を示した。図 3-25 で、基質の他に UV 257 nm に極大吸収をもつ化合物(peak 2, 4)が観測されたが、これらは基質の CoA エステルと同じ UV 吸収を持つため、基質の不飽和結合の部位が大腸菌由来の夾雑タンパク質によって変換されたものである可能性が考えられる。

これらのことから、AnhJ は本来、C8 の飽和脂肪酸を基質とする酵素であるが、不飽和脂肪酸でも受容でき、鎖長にもある程度の許容範囲があるとわかった。また、この研究により、ポリケタイド型のモノマーだけでなく、脂肪酸型モノマーの酵素的合成を達成できた。本研究では、*A. oryzae* 異種発現系を利用して cDNA を調製し、AnhJ と AnhI を大腸菌で発現することに成功した。従って、天然物の生産菌から cDNA を調製することが困難な場合でも、*A. oryzae* 異種発現系を用いることで、簡便に cDNA を得られ、酵母や大腸菌の発現系に展開できることがわかった。

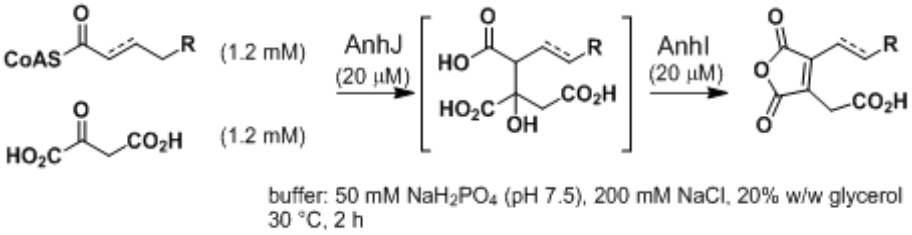


図 3-23.　AnhJ および AnhI の酵素反応

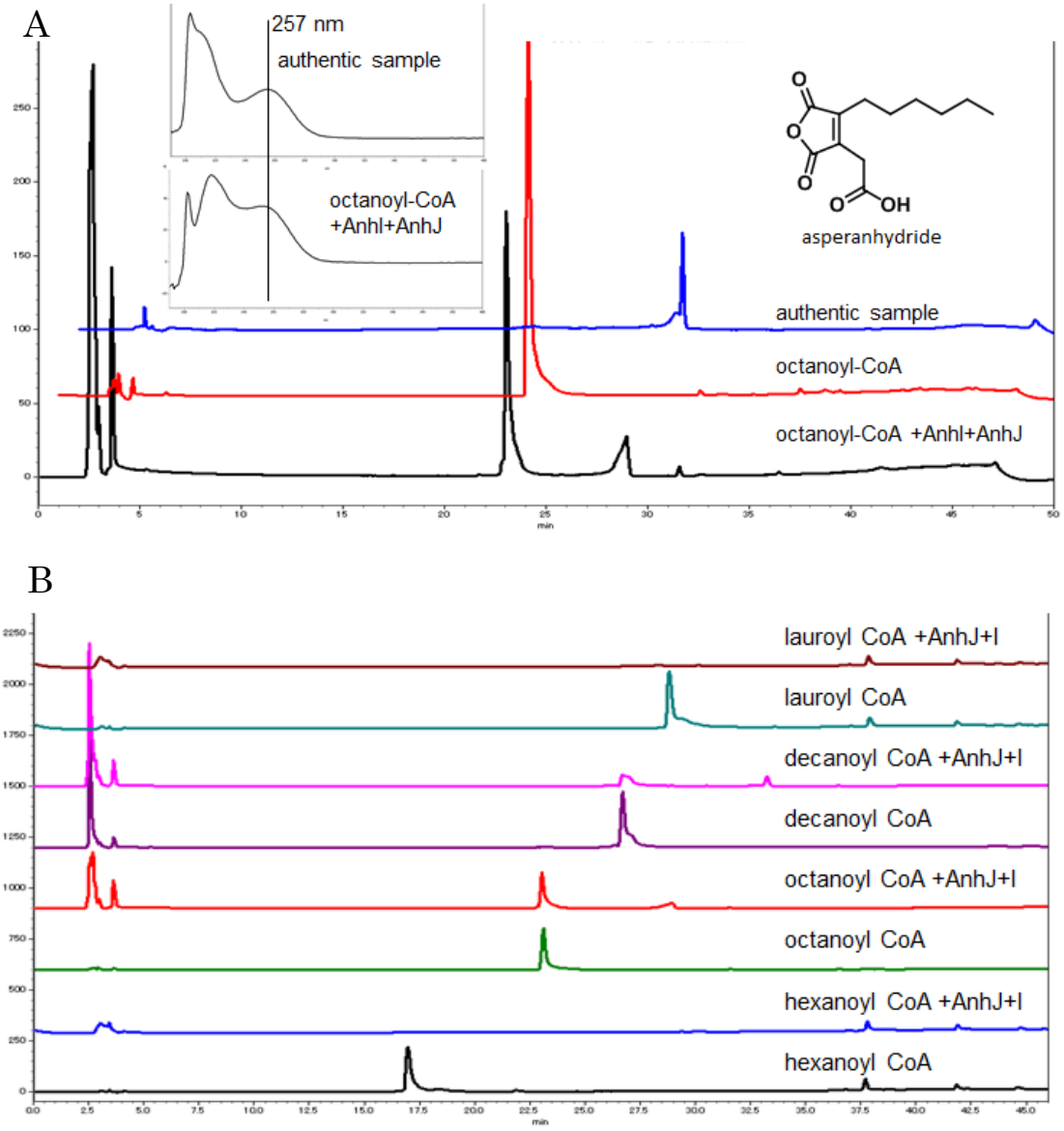


図 3-24.　AnhJ と AnhI による酵素反応の HPLC チャート；A：C8 の飽和脂肪酸の CoA エステルを用いた酵素反応；B：他の鎖長の CoA エステルを用いた酵素反応

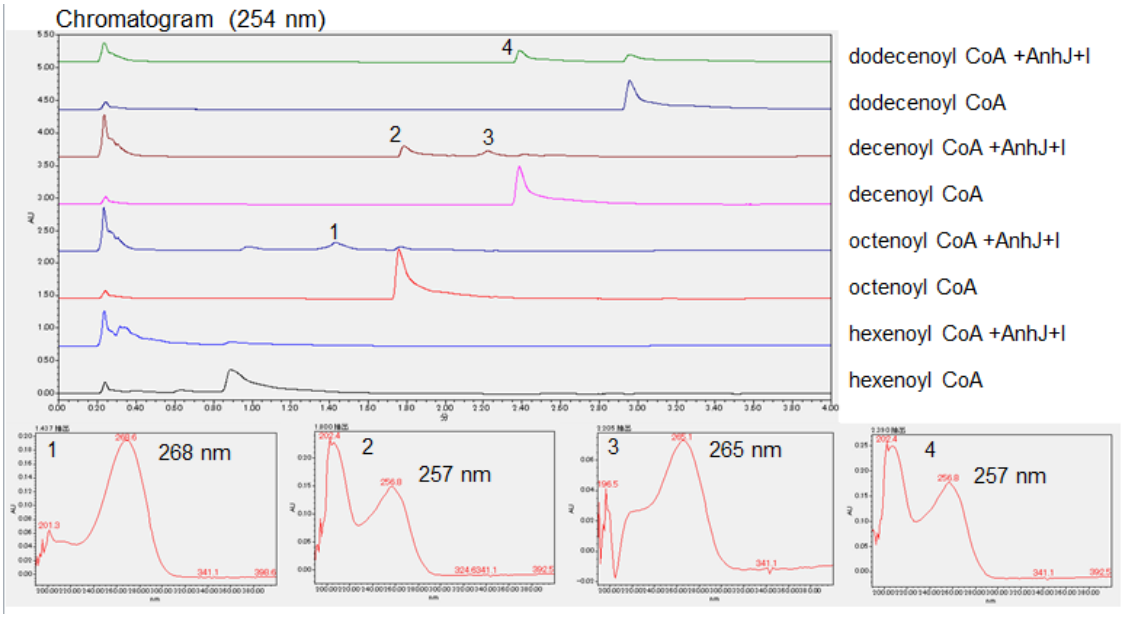


図 3-25.　不飽和脂肪酸の CoA エステルを用いた酵素反応生成物の HPLC 分析。

3-6.　糸状菌が生産する酸無水物型天然物の普遍的生合成経路の提唱

骨格構築にアルキルクエン酸合成酵素 CS が関与すると予想される化合物群には、nonadride 系天然物の他、zaragozic acid や cinatrin、spiculisporic acid[24] などが存在する(図 3-26)。今回の結果を基に考察すると、脂肪酸とオキサロ酢酸もしくはα-ケトグルタル酸によって生合成されることが再確認できた。

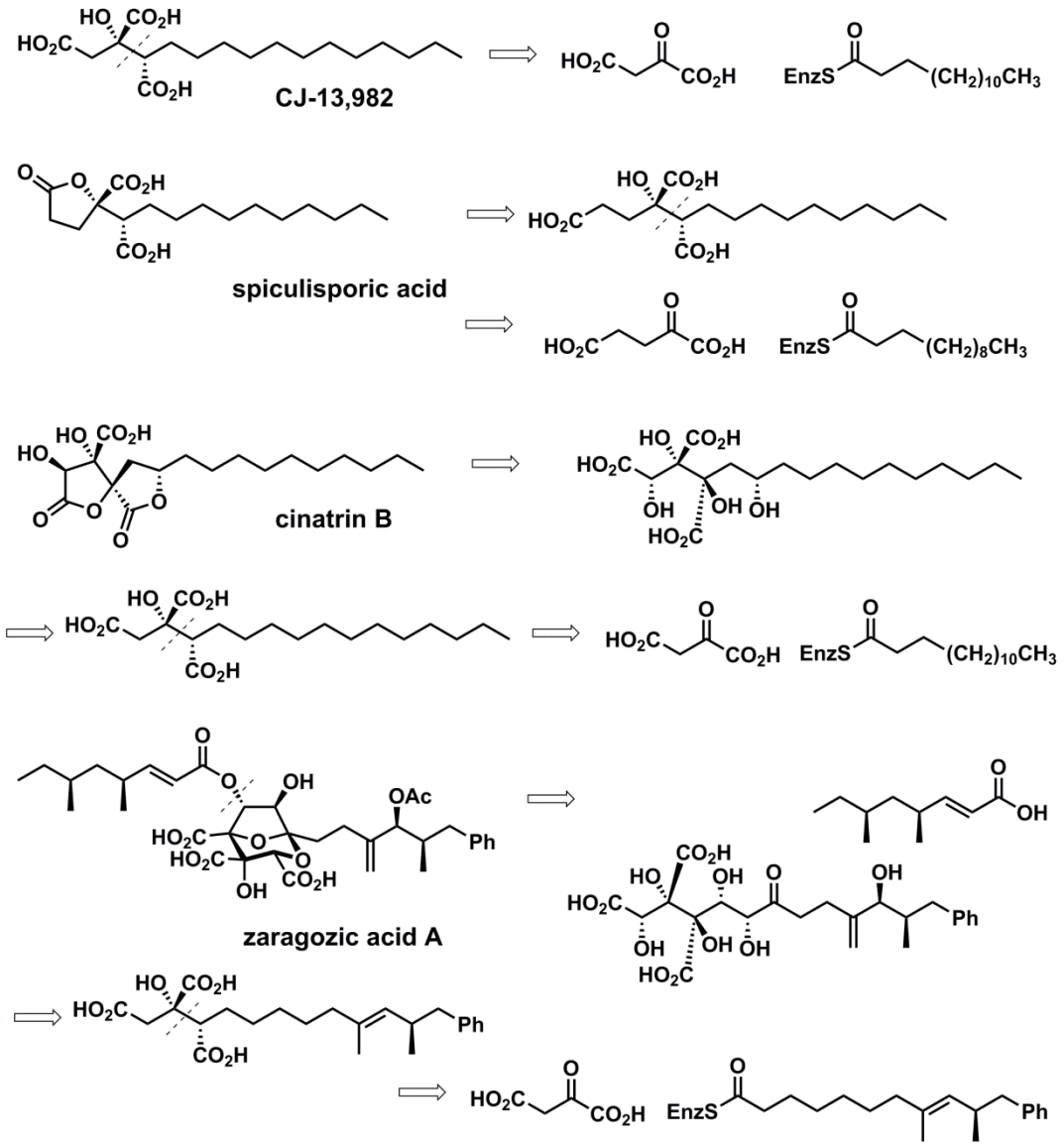


図 3-26.　アルキルクエン酸の例と逆生合成解析

この CS による反応は、CS が脂肪酸ユニットのα位のプロトンを引き抜くことで進行するが、nonadride 系天然物の脂肪酸ユニットからはγ位のプロトンを引き抜くと考えられる(図 3-27)。実際に AnhJ は、飽和脂肪酸の CoA エステルだけではなく、不飽和脂肪酸の基質アナログをも認識し、アルドール反応を触媒したことから、α位およびγ位のどちらからでもプロトンを引き抜くことができることがわかった。一方、TstJ は、飽和脂肪酸の基質アナログに対してアルドール反応を触媒しなかった。当研究室では、zopfiellin の生合成に関与する CS、Zop11 が飽和および不飽和脂肪酸 CoA エステルの両方を基質にすることを明らかにしており、アルキルクエン酸型の CS には、様々な基質特異性を示すものがあることがわかった。

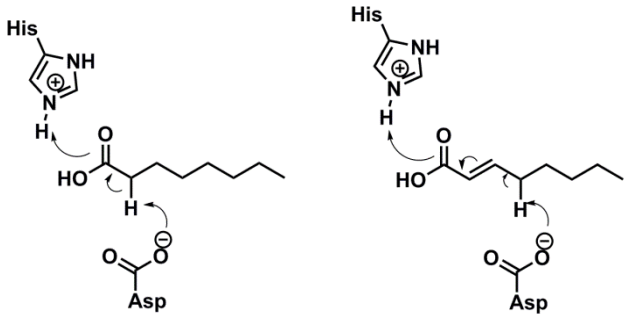


図 3-27.　*Salmonella typhimurium* 由来 2-methylcitrate synthase の触媒機構を基に推定した酸無水物型二量体の生合成に関与する CS の推定触媒機構

豚心臓由来の CS や大腸菌由来の CS に関して、X 線結晶構造解析により、どのアミノ酸残基が反応に関与しているかが既にわかっている[7]。α位もしくはγ位のプロトンを引き抜くアミノ酸残基は Asp であり、AnhJ、TstJ、PhiJ、Zop11 にも高く保存されている(図 3-28)。鎖長の選択性は、この Asp の一つ手前のアミノ酸残基が関与している説がある。2011 年、Chittori らは、*Salmonella typhimurium* の 2-methylcitrate synthase (StPrpC)の X 線結晶構造解析により、acetyl-CoA と本来の基質である propionyl-CoA に対する基質特異性を調べた。これにより、acetyl-CoA を認識する CS では、His と Val になっている部分が、propionyl-CoA を認識する 2-methylcitrate synthase では、それぞれ Tyr と Leu に置き換わっていると判明した[9]。最も重要な点は、基質と脂肪族アミノ酸の疎水性相互作用であり、Val や Leu が鎖長の認識に関わっていると予測された。これを本研究で扱った CS に当てはめると、触媒残基である Asp の一つ手前は、比較的側鎖の短いアミノ酸である Ala になっている。この置換により、活性部位が広くなっていると考えられることから、鎖長の長い基質を認識できると推察できる。

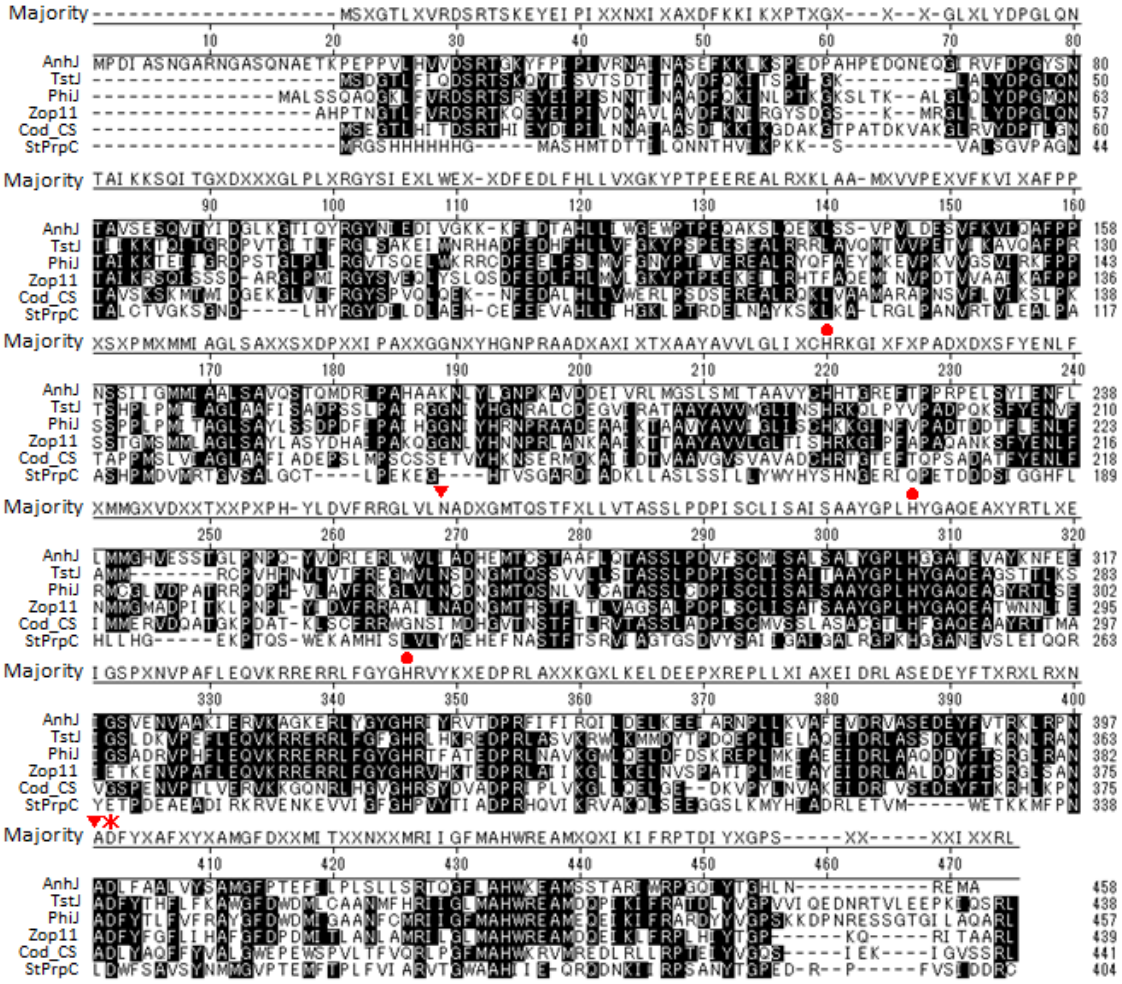


図 3-28.　CS のアミノ酸配列の比較。

丸印は、活性部位に高く保存される His 残基、星印は、触媒残基である Asp を示している。逆三角形は、鎖長の認識に関与すると予測されたアミノ酸残基。

今回研究に用いた CS はα位もしくはγ位のプロトンを引き抜き、エノラート中間体を生じた後は、γ位ではなくα位で OAA とのアルドール反応を触媒すると考えられる。報告されたアルキルクエン酸の生合成に関与する CS の反応機構によれば、その活性部位には、図 3-29 のように脂肪酸由来のエノラートと OAA が配置されるため、*S* 体の付加体が得られる。今回の研究では、脱水した無水マレイン酸が得られたため、立体化学に関する議論はできないが、この機構を参考にすると、酸無水物型天然物の CS によるアルドール反応も同様の機構で進行すると考えられる。

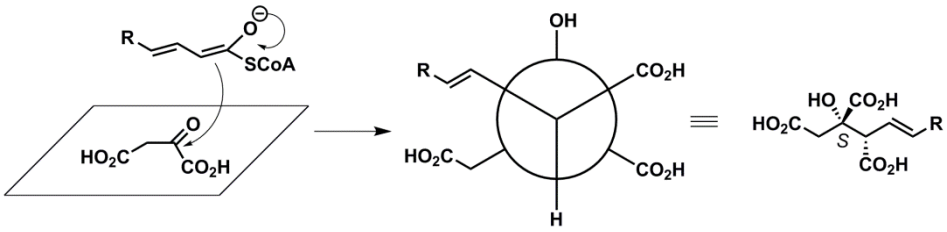


図 3-29.　CS によるアルドール反応の立体制御

本章の冒頭でも述べたが、Sulikowski らは、二量化は脱炭酸を伴って進行すると提唱した(図 3-5)。本研究では PKS、CS、MCD の 3 種の生合成遺伝子を異種発現し、モノマーの脱炭酸体を得たことから、脱炭酸して生じるアニオンは、酸無水物カルボニル基により効果的に安定化されるため、化学的に脱炭酸しやすいと考えた。一方、*in vitro* 実験では、脱炭酸する前のモノマーが得られたことから、温和な条件下では脱炭酸し難いという知見を得た。これらの実験事実を踏まえ、脱炭酸を伴う二量化に関して考察すると、最初に脱炭酸が進行して生じたアニオンがもう一方のモノマーに求核攻撃することで、phomoidride 型の二量化は説明可能であるが、同じ機構では、他の天然物の二量化は説明できない。この矛盾は、二量化の基質が一つしか無いと考えたことに起因すると予想した。これを解決するため、aconitate および asperanhydride の脱炭酸生成物の反応機構を参考にした(図 3-30)。すなわち、マレイン酸型の生成物(aconitate, asperanhydride)の脱炭酸に伴い二重結合が移動し、exo-methylene 型となった化合物(itaconate, 2-methylene-3-*n*-hexyl-butanedioic acid)が生成する。この機構を、共役二重結合を持ったモノマーに適用すると、exo-methylene 型の脱炭酸体 B および、無水マレイン酸型の脱炭酸体 C が二量化反応の中間体として考えられる。

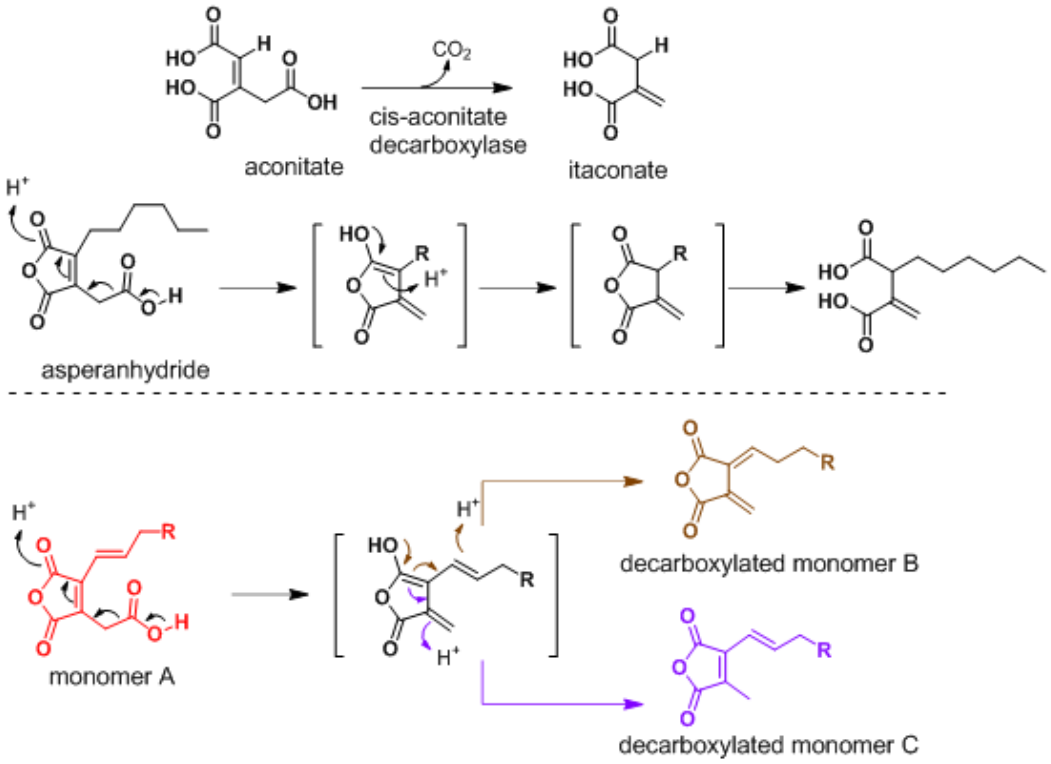


図 3-30.　脱炭酸モノマーの生成機構

これまでの説は、全く同じ基質が二量化反応に用いられるとされてきたが、これを CS および MCD により生じる本来のモノマーの他に、脱炭酸体 B および C を想定すると、以下のように、全ての二量化体の生成機構がうまく説明できるようになる（図 3-31)。共通している反応機構として、以下のことが言える；1）初めにモノマーA の脱炭酸が起こる；2）多くの場合 1,6-付加反応の形で二量化反応が終結する。異なっているのは、モノマーA の脱炭酸に伴い、C2 位の炭素から求核攻撃が起こる位置である。これは、アクセプターとなるモノマーもしくは脱炭酸体の種類に依存し、homo-A では C6'位で、モノマーA や C では C3'位で、B では C2'位もしくは C5'位で起こる。

Sulikowski らが問題とした過去の標識実験も、この説に従えば理解できる。すなわち rubratoxin では A と B の二量化反応であるため、Tamm らが投与した C は基質とならない。rubratoxin のあらゆる位置が標識されたのは、同位体標識された C が一旦分解した後、再度取り込まれたためであると考えられる。glauconic acid では、A と C の二量化反応であるため、C が効率よく取り込まれ、生産菌内の A と反応したと考えられる。phomoidride では、A 同士の二量化反応であるため、重水素標識された C が取り込まれなかったことが説明できる。

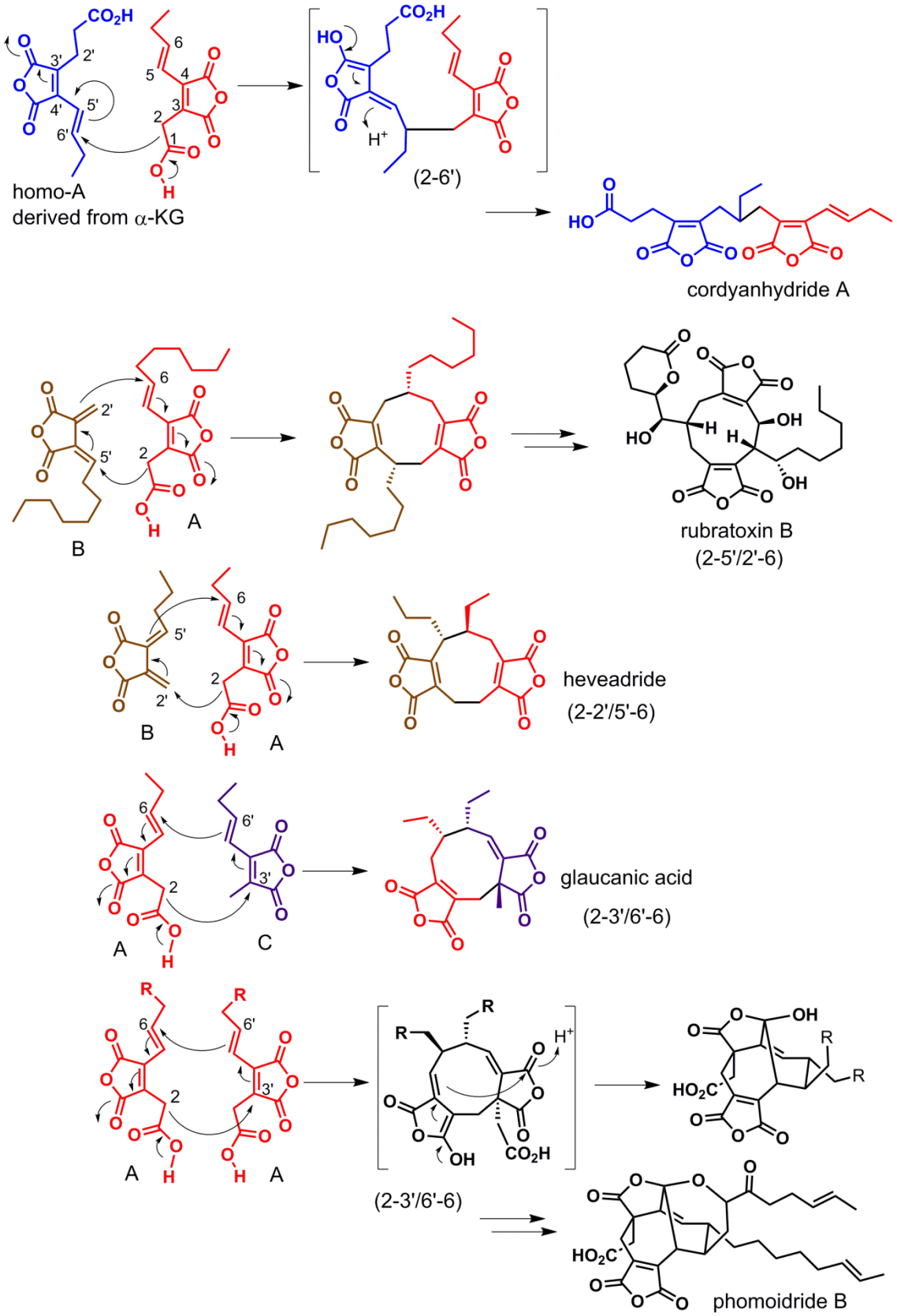


図 3-31.　酸無水物型天然物の予想二量化機構

このような二量化を触媒する酵素の触媒機構には、2 つの可能性を考えた；1) 二量化酵素がモノマーA から脱炭酸体 B や C を作った後、もう一分子のモノマーA を取り込み、二量化する；2) 二量化酵素とは別に脱炭酸体を作る酵素が存在し、二量化酵素はそこから基質を受け取る。モノマーA を用いた二量化は、脱炭酸を起点とすることから、二量化酵素自身が脱炭酸を触媒するか、脱炭酸酵素と複合体を形成する可能性が考えられる。既に知られている二量化酵素として、ditryptophenaline 生合成に関与する P450 がある[25]。この P450 は、二分子のモノマーをラジカル反応で二量化する酵素で、広い基質ポケットを有している。そのため、片方のモノマーのラジカル中間体を保持したまま、もう片方のモノマーにもラジカルを発生させ、二量化を触媒できると推定されている(図 3-32)。一方、2 つの酵素が関与して二量化を触媒する酵素には、リグナンの合成酵素が知られている。リグナンは coniferyl alcohol を原料に生合成される。この場合、二量化酵素 dirigent protein が、ペルオキシダーゼによって生成したフェノキシラジカルを受け取り、二分子のモノマーの立体化学を制御しつつ結合形成を触媒することが知られている[26]。以上の例のように、二量化反応を触媒する酵素には、一つの酵素で完結するものと、2 つの酵素が共同して働くものが存在する。従って、nonadride 系天然物の生合成においても、2 つの可能性が考えられる。

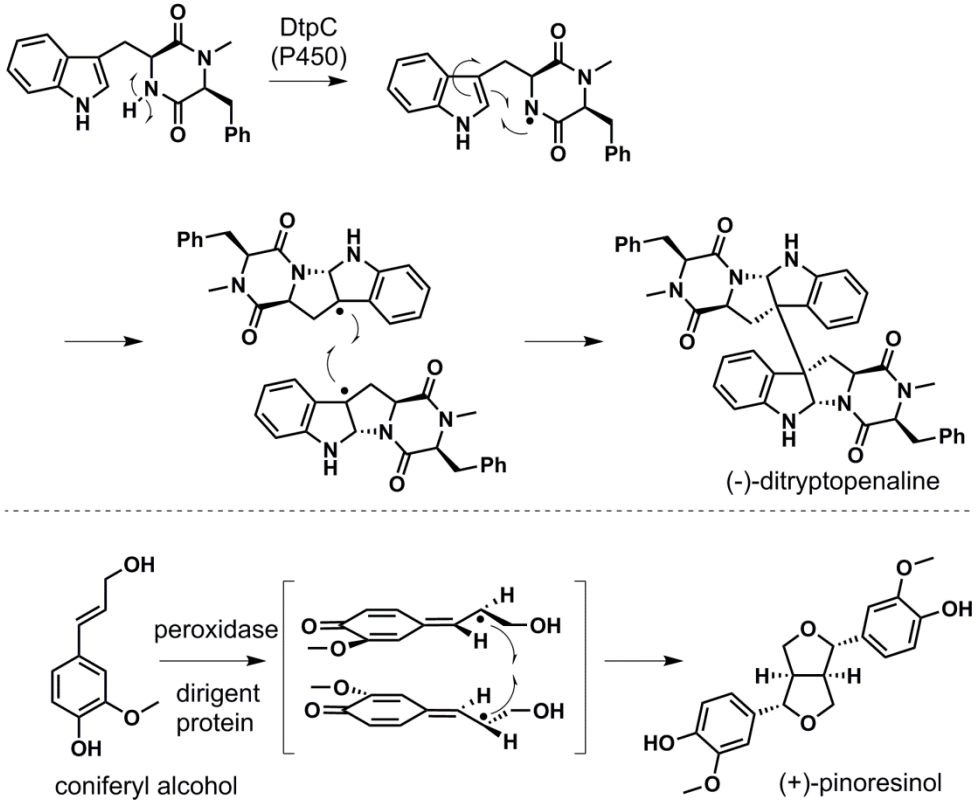


図 3-32.　天然に存在する二量化酵素の反応

nonadride 系天然物の二量化には、脱炭酸が関与することから、天然に存在する脱炭酸酵素と似た触媒残基をもつ酵素が候補として考えられる。自然界には、クエン酸回路の中間体である *cis*-aconitate を脱炭酸し、itaconate を生成する酵素 *cis*-aconitate decarboxylase (CAD)が存在する(図 3-33)。この酵素は約 450 アミノ酸によるポリペプチドで、MCD と同じ MmgE_PrpD ファミリーに属する。しかし、*A. terreus* の CAD と、TstI や PhiI は相同性が低く、脱炭酸酵素の候補ではない可能性が高い。さらに、3 種の遺伝子クラスターに共通して存在する遺伝子 *phiB*、*phiC*、*phiM* にも高い相同性は見い出せなかった。このようなことから、二量化酵素は、これまでに報告されていないドメインやモチーフを持つ可能性がある。脱炭酸酵素と二量化酵素が別々のポリペプチドか否かは今後の研究によって明らかになると期待される。

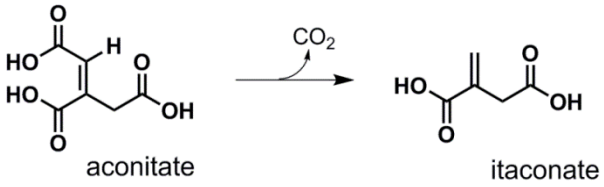


図 3-33.　aconitate の脱炭酸

参考文献

[1] Chen, X.; Zheng, Y.; Shen, Y., *Chem. Rev.* **2007,** *107* (5), 1777-1830.
[2] Moppett, C. E.; Sutherland, J.K., *Chem. Comm.* **1966**, *21*, 772-772.
[3] Bloomer, J. L.; Moppett, C. E.; Sutherland, J. K., *Chem. Comm.* **1965**, *24*, 619-621.
[4] Spencer, P.; Agnelli, F.; Williams, H. J.; Keller, N. P.; Sulikowski, G. A., *J. Am. Chem. Soc.* **2000,** *122* (2), 420-421.
[5] Wiegand, G.; Remington, S. T., *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **1986**, *15*, 97-117.
[6] Bloomer, J. L.; Moppett, C. E.; Sutherland, J. K., *J. Chem. Soc.* **1968**, 588-591.
[7] Nieminen, S.; Payne, T. G.; Senn, P.; Tamm, C., *Helv. Chem. Acta* **1981**, *64*, 2162-2174.
[8] Sulikowski, G. A.; Agnelli, F.; Spencer, P.; Koomen, J. M.; Russell, D. H., *Org. Lett.* **2002,** *4* (9), 1447-1450.
[9] Spencer, P.; Agnelli, F.; Sulikowski, G. A., *Org. Lett.* **2001**, *3* (10), 1443-1445.
[10] Chittori, S.; Savithri, H. S.; Murthy, M. R. N., *J. Struct. Biol.* **2011,** *174* (1), 58-68.
[11] Brock, M.; Maerker, C.; Schutz, A.; Volker, U.; Buckel, W., *Eur. J. Biochem.* **2002,** *269* (24), 6184-6194.
[12] a) Turner, W. B.; Aldridge, D. C., *Fungal Metabolite II* **1983**, 367-383.; b) Mahlen, A.; Gatenbeck, S., *Acta Chem. Scand.* **1968**, *22* (8), 2617-2623.
[13] Matsu, Y.; Fujii, R.; Minami, A.; Oikawa, H., unpublished results
[14] Kasahara, K.; Fujii, I.; Oikawa, H.; Ebizuka, Y., *Chembiochem* **2006,** *7* (6), 920-924.
[15] al Fahad, A.; Abood, A.; Fisch, K. M.; Osipow, A.; Davison, J.; Avramovic, M.; Butts, C. P.; Piel, J.; Simpson, T. J.; Cox, R. J., *Chem. Sci.* **2014,** *5* (2), 523-527.
[16] Aldridge, D. C.; Carman, R. M.; Moore, R. B., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1980**, 2134-2135.
[17] Adlington, R. M.; Baldwin, J. E.; Cox, R. J.; Pritchard, G. J., *Synlett* **2002,** (5), 820-822.
[18] Frisvad, J. C.; Filtenborg, O.; Samson, R. A.; Stolk, A. C., *Anton. Leeuw. Int. J. G.* **1990,** *57* (3), 179-189.
[19] Mahlen, A., *Eur. J. Biochem.* **1973**, *38*, 32-39.
[20] Mahlen, A., *Eur. J. Biochem.* **1971**, *22*, 104-114.
[21] Horswill, A. R.; Escalante-Semerena, J. C., *Biochemistry* **2001,** *40* (15), 4703-4713.
[22] Almassi, F.; Ghisalberti, E. L.; Rowland, C. Y., *J. Nat. Prod.* **1994,** *57* (6), 833-836.
[23] Weidenmu.Hl; Cavagna, F.; Prave, P.; Fehlhabe.Hw, *Tetrahedron Letters* **1972,** (33), 3519-
[24] Rizzacasa, M. A.; Sturgess, D., *Org. Biomol. Chem.* **2014,** *12* (9), 1367-1382.
[25] Saruwatari, T.; Yagishita, F.; Mino, T.; Noguchi, H.; Hotta, K.; Watanabe, K., *Chembiochem* **2014,** *15* (5), 656-659.
[26] Davin, L. B.; Wang, H. B.; Crowell, A. L.; Bedgar, D. L.; Martin, D. M.; Sarkanen, S.; Lewis, N. G., *Science* **1997,** *275* (5298), 362-366.

4章　Experimental section

4-1. Strains and culture condition

Phoma betae PS-13 and *Alternaria solani* ASP-2 were obtained from the Hokkaido National Agricultural Experimental Station, Sapporo. *P. betae*, *A. solani*, *Aspergillus clavatus* NRRL1, *Phoma* sp. (ATCC74256), *Talaromyces stipitatus* NBRC9186, and *Aspergillus niger* ATCC1015 were cultivated in potato-glucose medium (200 g/L potate broth, 20 g/L of glucose) at 30 ℃ for extraction of genomic DNA. *E. coli* HST08 and DH5α were cultivated in Luria-Bertani (LB) medium for routine cloning and sequencing, while *E. coli* BL21-Gold (DE3) was utilized for expression of recombinated proteins. *Aspergillus oryzae* NSAR1 (*ΔArgB*, *sC*$^{-}$, *niaD*$^{-}$, *AdeA*$^{-}$) was cultivated in DPY medium (20 g/L of dexstrin monohydrate, 10 g/L of polypeptone, 5 g/L of yeast extract, and appropriate nutrients), MPY medium (30 g/L of maltose, 10 g/L of polypeptone, 5 g/L of yeast extract, and appropriate nutrients), and rice medium (20-100 g porished rice, 0.1 g/kg of adenine) for transformation, detection of metabolites, and structure determination of new compounds, respectively. The appropriate nutrients: 0.6 g/L of arginine, 1.5 g/L of methionine, 9.25 g/L of ammonium sulfate, and 0.1 g/L of adenine were added to incubate the corresponding auxotrophic mutant.

4-2. Preparation of genomic DNA (gDNA) and complementary DNA (cDNA)

For extraction of gDNA each fungi was cultivated in PG medium for 1-3 weeks. In the case of *A. oryzae* transformants, they were cultivated in MPY medium for 4-7 days. The dried mycelia was frozen in liquid nitrogen and crushed by SK-mill (Tokken). To the frozen powder was added extraction buffer (400 mM of Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM of NaCl, 20 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1% of sodium dodecyl sulfate) and the suspension was kept at room temperature for 5 min. To the suspension was added phenol:chloroform solution and the mixture was vortexed for 2 sec. After incubation at 65 °C for 60 min, the reaction mixture was centrifuged at 12000 rpm for 5 min. The supernatant was then treated with RNase at 37 °C for 90 min. To the reaction mixture was then added phenol:chloroform solution. After being vortexed for 2 sec, the mixture was centrifuged at 12000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to a new centrifuge tube and re-extracted twice with phenol:chloroform solution followed by chloroform. To the final supernatant was added cold-isopropanol

and CH_3COONa solution and genomic DNA was recovered by centrifugation at 12000 rpm for 15 min. The pellet was then washed with 70% ethanol solution and dried for 15 min. Finally, the isolated DNA was resuspended in water and stored at -20 °C for further use.

For extraction of total RNA, *A. oryzae* transformants were cultivated in MPY medium for 4-7 days. The dried mycelia was frozen in liquid nitrogen and crushed by SK-mill (Tokken). To the frozen powder was added TRIzol reagent (Life technology) and the suspension was kept at room temperature for 3 min. The mixture was centrifuged at 13000 rpm for 5 min. To the supernatant was then added chloroform. After being vortexed for 2 sec, the mixture was centrifuged at 13000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to a new centrifuge tube and re-extracted twice with phenol:chloroform solution followed by chloroform. To the final supernatant was added cold-isopropanol and CH_3COONa solution and total RNA was recovered by centrifugation at 13000 rpm for 15 min. The pellet was then washed with 70% ethanol solution and dried for 7 min. The total RNA was resuspended in RNase free water. Finally, cDNAs were preparated with PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa) using 5 μg of total RNA as a template according to the manufacture's protocol.

4-3. Cloning

PCR amprification was carried out using either KOD-plus polymerase or KOD-plus-neo polymerase with genomic DNA as a template. Oligonucleotide primers were purchased from Hokkaido System Science Co., Ltd. DNA sequencing was performed either at FASMAC Co., Ltd. or by an automated DNA sequencer PRISM-3100 (ABI).

4-3-1. Construction of expression plasmids of aphidicolin biosynthetic genes

The *PbGGS*, *PbP450-1*, and *PbP450-2* genes were amplified from *P. betae* PS-13 genomic DNA with the primer sets shown in Table 4-1. *PbACS* gene was amplified from a plasmid *PbACS*/pGEX4T-3 prepared previously. The amplified DNA fragments were digested with the corresponding restriction enzymes, and the digested DNA products was inserted into the corresponding sites of the expression vectors to create the *PbACS*/pTAex3, *PbP450-2*/pUSA and *PbGGS*/pTAex3. In the case of *PbGGS* gene, the second PCR product containing *PbGGS* with α-amylase promoter/terminator was

obtained by amplification with the primers from the resultant plasmid *PbGGS*/pTAex3. The amplified DNA fragments were inserted into the corresponding sites of the expression vector pPTRI to obtain the PamyB-*PbGGS*-TamyB/pPTRI in a similar manner shown above. *PbP450-1*/pTAex3 and PamyB-*Pb450-1*-TamyB/pAdeA were constructed by using an In-Fusion® Advantege Advantage PCR cloning Kit (Clontech Laboratories, Inc.) to insert the first and the second PCR products into pTAex3 and pAdeA that had been respectively digested with *Sma*I and *Pst*I.

4-3-2. Construction of expression plasmids of solanapyrone biosynthetic genes

Two plasmids, sol1/pTAex3 and sol5/pTAex3, were kindly gifted by Prof. Fujii (Iwate medical university)[1].

In the follow experiments, In-Fusion method was used to insert of PCR products into corresponding vectors.

The *sol2* gene was amplified from *A. solani* ASP-2 genomic DNA with the primer sets as shown in Table 4-1. The *sol2* gene was inserted into the *Sma*I-digested pTAex3 or *Nhe*I-digested pUSA2 to obtain *sol2*/pTAex3 or *sol2*/pUSA2. To construct *sol2*/pPTRI, the *sol2* gene flanked by PamyB and TamyB was amplified from *sol2*/pTAex3. The purified PCR product was inserted into the *Hin*dIII-digested pPTRI.

The *sol6* gene was amplified from genomic DNA with two sets of primer as shown in Table 4-1. The *sol6*-1 gene was inserted into *Sma*I-digested pUSA to obtain *sol6*/pUSA. The *sol6*-2 gene was inserted into *Kpn*I-digested pUSA2 and *Kpn*I-digested *sol2*/pUSA2 to obtain *sol6*/pUSA2 and *sol2*+*6*/pUSA2.

PamyB-*sol5*-TamyB was amplified from a plasmid *sol5*/pTAex3 and inserted into *Pst*I-digested pAdeA to obtain *sol5*/pAdeA.

4-3-3. Construction of expression plasmids of cytochalasin E biosynthetic genes

The *ccsA* and *ccsC* genes were amplified from *A. clavatus* NRRL1 genomic DNA with primer sets as shown in Table 4-1. The *ccsC* was inserted into *Sma*I-digested pUSA to obtain *ccsC*/pUSA. In the case of *ccsA*, this gene was amplified in three parts (Fr1-3) because it is difficult to amplify the *ccsA* which is 12 kb length at once. Fr1 was inserted into pTAex3 digested with *Eco*RI and *Sma*I to obtain Fr1/pTAex3. Fr2 and Fr3 were inserted into the

resultant plasmid in a stepwise manner to afford *ccsA*/pTAex3. The *ccsF* gene was synthesized by Life technologies CO., Ltd. Purchased *ccsF*/pMAT was digested with *Eco*RI and resultant fragment was inserted into pAdeA to obtain *ccsF*/pAdeA.

4-3-4. Construction of expression plasmids of phomoidride B biosynthetic genes and silence genes in *T. stipitatus*

The *phiA*, *phiI*, *phiJ, tstA, tstJ and tstI* were amplified from *Phoma* sp. (ATCC74256) or *T. stipitatus* genomic DNA with primer sets as shown in Table 4-1. The *phiA* and *tstA* genes were separated into two fragments (Fr1 and Fr2) and each fragment was inserted into pTAex3 as follows; Fr1 was inserted into *Sma*I-digested pTAex3, and then Fr2 was inserted into the resultant plasmid to afford *phiA*/pTAex3 or *tstA*/pTAex3. The *phiI* and *tstJ* were inserted into *Nhe*I-digested pUSA2 to obtain *phiI*/pUSA2 or *tstJ*/pUSA2. Then, *phiJ* and *tstI* were inserted in *Kpn*I-digested *phiI*/pUSA2 or *Kpn*I-digested *tstJ*/pUSA2 to obtain *phiI*+*J*/pUSA2 or *tstJ*+I/pUSA2, respectively.

4-3-5. Construction of expression plasmids of asperanhydride biosynthetic genes

The *anhJ* and *anhI* genes were amplified from *A. niger* ATCC1015 genomic DNA with primer sets as shown in Table 4-1. The *anhI* was inserted into *Nhe*I-digested pUSA2 to obtain *anhI*/pUSA2. The *anhJ* was inserted into *Kpn*I-digested *anhI*/pUSA2 to obtain *anhI*+J/pUSA2.

4-3-6. Construction of plasmids of CS and MCD for *E. coli* expression system

The *tstJ* and *tstI* genes were amplified from synthesized genes and inserted into pColdI digested with *Nde*I to obtain *tstJ*/pColdI or *tstI*/pColdI. The *anhJ* and *anhI* genes were amplified from cDNA of the *A. oryzae anhJ* and *anhI* double transformant with primer sets in Table 4-1. These genes were inserted into *Nde*I-digested pColdI to obtain *anhJ*/pColdI and *anhI*/pColdI.

Primer	Sequence 5'-3'	Tm value (℃)	Product (size, vector)
ACS-fw-*Kpn*I	AGAGGTACCATGGTTCCAA TTTCGACTCG	63.4	ACS（2.7 kb, pTAex3）
ACS-rv-*Kpn*I	AAAGGTACCCTATTCCCCGT TCCGAAC	63.5	
GGS-fw-*Eco*RI	AAAGAATTCATGGCATATAC GGTCGAACCC	61.9	GGS（1.0 kb, pTAex3）
GGS-rv-*Kpn*I	CCCGGTACCTTACGACAGC CTAGTAATC	64.9	
P450-1-fw-InF	*AATTCGAGCTCGGTACCC*A TGTCACACTTTCTACC	66.4	P450-1 （1.7 kb, pTAex3）
P450-1-rv-InF	*AGCTACTACAGATCCCC*TCA TCGAACAACCGGC	68.0	
P450-2-fw-*Kpn*I	AAAGGTACCATGATCAAAC ACAGCCTTA	64.4	P450-2（1.7 kb, pUSA）
P450-2-rv-*Kpn*I	AAAGGTACCCTACAAAGCC TTGGCTAGC	63.4	
P_{amyB}-*Hin*dIII	GGGGGGGAAGCTTTTCATG GTGTTTTGATCATTTTAA	63.9	P_{amyB} / *XXXX* /T_{amyB} （X+1.3 kb, pPTRI）
T_{amyB}-*Hin*dIII	TTTTCCCAAGCTTTTCCGTT CCTTTGCTTTCTGC	64.2	
pPTRI-P_{amyB}-*Sma*I-InF	*GGTGGTCGACTCTAGAGGA TCCC*CTTCATGGTGTTTTGA	69.0	P_{amyB} / *XXXX* /T_{amyB} （X+1.3 kb, pPTRI）
pPTRI-T_{amyB}-*Sma*I-InF	*TCGAGCTCGGTACCC*TTCC GTTCCTTTGCTTTCTG	68.8	
AdeA-fw-InF	*GGGGATCCTCTAGAGTCGA CC*TTCATGGTGTTTTGA	67.4	P_{amyB}/*XXXX*/T_{amyB} （X+1.3 kb, pAdeA）
AdeA-rv-InF	*CCAAGCTTGCATGCC*TTCC GTTCCTTTGCT	66.0	
Sol2-fw-InF	*TCGAGCTCGGTACCC*ATGG CGCTAAAATCC	67.4	Sol2 （1.5 kb, pTAex3）
Sol2-rv-InF	*AGCTACTACAGATCCCC*TCA AATATTCAGATGAACCTCGA CTAGACCC	68.5	
Sol6-1-fw-InF	*TCGAGCTCGGTACCC*ATGT TTGTCCCTAGCAATATAGG	68.1	Sol6 （1.7 kb, pUSA）
Sol6-1-rv-InF	*GCTACTACAGATCCCC*TAAT CTTGCCACAAGCCTGCG	69.4	

Sol2-pUSA2-fw	*ATCGATTTGAGCTAG*ATGGCGCTAAAATCC	61.9	Sol2 (1.5 kb, pUSA2)
Sol2-pUSA2-rv	*TAGTGCGGCCGCTAG*TCAAATATTCAGATGAACC	65.4	
Sol6-2-pUSA2-fw	*CGGAATTCGAGCTCG*ATGTTTGTCCCTAGC	66.0	Sol6 (1.7 kb, pUSA2)
Sol6-2-pUSA2-rv	*ACTACAGATCCCCGG*CTAATCCGCCCTTTTC	67.2	
ccsA-fr1-fw	*GCAAGCTCCGGAATT*ATGGGGTCATTTCAGAACTCC	67.4	ccsA-fr1 (3.0 kb, pTAex3)
ccsA-fr1-rv	*CTACTACAGATCCCC*GGGCCCTCCAACCATGC	70.8	
ccsA-fr2-fw	*CATGGTTGGAGGGCC*ACCAGGTGCAAGG	69.3	ccsA-fr2 (4.1 kb, ccsA-fr1/pTAex3)
ccsA-fr2-rv	*TACTACAGATCCCCG*TGATCAAGAATTCCTGCTGCACC	68.1	
ccsA-fr3-fw	*ACTGAACTGGAATTC*TTTGTTTTCTTCTCCTCGATGGC	64.9	ccsA-fr3 (5.5 kb, ccsA-fr1+2/pTAex3)
ccsA-fr3-rv	*CCCGTGATCAAGAATT*CTAGAAAAAGCTCCCTTGC	65.3	
ccsC-fw	*CGGAATTGCAGCTCG*ATGACCGTACCAACC	67.4	ccsC (1.2 kb, pUSA)
ccsC-rv	*ACTACAGATCCCCGG*TTACATGCCGATGCT	66.0	
phiA-fr1-fw	*TCGAGCTCGGTACCC*ATGTCGCCTTTCATGG	68.5	phiA fr1 (3.7 kb, pTAex3)
phiA-fr1-rv	*CTACTACAGATCCCC*GGGCGCAGAGCGCAG	71.5	
phiA-fr2-fw	*CATCTGCGCTCTGCGCCCGG*	66.6	phiA fr2 (4.3 kb, phiA-fr1/pTAex3)
phiA-fr2-rv	*CTACTACAGATCCCC*CTAAGCATCCTCCCC	67.4	

phiI-fw	*ATCGATTTGAGCTAG*ATGCAAGAAGCCCAGGTTGATGTC	66.9	phiI (1.5 kb, pUSA2)
phiI-rv	*TAGTGCGGCCGCTAG*TCACAGCCTAGGG	69.3	
phiJ-fw	*CGGAATTCGAGCTCG*ATGGCCTTGTCGTCG	68.7	phiJ (1.5 kb, pUSA2)
phiJ-rv	*ACTACAGATCCCCGG*TCATAGCCTTGCCTG	67.4	
tstA-fr1-fw	*TCGAGCTCGGTACCC*ATGTCACCTCTTATTCACG	67.8	tstA fr1 (4.1 kb, pTAex3)
tstA-fr1-rv	*CTACTACAGATCCCC*GGGCTTAGAGGTAATATTGGCC	68.3	
tstA-fr2-fw	*ATTACCTCTAAGCCCGGTGACAAGCTCG*	64.9	tstA fr1 (4.1 kb, tstA-fr1/pTAex3)
tstA-fr2-rv	*CTACTACAGATCCCC*CTACTCATGCGTTTGC	65.8	
tstJ-pUSA2-fw	*ATCGATTTGAGCTAG*ATGTCAGACGGCACC	64.6	tstJ (1.5 kb, tstJ/pUSA2)
tstJ-pUSA2-rv	*TAGTGCGGCCGCTAG*TCACAATCTGGATTG	66.0	
tstI-pUSA2-fw	*CCGAATTCGAGCTCG*ATGACTGACGAGATACC	67.0	tstI (1.5 kb, tstJ/pUSA2)
tstI-pUSA2-rv	*ACTACAGATCCCCGG*TCATAGTTTTGCCATTCC	65.5	
tstJ-pColdI-fw	*TCGAAGGTAGGCAT*ATGAGTGATGGCACCC	66.0	tstJ (1.3 kb, pColdI)
tstJ-pColdI-rv	*GTACCGAGCTCCATA*TTACAGACGGCTCTGAATTTTCG	67.1	
tstI-pColdI-fw	*TCGAAGGTAGGCAT*ATGACCGATGAAATCC	63.3	tstI (1.5 kb, pColdI)
tstI-pColdI-rv	*GTACCGAGCTCCATA*TTACAGTTTTGCCATACC	64.3	

anhJ-pUSA2-fw	*CGGAATTCGAGCTCG*ATGCCCGACATCGCATCC	70.5	anhJ (1.6 kb, anhI/pUSA2)
anhJ-pUSA2-rv	*ACTACAGATCCCCGG*CTACGCCATCTCGCG	70.1	
anhI-pUSA2-fw	*ATCGATTTGAGCTAG*ATGACTGTCATTCCTGC	63.1	anhI (1.6 kb, pUSA2)
anhI-pUSA2-rv	*TAGTGCGGCCGCTAG*TTAGACATAAACATAAACC	64.2	
anhJ-pColdI-fw	*TCGAAGGTAGGCAT*ATGCCCGACATCGC	66.4	anhJ (1.3 kb, pColdI)
anhJ-pColdI-rv	*GTACCGAGCTCCATA*CTACGCCATCTCGCG	68.7	
anhI-pColdI-fw	*TCGAAGGTAGGCAT*ATGACTGTCATTCC	62.0	anhI (1.5 kb, pColdI)
anhI-pColdI-rv	*GTACCGAGCTCCATA*TTAGACATAAACATAAACC	61.8	

Table 4-1. Primer sets used in each experiment. Under bar meant restriction site. Gray boxes showed the homologous sequence of vector.

4-4. Fungal transformation

A spore suspension of *A. oryzae* NSAR1 or transformants were inoculated into 100 ml DPY medium or CD medium supplemented with appropriate nutrients. After 3 days incubation at 30 °C and 200 rpm, mycelia were collected by filtration through glass filter and washed with sterile water. Protoplasting was performed using Yatalase (TaKaRa: 5 mg/mL) in solution 1 (0.8 M NaCl, 10 mM NaH_2PO_4, pH 6.0) with gentle shaking at 30 °C for 2 h. Protoplasts were filtered through Miracloth (Calbiochem) and centrifuged at 2000 rpm for 5 min. Then, protoplasts were washed with 0.8 M NaCl solution and adjusted to 2.0-2.5 x 10^8 cells/mL by adding solution 2 (0.8 M NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) and solution 3 (40% PEG4000, 50 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5) in 4/1 volume ratio. Plasmids (12 μg) were added to the protoplast solution (200 μL). The protoplasts were incubated on ice for 20 min. To this aliquot was added solution 3 (1 mL) and incubated at room temperature for 20 min. To the mixture was added 10 mL of solution 2 and the mixture was centrifuged at 2000 rpm (Beckman JLA 10.500) for 5

min. The transformation suspension was poured onto a CD agar plate supplemented with 0.8 M of NaCl and appropriate nutrients and then overlaid with soft-top agar (1.2 M sorbitol, 3.5% of Czapek-Dox, 0.6% of agar). The plate was incubated at 30 °C for 3-7 days.

4-5. Production and analysis of the metabolites

4-5-1. aphidicolin and its intermediates

A spore suspension of *A. oryzae* transformants was inoculated to CMP medium (100 ml) in 500 ml Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30 °C for 7 days while shaking at 200 rpm. The mycelia were collected by filtration through Miracloth and disrupted with a Polytron homogenizer (Kinematica) in acetone. The mycelial extract was filtered and concentrated to obtain an aqueous residue which was extracted with ethyl acetate (2 x 100 ml). The combined organic layers were washed with brine, dried over $MgSO_4$, and concentrated. Preparative thin layer chromatography ($CHCl_3$:CH_3OH = 9:1) yielded partially purified metabolites. The production yield of each expected metabolite was preliminarily estimated by a TLC analysis of the cultures extracts of all transformants, and a quantitative analysis of the best transformant was then performed.

Alternatively, a spore suspension of the *A. oryzae* transformants was inoculated into a solid medium containing polished rice (100 g, presoaked with 10 mL of water overnight) in 500 mL Erlenmeyer flask which was autoclaved before use. Each culture was incubated at 30 °C for 5 weeks and then directly extracted with EtOAc. Partially purified metabolites were obtained in a similar manner to that with the liquid medium.

Partially purified samples of **2** were analyzed with GC-MS, whereas those of **1** and **3** were analyzed with LC-MS under the condition described below. Polar metabolites **1** and **3** were converted for quantitative analyses into the corresponding trimethylsilyl ethers with N,O-bis(trimethylsilyl)acetamide (TCI) at 78 °C for 3 h. Compound **2** and the corresponding trimethylsilyl ethers of **1** and **3** were quantified by peak integration from GC-MS. A plot of integral values for peak area against the respective concentrations generated a linear standard curve for each compound among the concentrations examined (5-100 μg/mL).

LC-MS analysis was performed using the Agilent 1100 system with a Zorbax Eclipse XDB-C18 column (2.1 x 50 mm, particle size 5 μm; Agilent)

and AccuTOF LC-plus JMS-T100LP (JEOL) with an electrospray ionization (ESI) source in the positive mode. LC analytical conditions were as follows: 0–19 min, linear gradient 20–80% CH_3CN/0.1% formic acid in H_2O/0.1% formic acid and then 19–24 min, 80% the same solvent system at a flow rate 0.2 mL/min. GC-MS analysis was conducted using a GC-MS QP2010 apparatus (Shimazu) with a DB-1MS capillary column (0.32 mm x 30 m, 0.25 μm film thickness; J&W Scientific). Each sample was injected onto the column at 100 °C in the splitless mode. After a 3 min isothermal hold at 100 °C, the column temperature was increased by 16 °C/min to 250 °C with 3 min isothermal hold at 250 °C. The flow rate of the helium carrier gas was 1 mL/min.

4-5-2. Solanapyrone C, its intermediates, and CcsA+C product

A spore suspension of *A. oryzae* transformants was inoculated to MPY medium (100 mL) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Cultures were incubated at 30 °C for 7 days while shaking at 200 rpm. The mycelia were collected by filtration through cotton filter and disrupted by a Polytron homogenizer (Kinematica) in acetone. The mycelial extracts were filtered and concentrated in vacuo. The residues were extracted with ethyl acetate (2 x 100 ml). The crude extracts (10 mg/mL in acetonitlile) were directly analyzed by HPLC (SHIMADZU Class VP system) equipped with Wakopak navi C18-5 column (4.6 x 250 mm for analysis and 10 x 250 mm for preparation, 5 μm particular size) or HPLC (Water ACQUITY ™ UPLC H-Class system) equipped with ACQUITY ™ UPLC BEH C18 column (2.1 x 50 mm, 1.7 μm particular size).

HPLC conditions to analyze metabolites from *sol1* transformants;
20% CH_3CN in H_2O for 2 min, a linear gradient from 20 to 100% of CH_3CN in H_2O over 8 min, and 100% CH_3CN for 15 min at a flow rate of 1 mL/min; detection at 325 nm.

HPLC conditions to analyze metabolites from *sol1*+*sol2* transformants;
10% CH_3CN in H_2O for 2 min, a linear gradient from 10 to 100% of CH_3CN in H_2O over 18 min, and 100% CH_3CN for 5 min at flow rate of 1 mL/min; detection at 325 nm.

HPLC conditions to analyze metabolites from other transformants;
A linear gradient from 20 to 90% of CH_3CN in H_2O over 5 min, and 90% CH_3CN for 5 min at flow rate of 0.5 mL/min; detection at 325 nm or 270 nm.

HPLC (Gilson HPLC system) conditions to purify metabolites from transformants; A linear gradient from 20 to 100% of CH_3CN in H_2O over 15 min, and 100% CH_3CN for 10 min; flow rate of 3 mL/min; detection at 325 nm or 270 nm.

4-5-3. phomoidride

Mycelium of *Phoma sp.* (ATCC74256) was inoculated into PG agar medium. After 7 days incubation at 30 ℃, mycelium was collected and inoculated into 200 mL of seed medium (40 g/L of tomato paste, 5 g/L of corn steep liquor, 10 g/L of D-glucose, 10 g/L of oat flour and mineral mixture composed of 1 g/L of $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g/L of $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 0.025 g/L of $CuCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.1 g/L of $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.056 g/L of H_3BO_3, 0.019 g/L of $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ and 0.2 g/L of $ZnSO_4$, adjusted to pH 7.0 before autoclaving). After 6 days incubation at 120 rpm and 20 ℃, 5 mL of this seed culture was transferred into 500 mL flask containing 200 mL of PG medium (pH 7.0). After 3 days, the pH of culture medium was adjusted to 3.1 and the culture was incubated at 120 rpm and 20 ℃ for further 3 days.

Filtration of the culture afforded 10 g (wet weight) of fungal mass. After the wet mass was extracted with 50 mL of acetone, the mycelial extract was filtered and concentrated in vacuo. To the residue was added 1 M HCl to adjust the pH to 1.0. The mixture was diluted with 20 ml of water and extracted three times with 30 mL of ethyl acetate. The organic extracts were combined and concentrated in vacuo to give a crude extract (127 mg). The crude extract (10 mg/mL in 20% THF in acetonitrile) was filtered and analyzed by HPLC equipped with ACQUITY ™ UPLC BEH C18 column (2.1 x 50 mm, 1.7 μm particular size) at following condition. HPLC analytical conditions were a linear 20-90% gradient of CH_3CN in H_2O over 5 min, and 90% CH_3CN for 5 min; flow rate of 0.5 mL/min; detection at 242 nm.

The remaining was purified by HPLC equipped Wakopak Navi C18-5 column (10 x 250 mm for preparation, 5 μm particular size). HPLC preparative conditions were as follows; a linear 20-100% gradient of CH_3CN in H_2O over 15 min, and 100% CH_3CN for 10 min, flow rate of 3 mL/min, detection at 242 nm.

The isolated compound was recorded its molecular weight by AccuTOF LC-plus JMS-T100LP (JEOL) with an electrospray ionization (ESI) source in the positive mode.

4-5-4. decarboxylated phomoidride type monomer

A spore of *A. oryzae* transformants was inoculated to 20 g of rice medium in 50 mL glass petri dish. Each culture was incubated at 30 °C for 7 days. The mycelia were soaked in 30 mL of EtOAc for 3 h. The supernatants (5 mL) were filtrated through cotton filter and concentrated with air. Then, the extracts were dissolved in 1 mL of CH_3CN or MeOH and analyzed by HPLC equipped with ACQUITY ™ UPLC BEH C18 column (2.1 x 50 mm, 1.7 μm particular size) at following condition.

HPLC conditions to analyze the metabolites from transformants; A linear gradient from 20 to 90% of CH_3CN with 0.1% TFA in H_2O with 0.1% TFA over 5 min, and 90% CH_3CN with 0.1% TFA for 5 min; flow rate of 0.5 mL/min; detection at 312 nm.

HPLC (Gilson HPLC system) conditions to purify metabolites from transformants; A linear gradient from 20 to 100% of CH_3CN in H_2O over 15 min, and 100% CH_3CN for 10 min; flow rate of 3 mL/min; detection at 312 nm.

4-6. Overexpression and purification of CS and MCD

Constructed expression plasmids were separately introduced into *E. coli* BL21-Gold (DE3) for overexpression. The transformant was grown at 37 ℃ at an OD_{600} of ~0.6 in 500 mL flask. After cooling at 4 ℃, isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (0.1 mM) was added to the culture. After incubation at 16 ℃ for 20 h, the cells were harvested by centrifugation at 5000 rpm. Harvested cells were resuspended in disruption buffer (50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 200 mM NaCl, 20% w/w glycerol) and disrupted by sonication. The lysate was clarified by ultracentrifugation at 20,000 x g for 25 min. The supernatant was incubated with 2 mL of Ni-NTA-agarose resin (Qiagen) at 4 ℃ for 1 h in a column. The resin was then washed with a buffer (10 mL) containing 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 200 mM NaCl, 20% w/w glycerol, and 10 mM imidazole. His_6-tagged proteins were eluted with 200 mM imidazole in 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 200 mM NaCl, 20% w/w glycerol. Fractions containing desired proteins were pooled and concentrated using Amicon Ultra centrifugal filter device (Millipore). The protein was buffer-exchanged by gel filtration chromatography using a PD-10 column (GE Biosciences) with a buffer containing 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 200 mM NaCl, and 20% w/w glycerol. Fractions containing desired proteins were

pooled and further concentrated using Amicon Ultra centrifugal filter device. The protein concentration was determined by Bradford assay. Proteins were aliquot-flash-frozen in liquid nitrogen and stored -80 ℃ for further usages. Each average of overproduction yield was ca. 8.1 mg/mL for TstJ, 9.4 mg/mL for TstI, 3.1 mg/mL for AnhJ, and 17.4 mg/mL for AnhI.

4-7. CS and MCD assays

Typical conditions are as follows; a reaction mixture (100 μL of 50 mM NaH_2PO_4 (pH 7.5), 200 mM NaCl, 20% w/w glycerol) containing 20 μM of CS and/or MCD, 1.2 mM of the substrate, and 1.2 mM of oxaloacetic acid was incubated at 30 ℃. The reaction was quenched by the addition of methanol (100 μL) and the resultant mixture was vortexed and centrifuged at 12,000 x g. The supernatant was directly analyzed by HPLC (SHIMADZU Class VP system) equipped with Wakopak navi C18-5 column (4.6 x 250 mm, 5 μm particular size) or HPLC (Water ACQUITY ™ UPLC H-Class system) equipped with ACQUITY ™ UPLC BEH C18 column (2.1 x 50 mm, 1.7 μm particular size).

HPLC conditions to analyze the supernatant from reaction mixture containing CoA ester of saturated fatty acid as a substrate; 20% CH_3CN with 0.1% TFA in H_2O with 0.1% TFA for 5 min, a linear gradient from 20 to 90% of CH_3CN with 0.1% TFA in H_2O with 0.1% TFA over 30 min, and 90% CH_3CN with 0.1% TFA for 5 min; flow rate of 1.0 mL/min; detection at 260 nm.

HPLC conditions to analyze the supernatant from reaction mixture containing CoA ester of unsaturated fatty acid as a substrate; A linear gradient from 20 to 90% of CH_3CN with 0.1% TFA in H_2O with 0.1% TFA over 5 min, and 90% CH_3CN with 0.1% TFA for 5 min; flow rate of 0.5 mL/min; detection at 260 nm.

4-8. Substrate synthesis

All solvents and chemicals were purchased from Wako Chemicals unless otherwise state. Column chromatography was performed with a silica gel 60N (40-50 μm, Kanto Chemical Co., Ltd.).

4-8-1. α,β-unsaturated carboxylic acid[2]

To a solution of (carbethoxymethylene)triphenylphosphorane (4.05 g, 11.7

mmol) in toluene (21 mL) was added octanal (1.36 g, 10.6 mmol). After stirred at 120 ℃ for 3 h, the cooled yellow mixture was concentrated in vacuo and diluted in hexane. This mixture was filtrated with celite and flash silicagel using 50% Et_2O in hexane. The solvents were removed in vacuo to afford a crude ethyl deca-2-enoate (2.06 g).

To a solution of this clude in 45 ml of H_2O: THF: MeOH = 1:1:1 solvent was added 1.3 g of LiOH-H_2O. After stirred at 100 ℃ for overnight, the cooled yellow mixture was concentrated in vacuo. To the residue was added 1 N HCl to adjust the pH to 1.0. Then the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). The combined organic layers were washed with water (2 x 50 mL) and saturated brine (30 mL). After dried over Na_2SO_4 and concentrated in vacuo to afford 2-decenoic acid (1.5 g, 83%, 2 steps, E/Z = 20).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) of 2-decenoic acid: δ_H 11.8 (br s, OH), 7.08 (dt, J= 15.5, 7.0 Hz, 1H), 5.82 (q, J= 15.5 Hz, 1H), 2.24 (q, J= 7.0 Hz, 2H), 1.49 (qu, J= 7.0 Hz, 2H), 1.31 (m, 10H), 0.90 (t, J= 7.0 Hz, 3H)

4-8-2. ethylcarbonate anhydride[3]

To a solution of 2-decenoic acid (256 mg, 1.5 mmol) in dried CH_2Cl_2 (20 mL) was added triethylamine (240 μL, 1.7 mmol). After stirred under N_2 atomosphare at room temperature for 30 min, ethyl chloroformate (400 μL, 3.8 mmol) added to the mixture. After stirred at room temperature for 2.5 h, the reaction mixture was concentrated in vacuo to afford a crude sample (748 mg).

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) of dec-2-enoic (ethyl carbonic) anhydride: δ_H 7.18 (dt, J= 15.6, 7.0 Hz, 1H), 5. 84 (dt, J= 15.6, 1.5 Hz, 1H), 4.34 (q, J= 7.1 Hz, 2H), 2.26 (qd, J= 7.6, 1.5 Hz, 2H), 1.48 (m, 3H), 1.42 (m, 10H), 1.38 (t, J= 7.1 Hz, 3H)

4-8-3. CoA ester[2]

To a solution of CoA trisodium salt (27.5 mg, 33 μmol) in 500 μL of 0.4 M $NaHPO_4$ buffer was added the activated ester (50.6 mg in crude) in 500 μL of tBuOH. After stirred at room temperature for 20 h, the reaction mixture was directly purified by a HPLC (Gilson HPLC system) equipped with Wakopak navi C18-5 column (10 x 250 mm for preparation, 5 μm particular size). HPLC preparative conditions were a linear 20-100% gradient of CH_3CN with 0.1% TFA in H_2O with 0.1% TFA over 15 min, and 100% CH_3CN with 0.1%

TFA for 10 min; flow rate of 3 mL/min; detection at 300 nm. The decenoyl-CoA was yielded 11.7 mg, 12.7 μmol, 38.5%.

4-9. Structure determination

Optical rotations were recorded on a JASCO P-2200 digital polarimeter. NMR spectra were recorded on a Bruker AMX-500 and DRX-500 spectrometers. Chemical shifts were reported in ppm with the solvent resonance resulting from incomplete deuteration as the internal standard ($CDCl_3$ δ7.26, CD_3OD δ3.31). Data were reported as follows; chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, qu = quintet, br = broad, m = multiplet), coupling constants (Hz), and integration. Molecular weights were recorded on a Jeol AccuTOF LC-plus JMS-T100LP instrument and an electrospray ionization (ESI) source in the positive mode.

4-9-1. desmethylprosolanapyrone I

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.59 (dt, J = 16, 7.1 Hz, 1H), 5.90-6.01 (m, 1H), 5.81-6.01 (m, 2H), 5.80 (s, 1H), 5.52 (m, 1H), 5.50 (m, 1H), 2.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 2.02 (q, J = 6.5 Hz, 2H), 1.89 (s, 3H), 1.69 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 1.39 (m, 2H), 1.38 (m, 2H)

4-9-2. prosolanapyrone I 15,16-diol

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.70 (m, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.97 (m, 1H), 5.74 (dt, J = 16, 6.9 Hz, 1H), 5.53 (dd, J = 16, 7.0 Hz, 1H), 4.01 (dd, J = 7.0, 4.0 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.85 (m, 2H), 2.23 (dt, J = 13, 6.8 Hz, 2H), 2.09-2.38 (m, 2H), 1.93 (s, 3H), 1.46-1.67 (m, 2H), 1.46-1.54 (m, 2H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C 157.4, 157.2, 139.3, 138.6, 134.8, 128.0, 122.1, 121.9, 94.3, 76.5, 70.1, 56.2, 32.5, 32.0, 28.5, 28.0, 17.7, 8.73

ESI-HR-MS: calcd for $C_{18}H_{27}O_5$ $[M+H]^+$ 323.1853, found 323.1821

$[\alpha]_D^{24.2}$ -7.4° (c 0.32, $CHCl_3$)

4-9-3. prosolanapyrone II

^1H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 6.70 (dt, J = 15, 7.0 Hz, 1H), 5.95-6.05 (m, 2H), 5.98 (s, 1H), 5.97 (m, 1H), 5.59 (dd, J = 14, 7.0 Hz, 1H), 5.53 (dd, J = 14, 7.0 Hz, 1H), 4.55 (brs, 3H), 3.90 (s, 3H), 2.23 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.07 (dd, J = 15, 7.5 Hz, 2H), 1.73 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 1.46-1.67 (m, 2H), 1.46-1.54 (m, 2H)

4-9-4. solanapyrone C

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 10.8 (brs, 1H), 9.99 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 5.65 (ddd, *J* = 9.8, 5.0, 2.6 Hz, 1H), 5.43 (dt, *J* = 9.8, 1.5 Hz, 1H), 3.89 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.53 (q, *J* = 5.2 Hz, 2H), 2.60 (m, 1H), 2.35 (dd, *J* = 12, 10 Hz, 1H), 2.29 (m, 1H), 2.13 (m, 1H), 1.70 (m, 2H), 1.46 (m, 2H), 1.15-1.22 (m, 2H) 1.07-1.13 (m, 2H), 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H)

4-9-5. reduced product **13**

^{1}H NMR (500 MHz, C_6D_6) δ_H 7.27 (m, 2H), 7.26 (m, 2H), 7.20 (m, 1H), 6.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.32 (m, 1H), 6.31 (m, 1H), 6.22 (dd, *J* = 14.6, 7.0 Hz, 1H), 5.68 (dt, *J* = 14.6, 6.3 Hz, 1H), 5.52 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.23 (m, 1H), 3.47 (dd, *J* = 10.9, 3.8 Hz, 1H), 3.37 (dd, *J* = 10.9, 5.3 Hz, 1H), 2.85 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 2.78 (d, *J* = 16.7 Hz, 1H), 2.70 (d, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.07 (dd, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H), 1.96 (dd *J* = 13.8, 7.3 Hz, 1H), 1.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.70 (s, 3H), 1.68 (m, 1H), 1.58 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.42 (m, 1H), 1.29 (m, 1H), 1.21 (m, 1H), 1.17 (m, 1H), 1.08 (m, 1H), 0.85 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.69 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, C_6D_6) δ_C 207.5, 167.2, 139.6, 137.5, 136.3, 134.3, 133.2, 130.8, 129.9, 129.7, 127.9, 65.5, 54.8, 50.2, 45.5, 42.7, 42.4, 38.4, 32.3, 32.1, 31.0, 20.7, 20.4, 15.1, 13.3

ESI-HR-MS: calcd for $C_{28}H_{42}NO_3$ $[M+H]^+$: 440.3165; found 440.3147.

$[\alpha]_D^{24.2}$ +6.2° (c 0.01, $CHCl_3$)

4-9-6. allyl alcohol **14**

^{1}H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H 7.37 (m, 1H), 7.28 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.26 (d, *J* = 6.5 Hz, 2H), 7.12 (m, 1H), 6.28 (dd, *J* = 15.5, 9.6 Hz, 1H), 6.18 (d, *J* = 15.5 Hz, 1H), 6.10 (dd, *J* = 15.5, 9.6 Hz, 1H), 5.74 (dd, *J* = 15.5, 6.3 Hz, 1H), 5.61 (t, *J* = 6.4 Hz, 1H), 4.23 (d, *J* = 6.4 Hz, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.55 (m, 2H), 3.32 (m, 2H), 2.95 (dd, *J* = 14.0, 6.5 Hz, 1H), 2.75 (dd, *J* = 14.0, 8.4 Hz, 1H), 2.45 (m, 2H), 2.08 (dd, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H), 1.96 (dd, *J* = 13.8, 6.3 Hz, 1H), 1.81 (s, 3H), 1.62 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.31 (m, 1H), 1.11 (m, 2H), 0.86 (m, 3H), 0.84 (m, 3H); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C 207.1, 169.1, 139.9, 136.0, 134.5, 133.5, 131.3, 130.5, 129.9, 129.6, 127.5, 64.2, 59.6, 54.5, 48.6, 45.5, 42.3, 41.4, 38.1, 32.3, 32.0, 31.0, 20.0, 19.8, 12.7

ESI-HR-MS: calcd for $C_{28}H_{42}NO_4$ $[M+H]^+$: 456.3114; found 456.3161.

$[\alpha]_D^{24.5}$ +1.0° (c 0.007, MeOH)

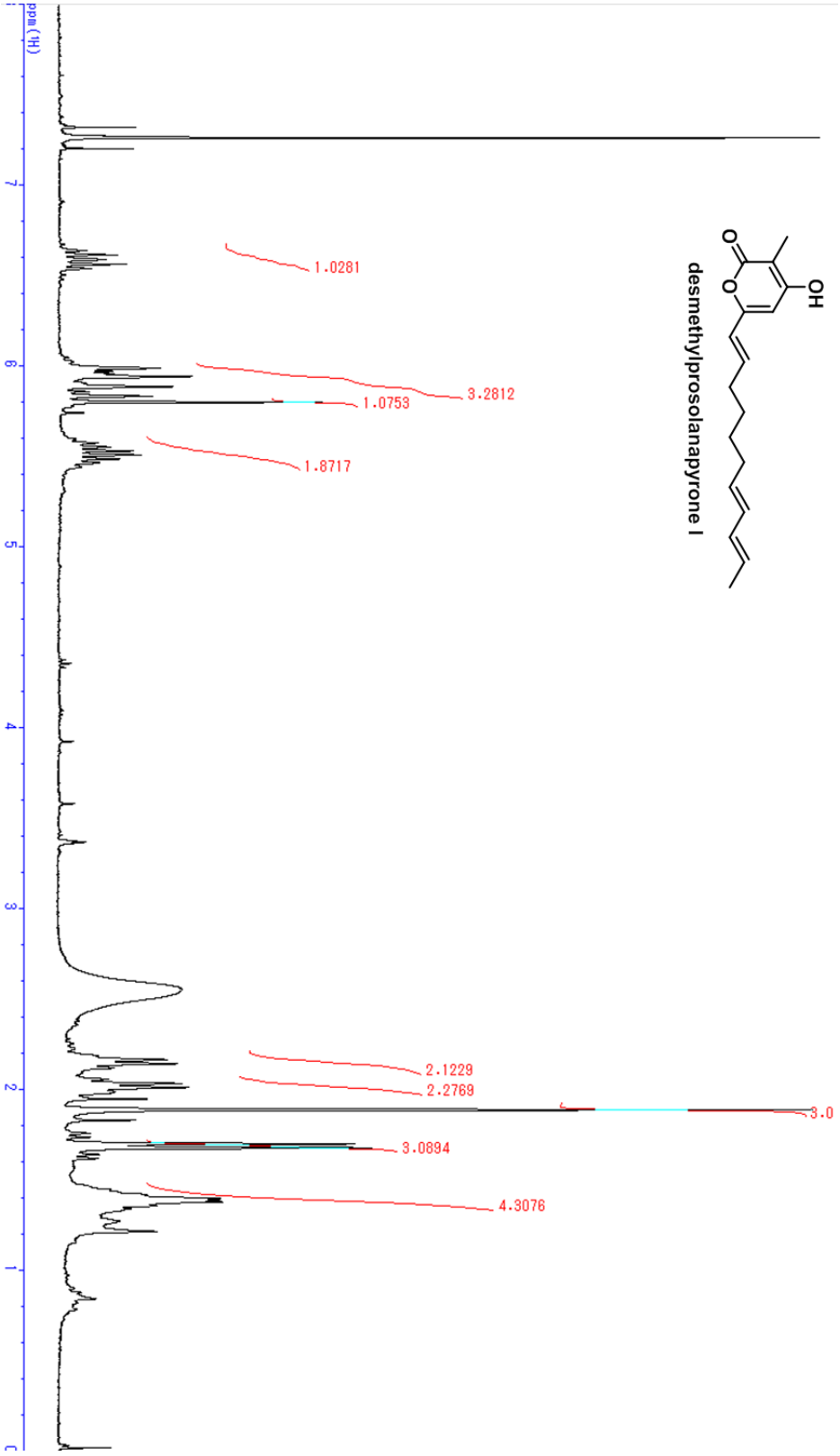
4-9-7. decarboxylated phomoidride type monomer **15**

^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ_H 7.12 (dt, J = 16, 7.5 Hz, 1H), 6.23 (d, J = 16Hz, 1H), 5.41 (m, 2H), 2.28 (q, J = 7.5 Hz, 2H), 2.11 (s, 3H), 1.95 (m, 2H), 1.64 (dd, J = 3.0, 1.0 Hz, 3H), 1.49 (qu, J = 7.5 Hz, 2H), 1.35 (m, 4H); ^{13}C NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ_C 166.6, 164.7, 148.1, 137.3, 135.0, 131.4, 125.0, 117.2, 34.5, 32.5, 29.4, 28.8, 28.4, 18.0, 9.39

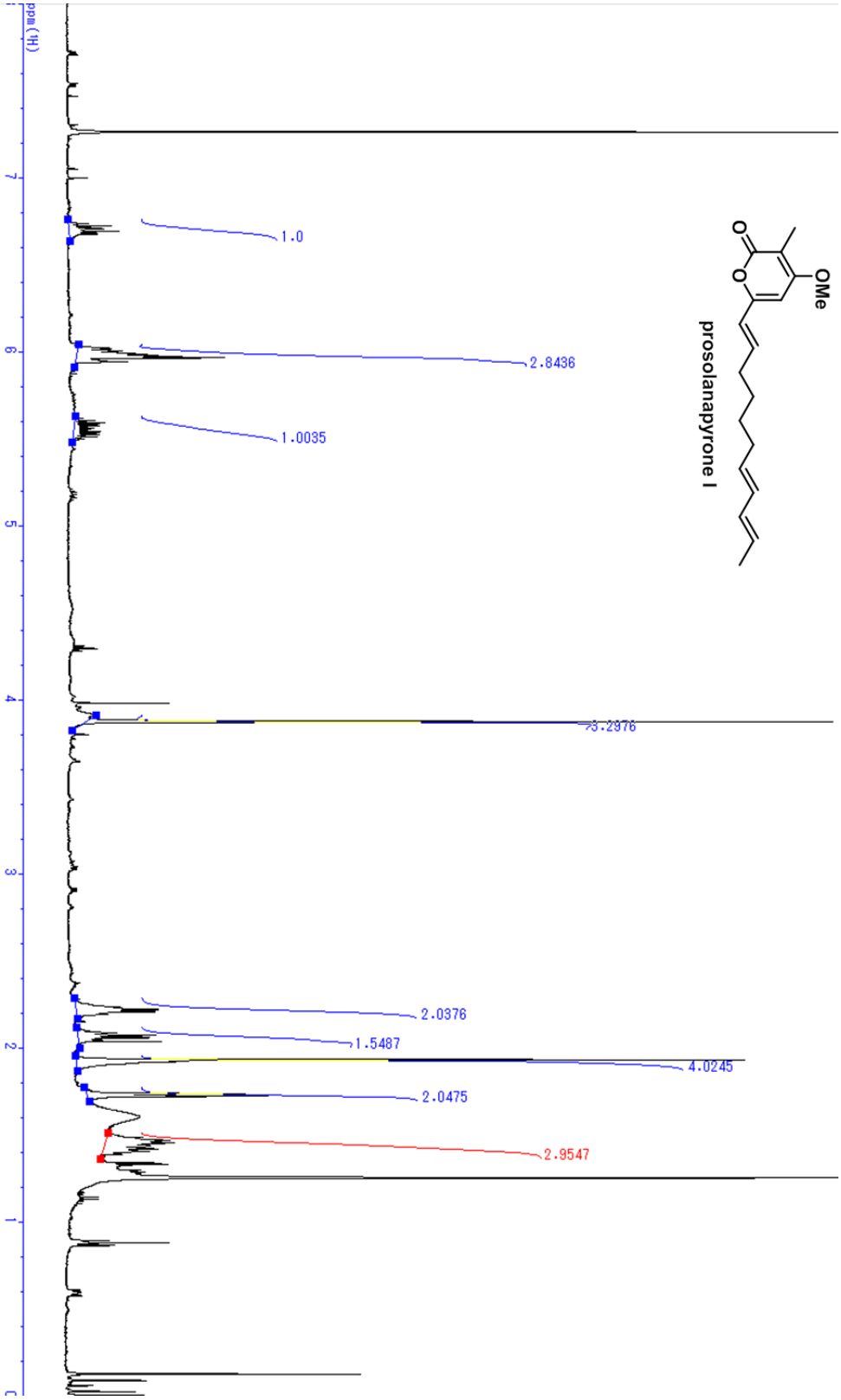
ESI-HR-MS: calcd for $C_{15}H_{21}O_3$ $[M+H]^+$: 249.1485; found 249.1484.

4-10. NMR spectra

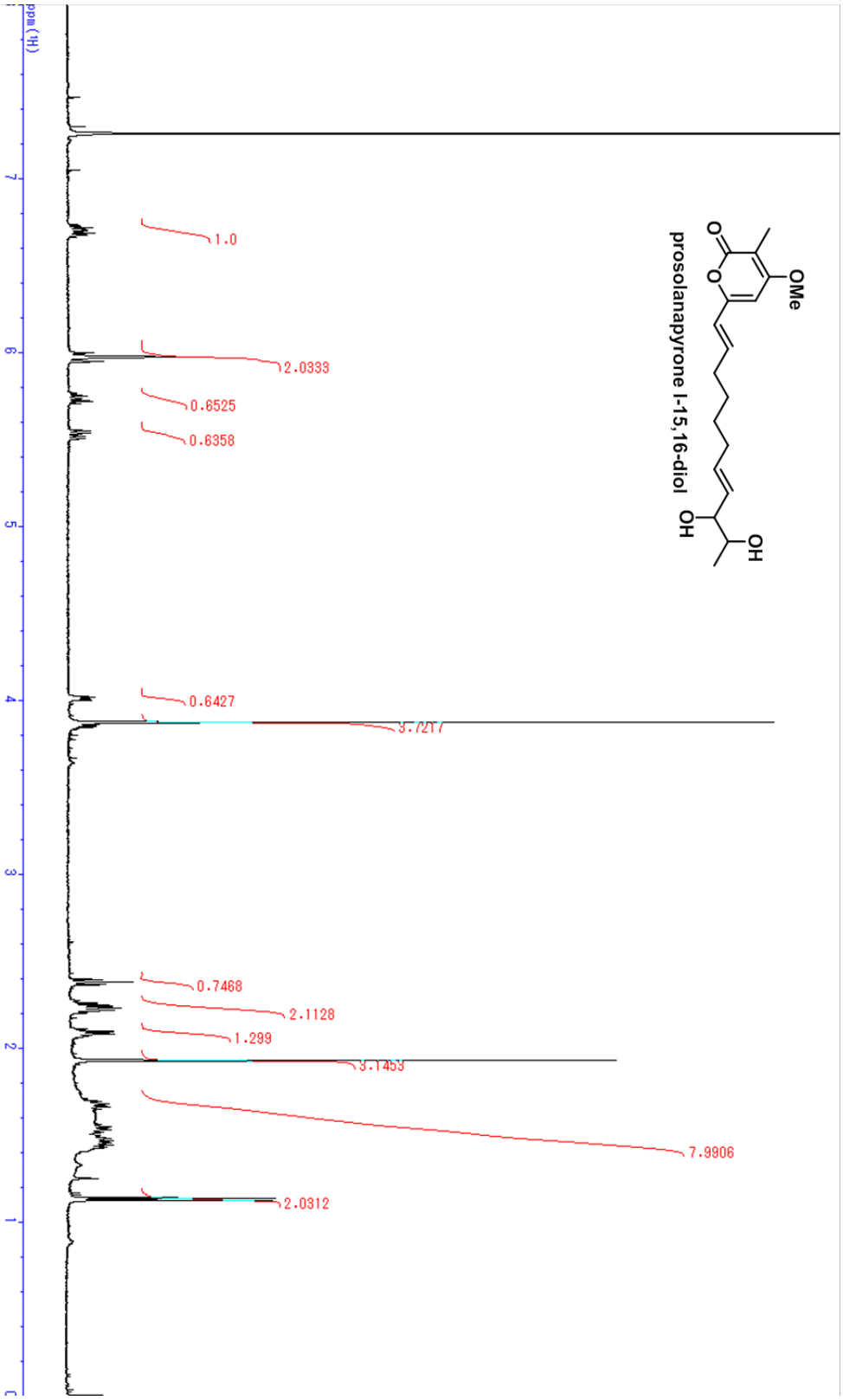
desmethylprosolanapyrone I (^{1}H NMR)



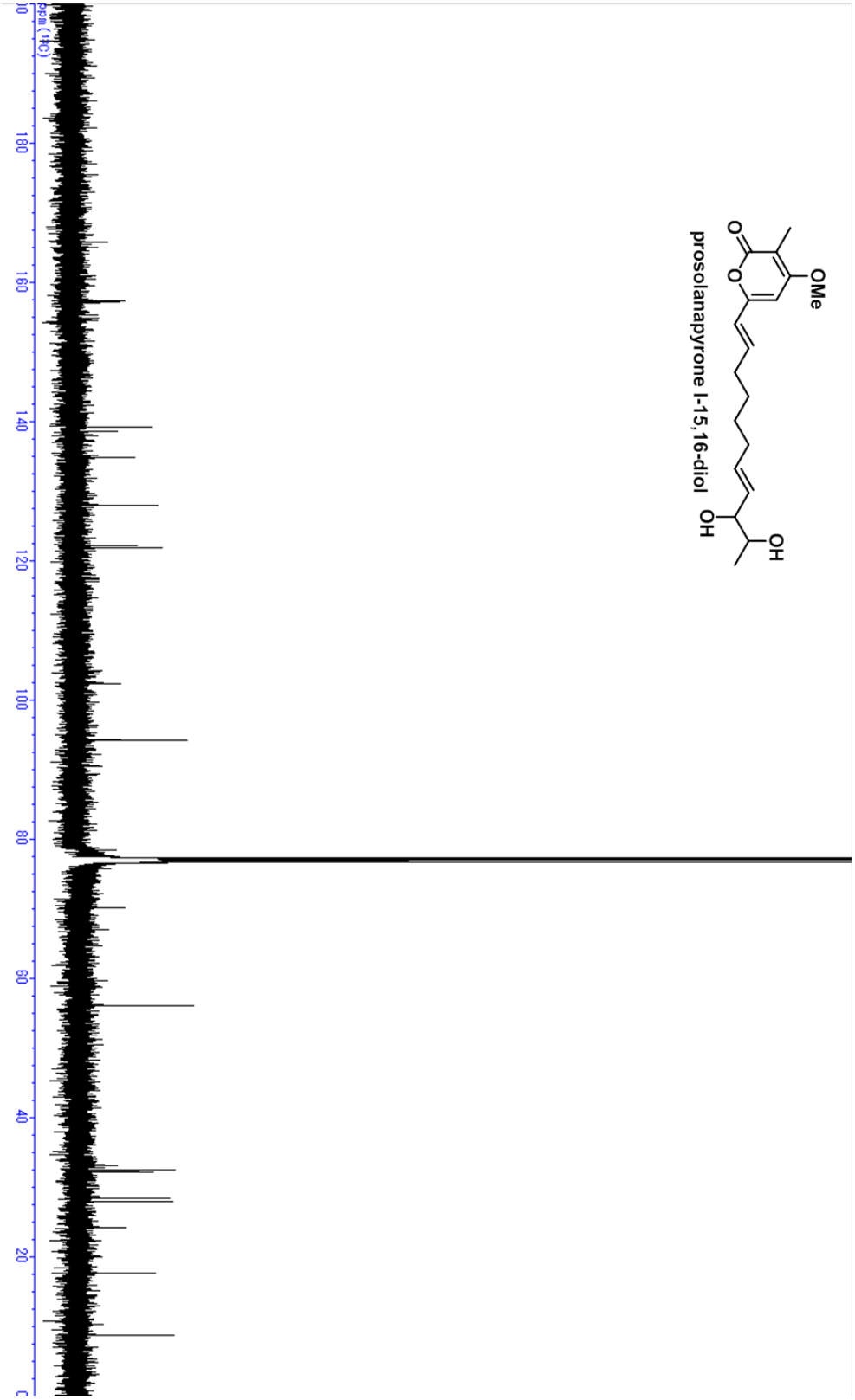
prosolanapyrone I (^{1}H NMR)



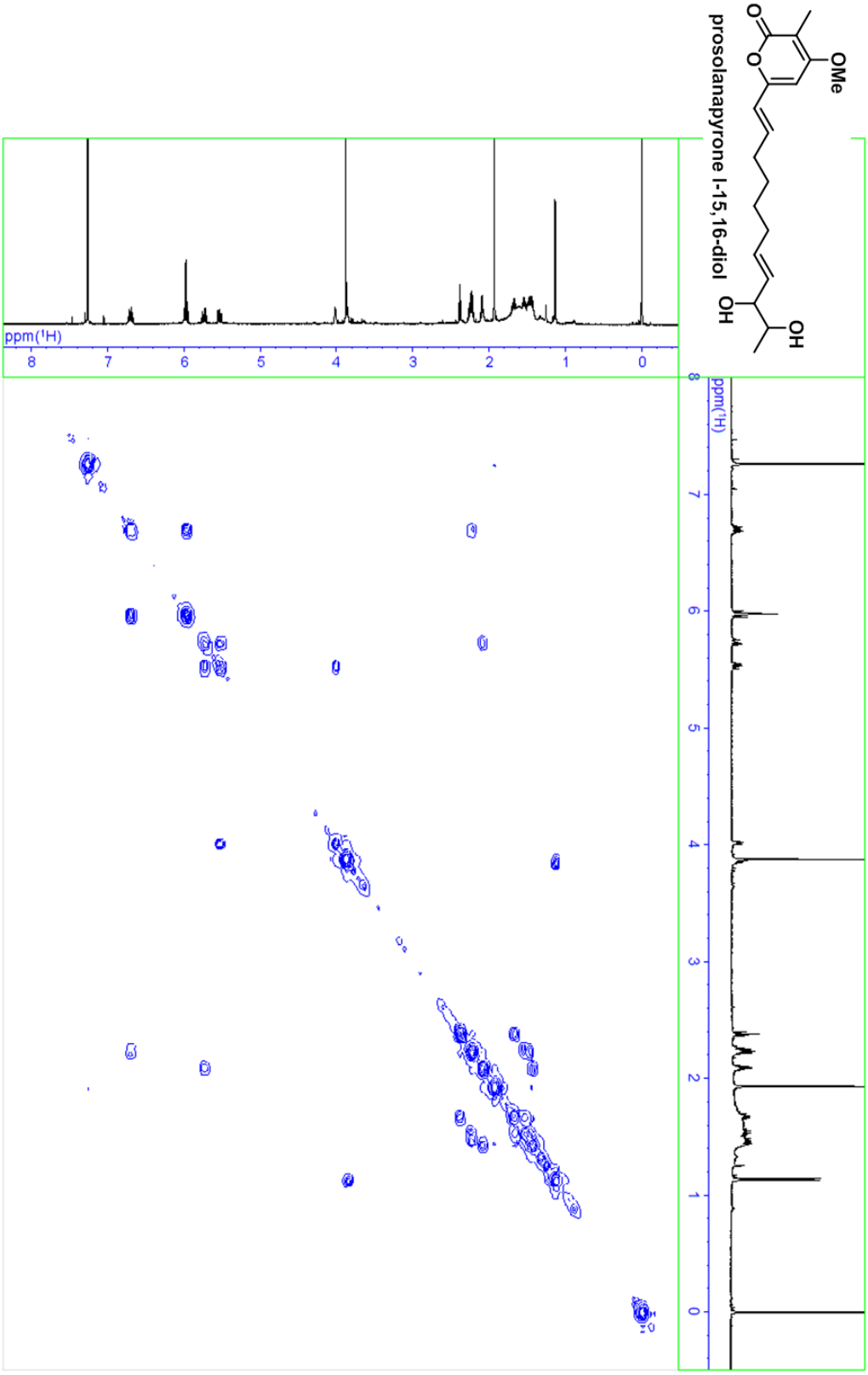
prosolanapyrone I-15,16-diol (^{1}H NMR)



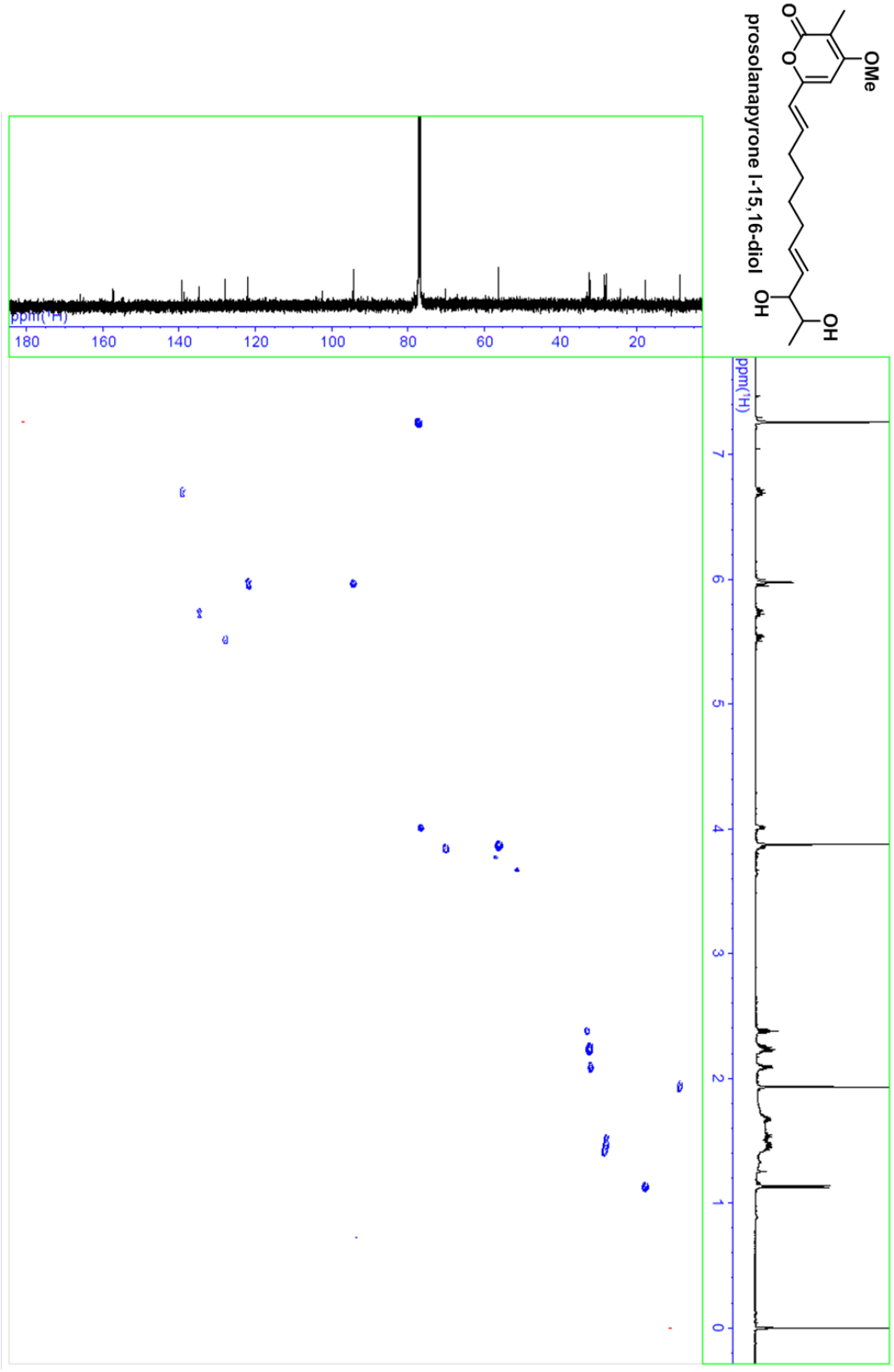
prosolanapyrone I-15,16-diol (^{13}C NMR)



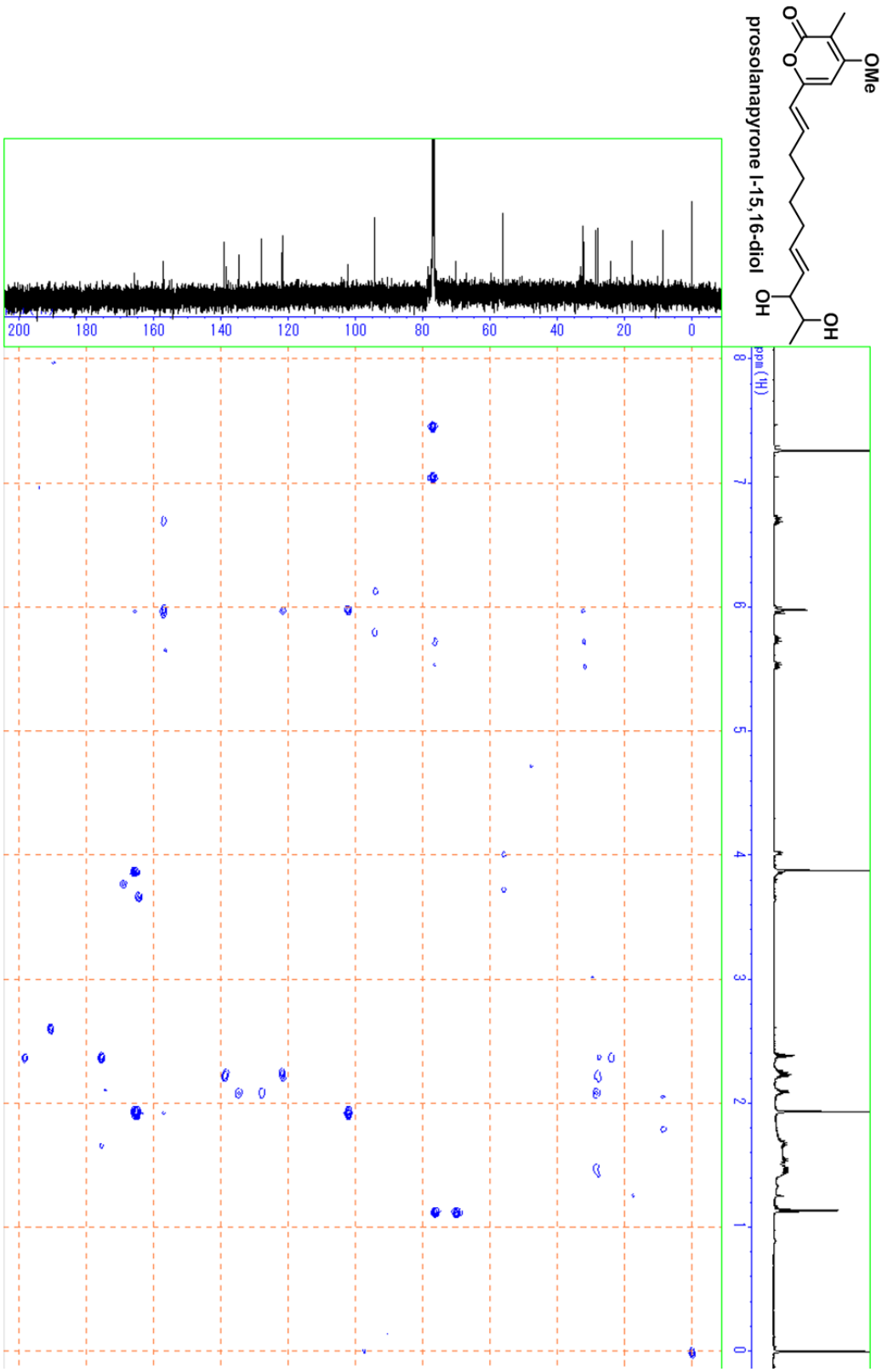
prosolanapyrone I-15,16-diol (H-H COSY)



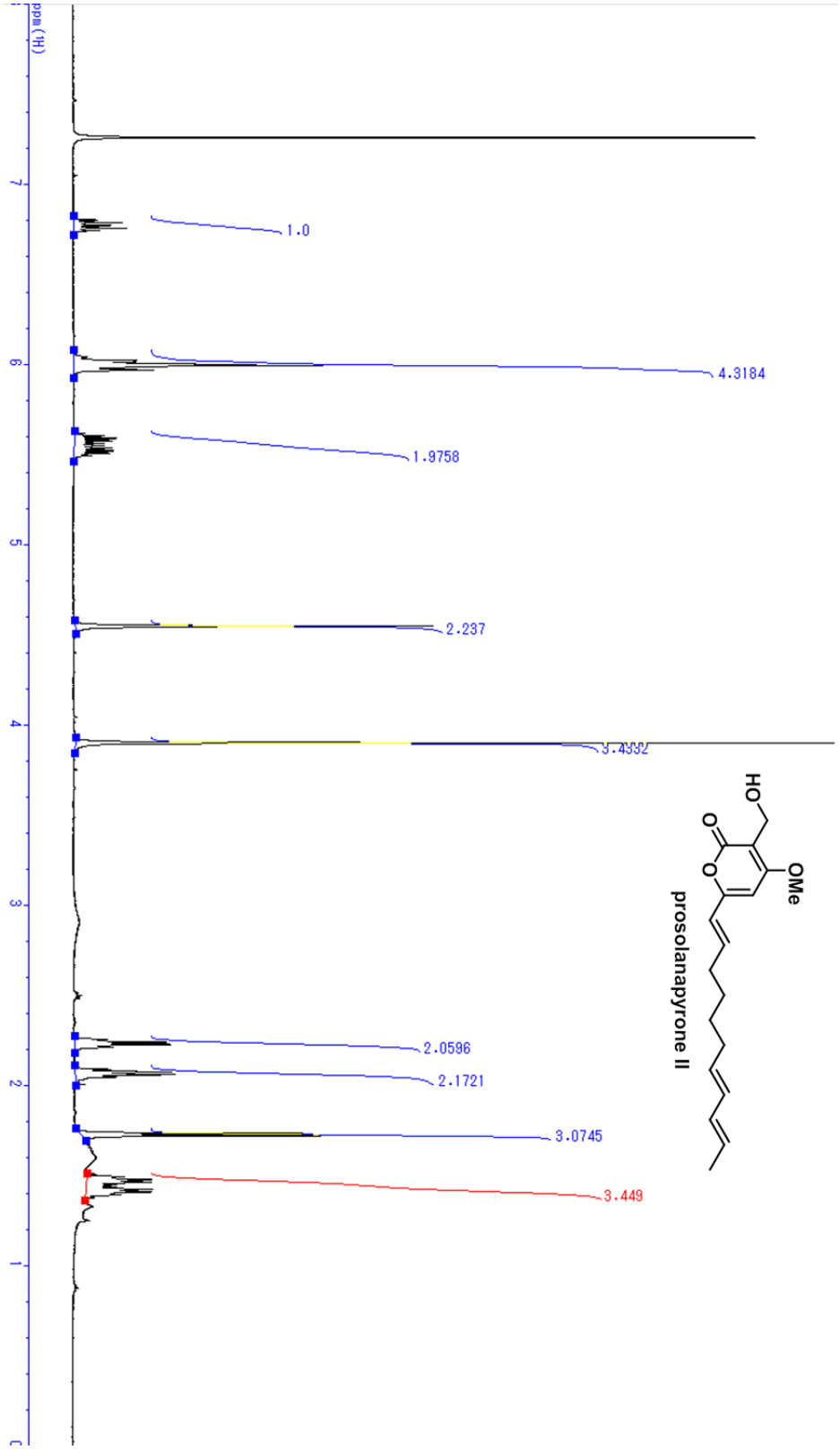
prosolanapyrone I-15,16-diol (HSQC)



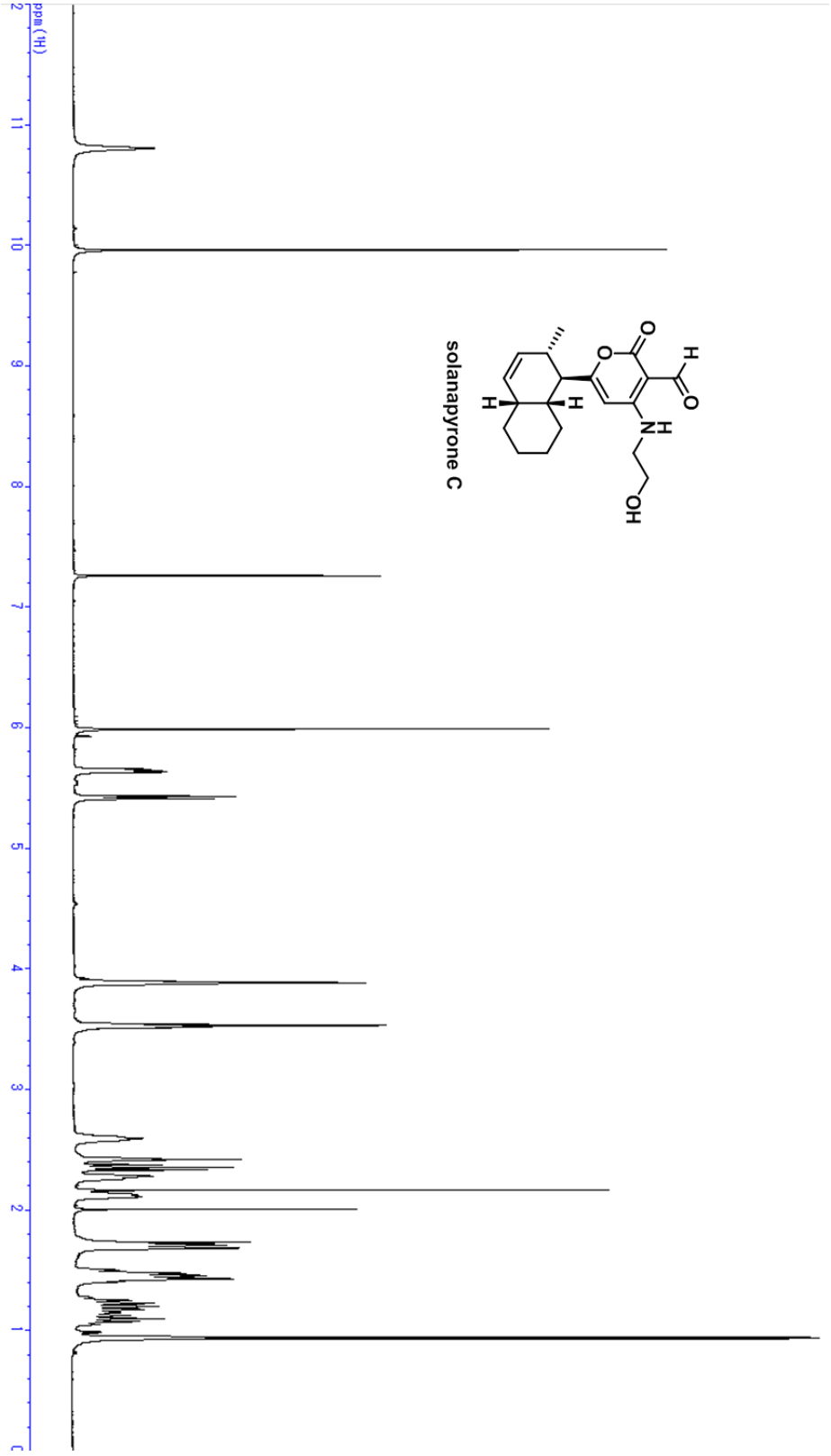
prosolanapyrone I-15,16-diol (HMBC)



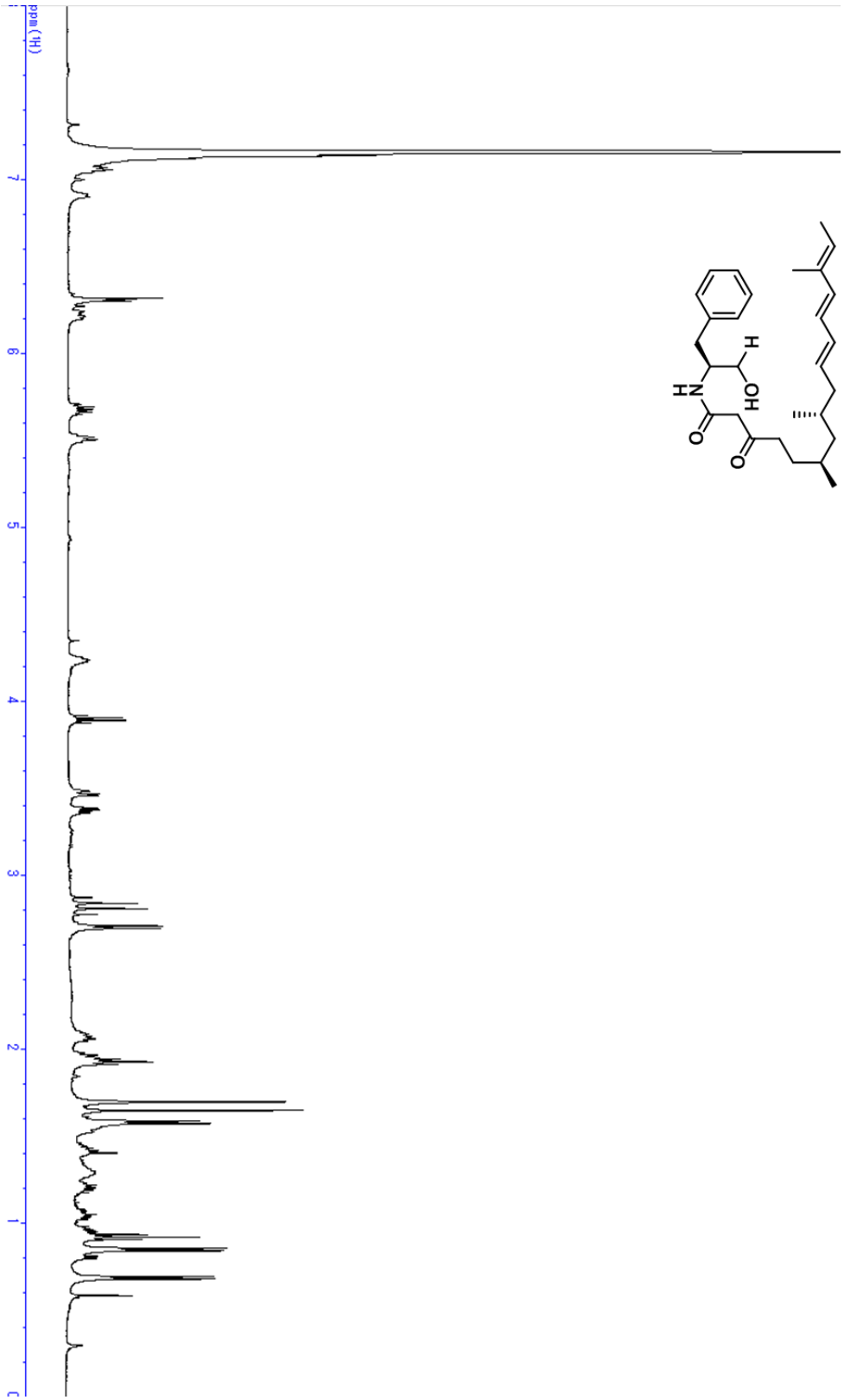
prosolanapyrone II (^{1}H NMR)



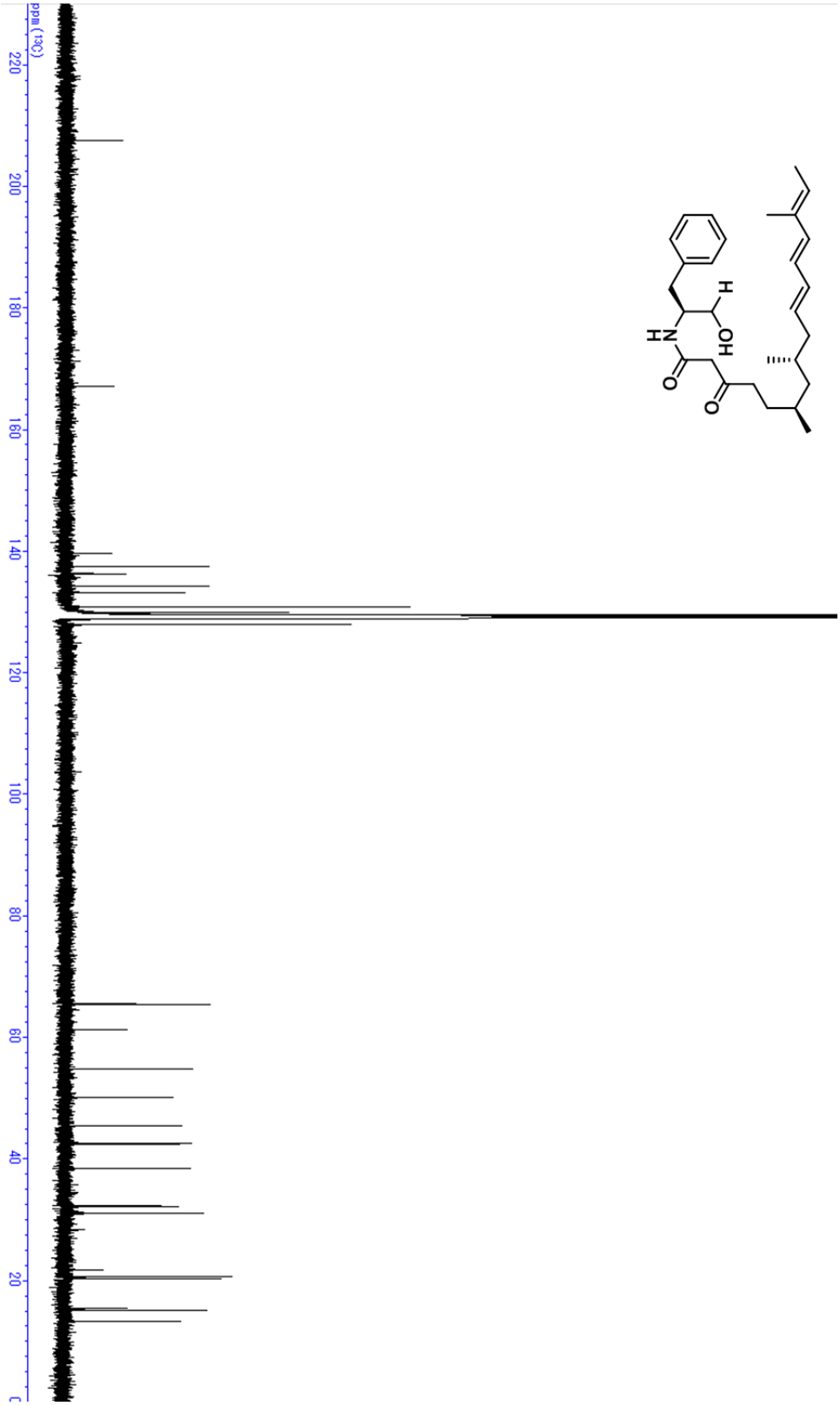
solanapyrone C (^{1}H NMR)



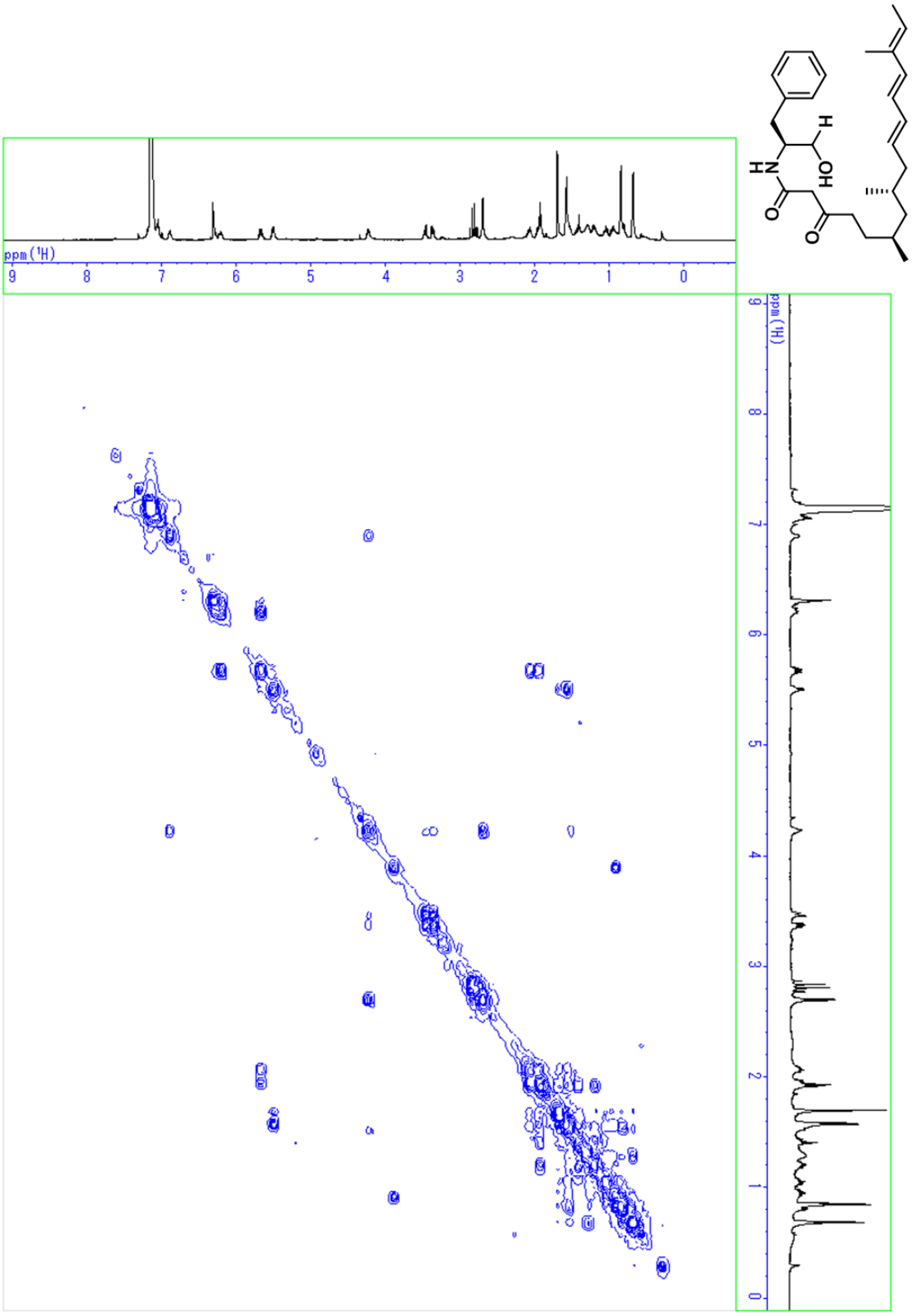
reduced product **13** (^{1}H NMR)



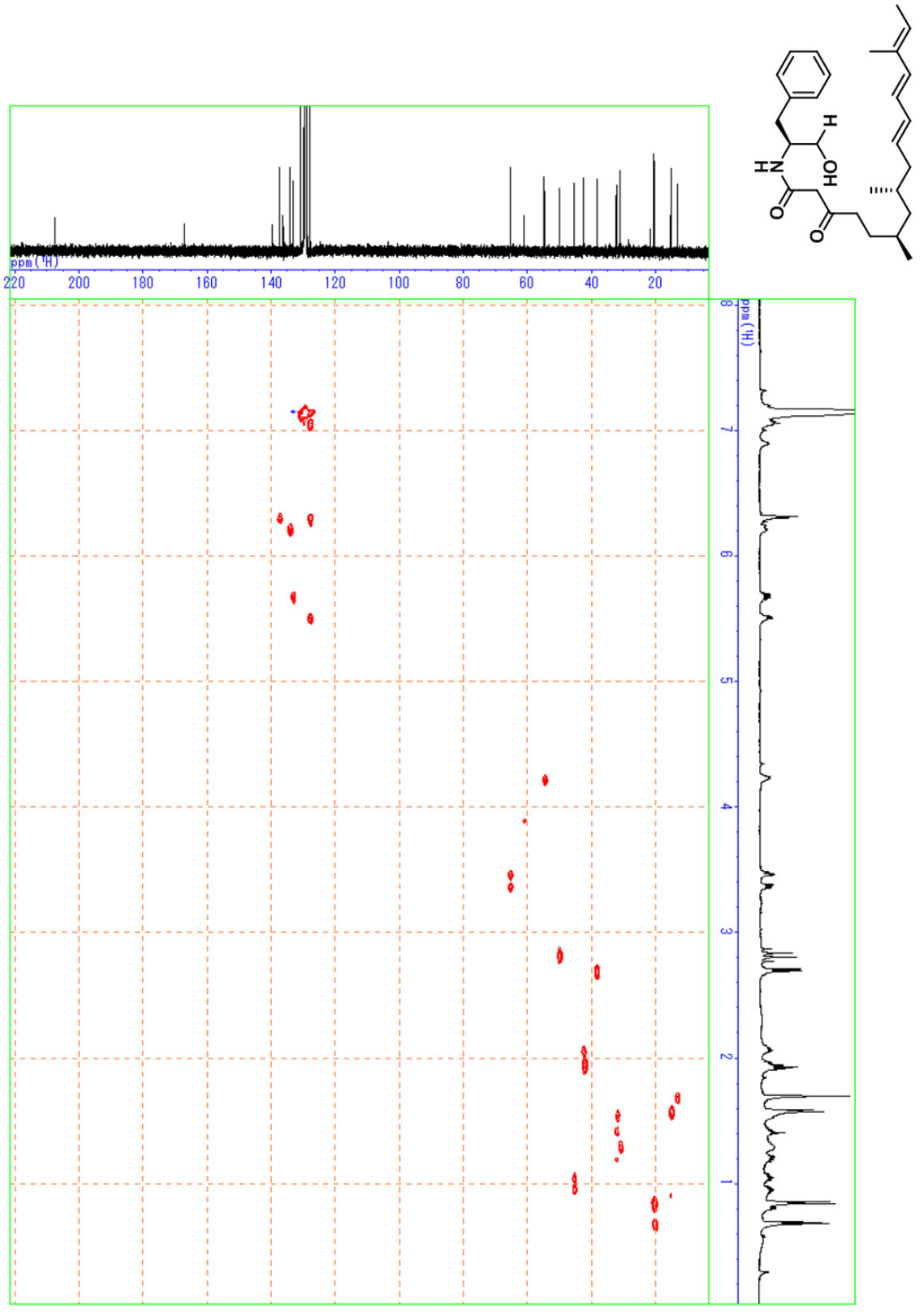
reduced product **13** (^{13}C NMR)



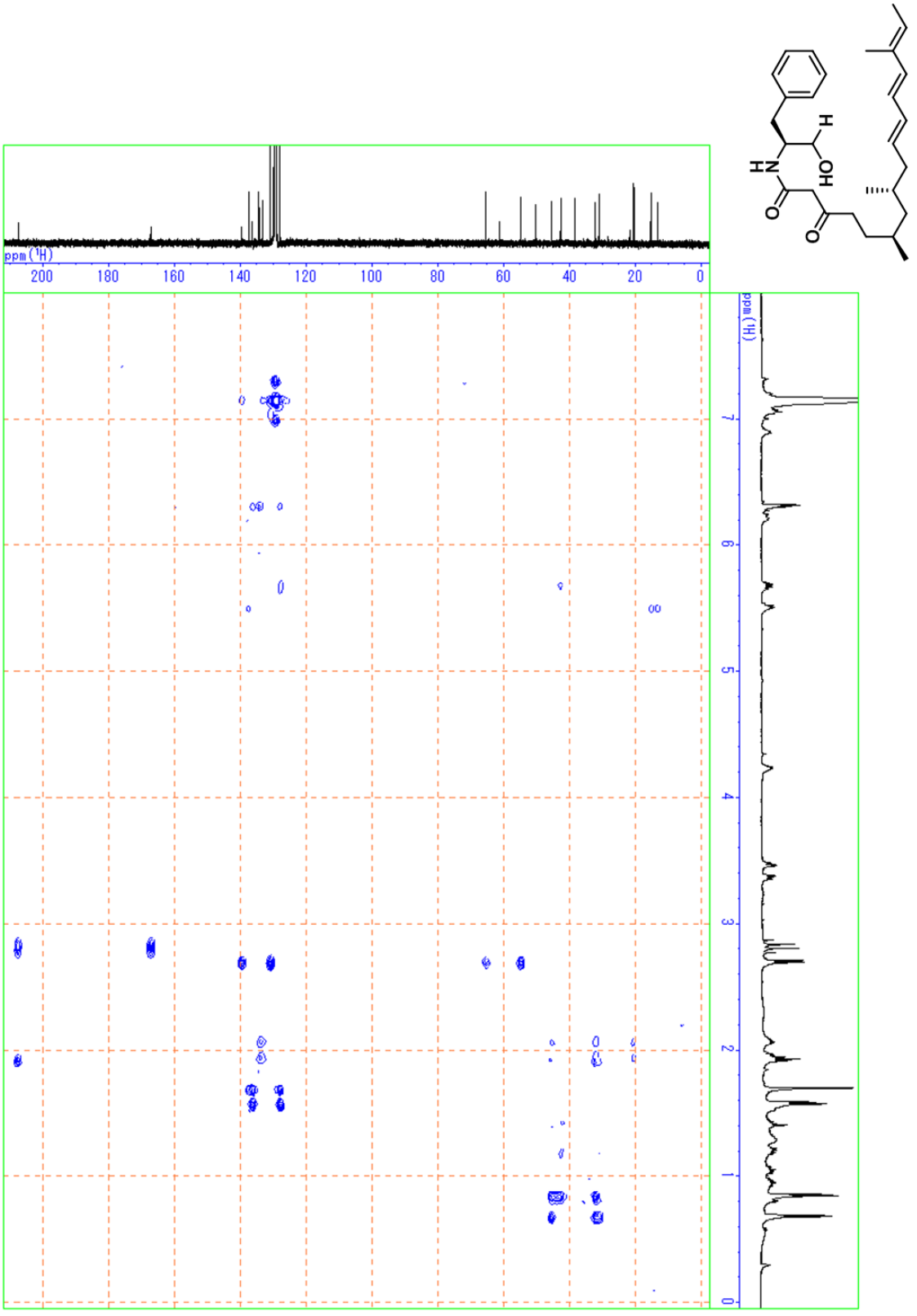
reduced product **13** (H-H COSY)



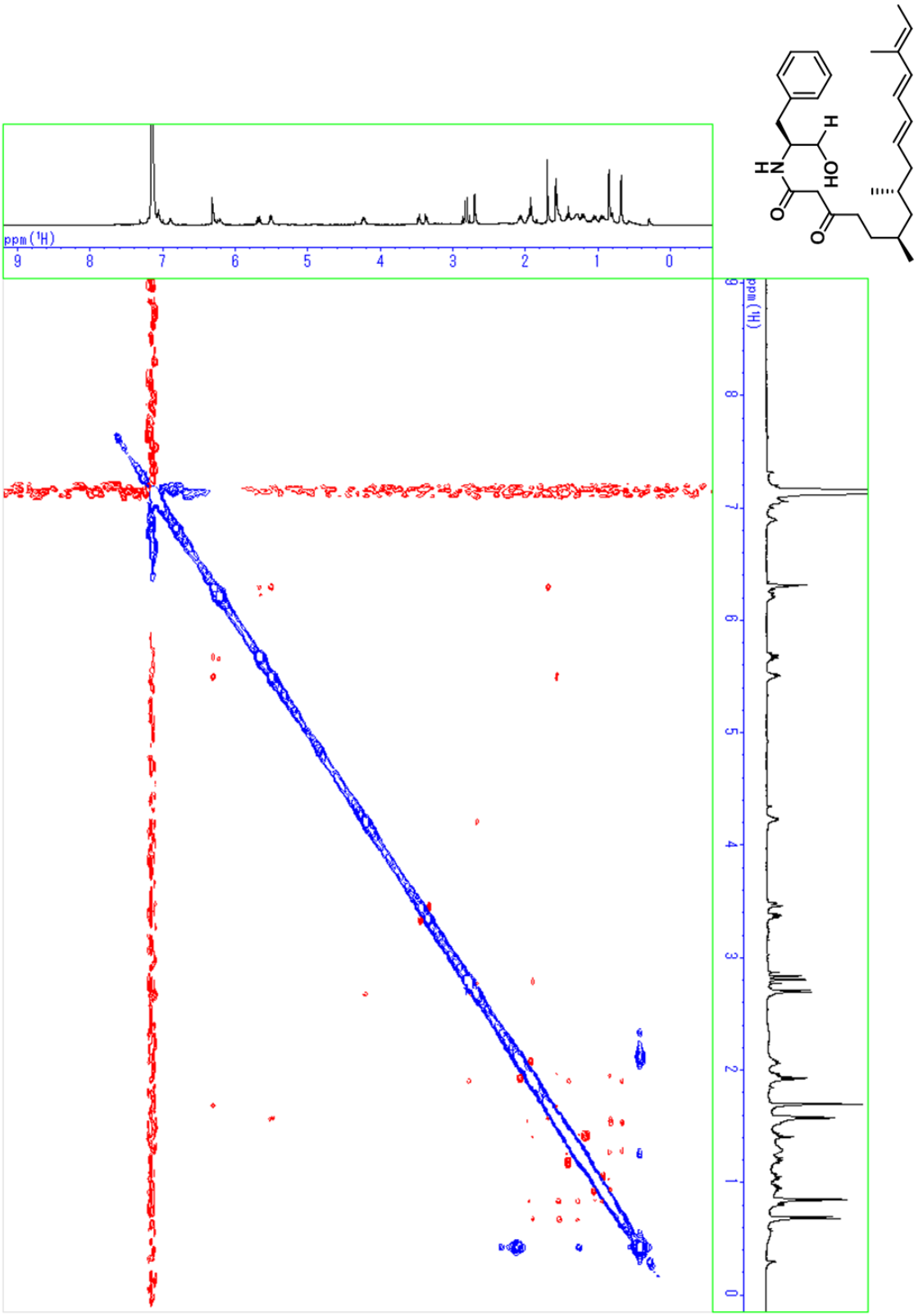
reduced product **13** (HSQC)



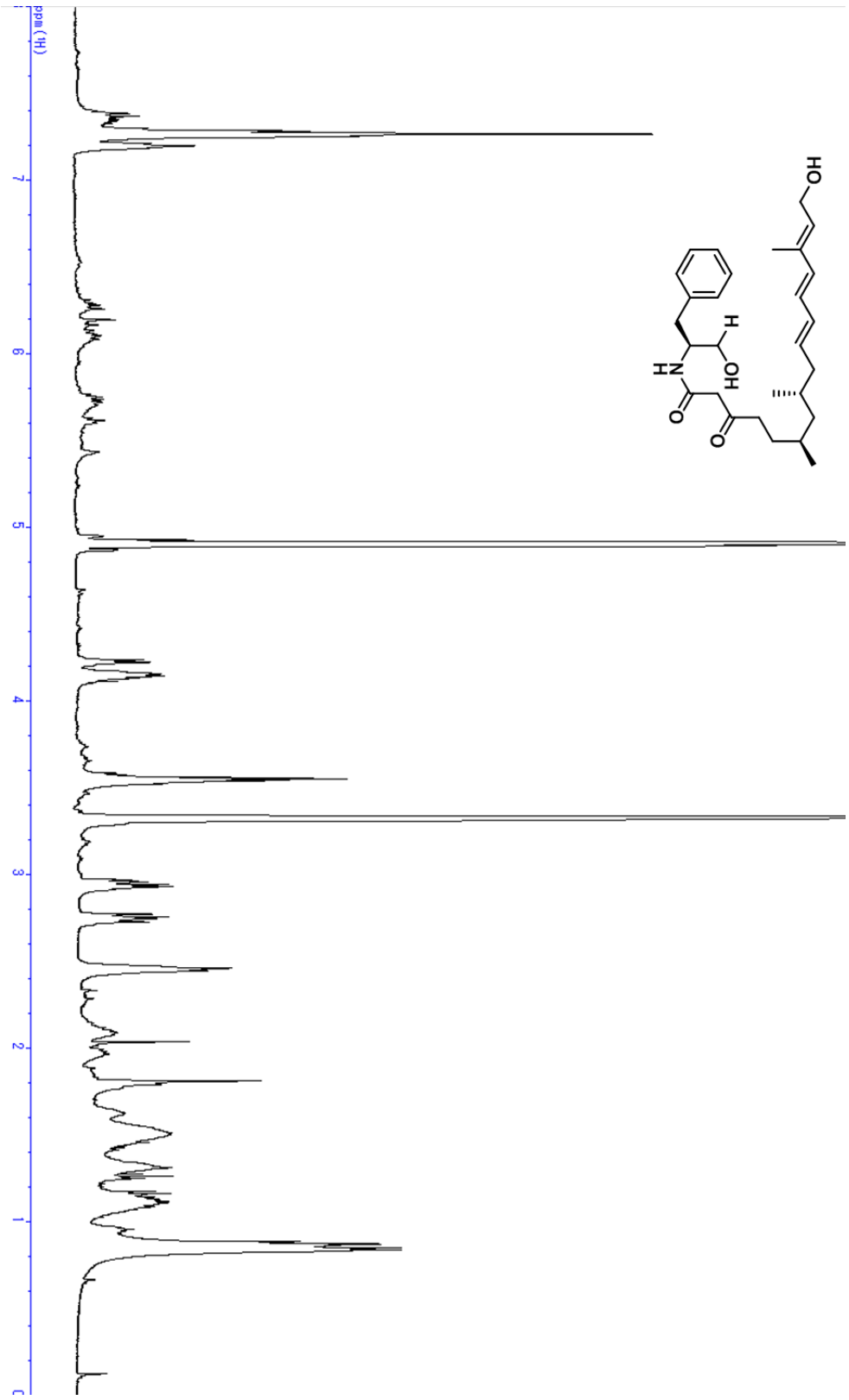
reduced product **13** (HMBC)



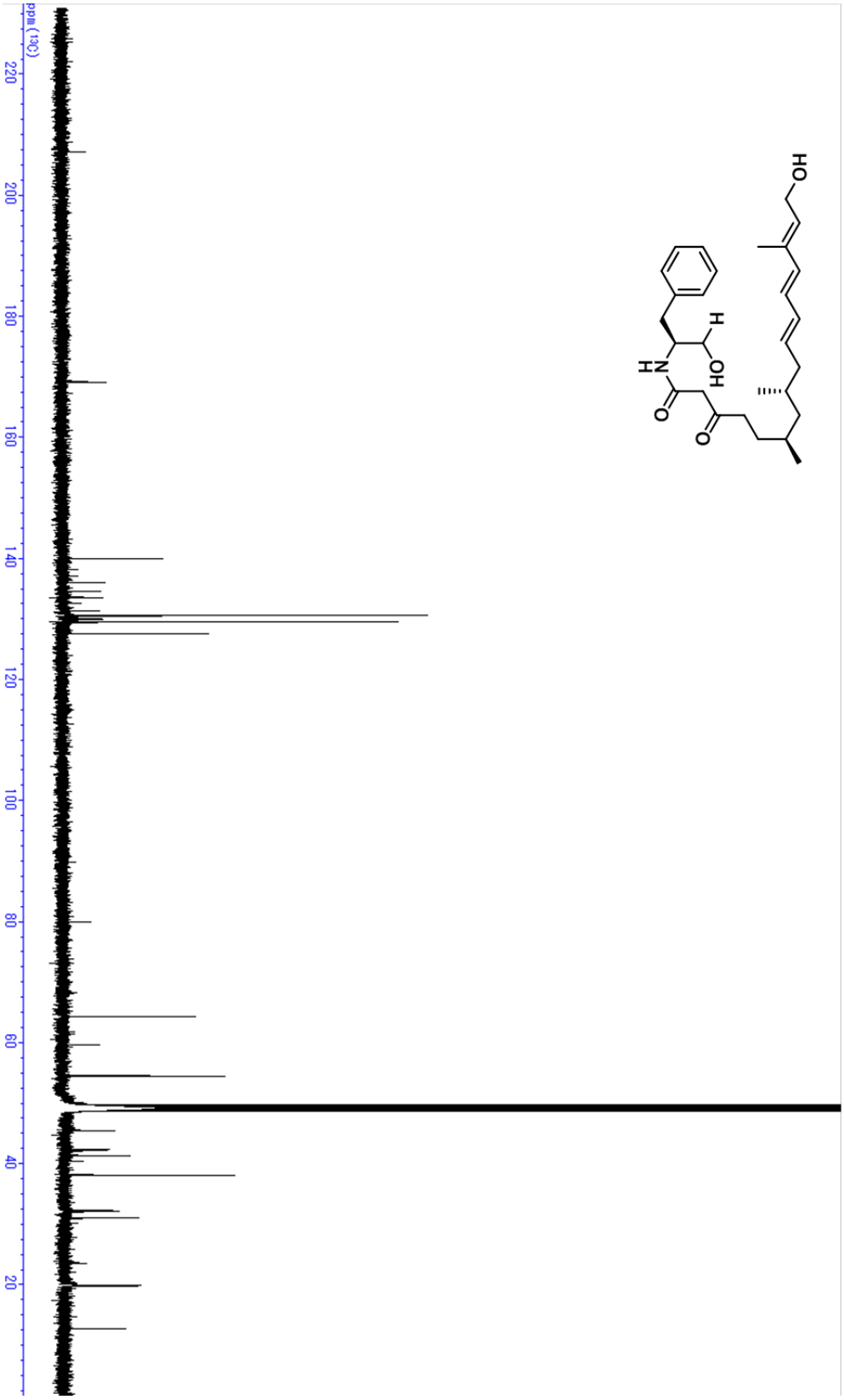
reduced product **13** (NOESY)



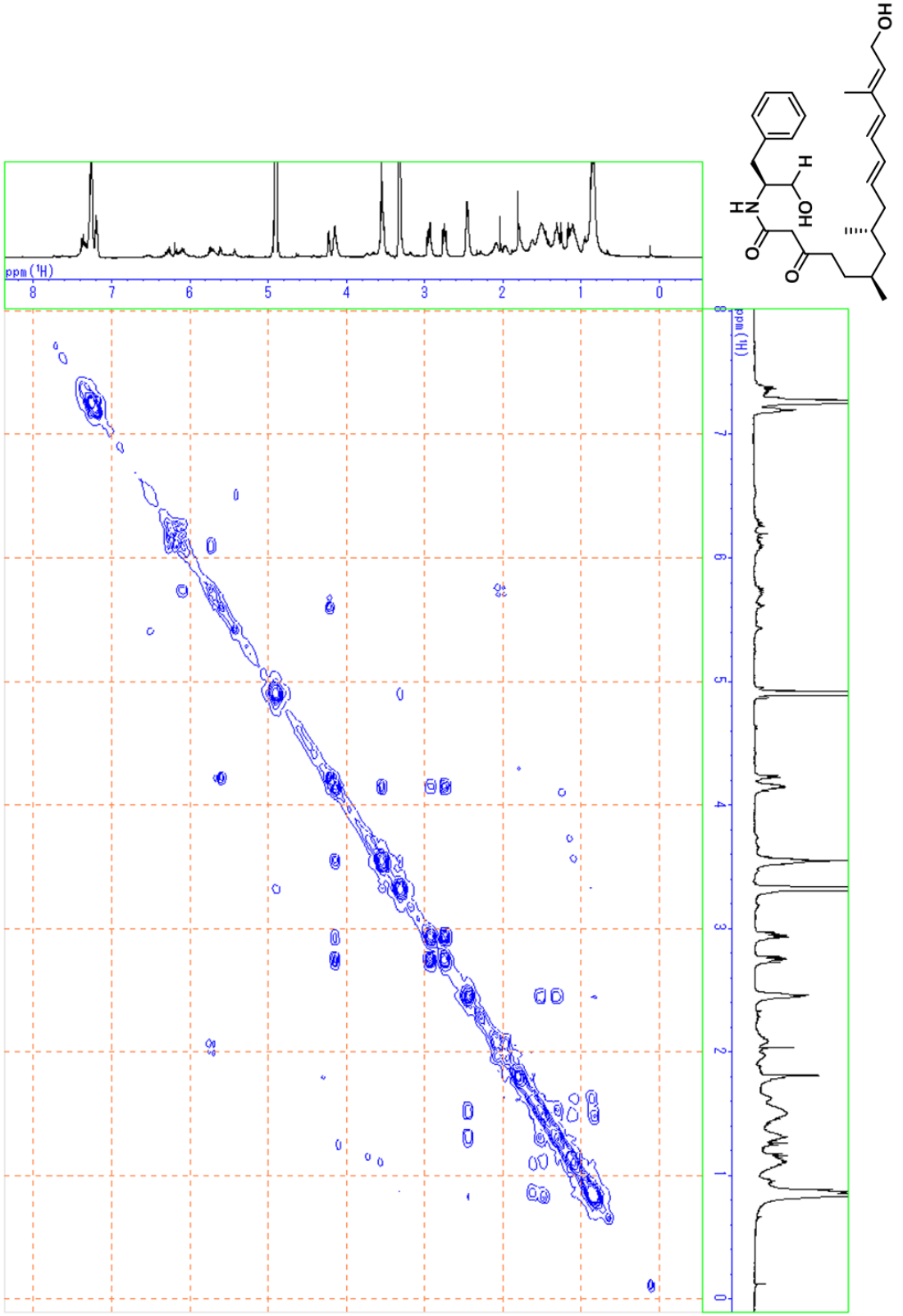
allyl alcohol **14** (^{1}H NMR)



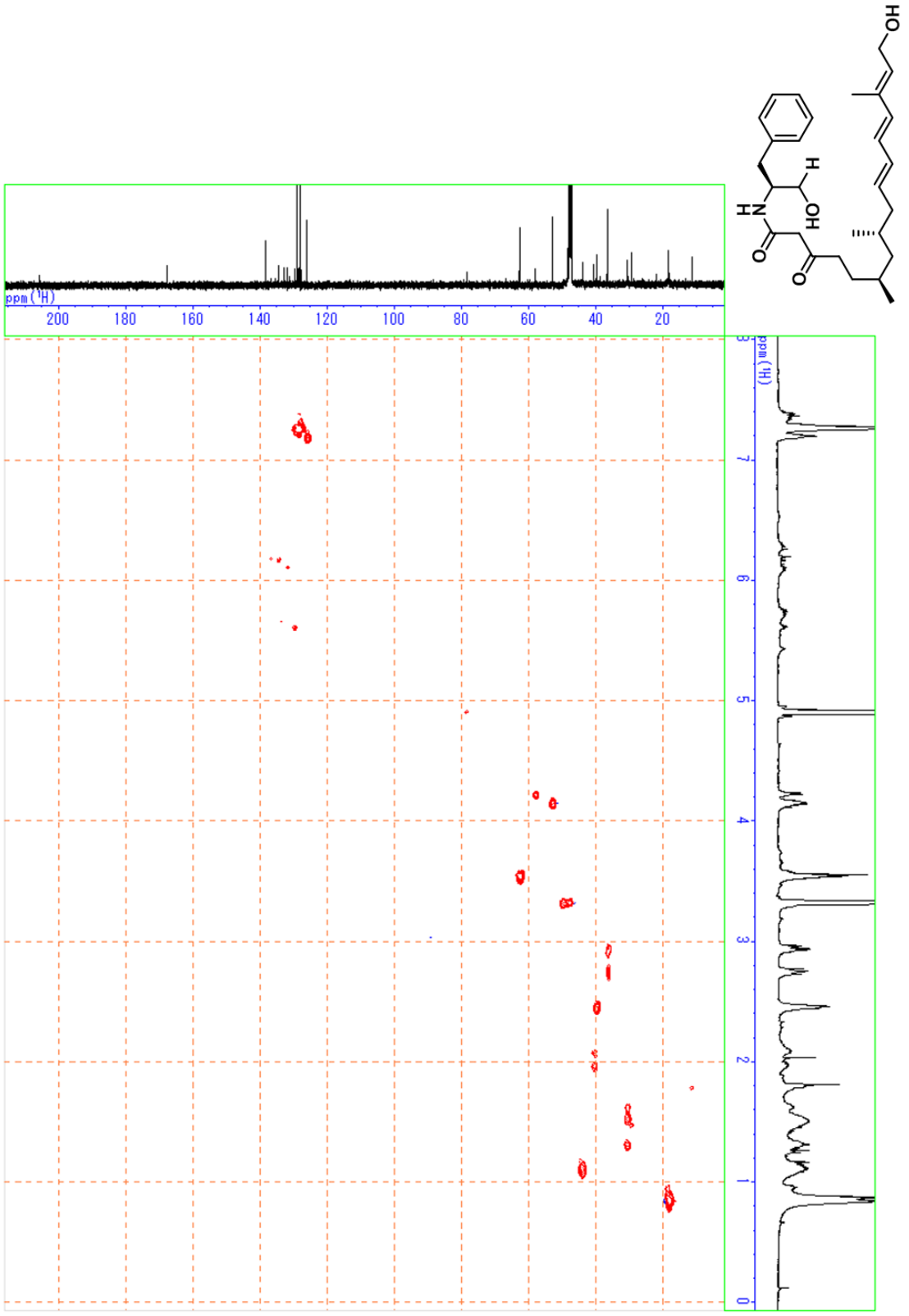
allyl alcohol **14** (^{13}C NMR)



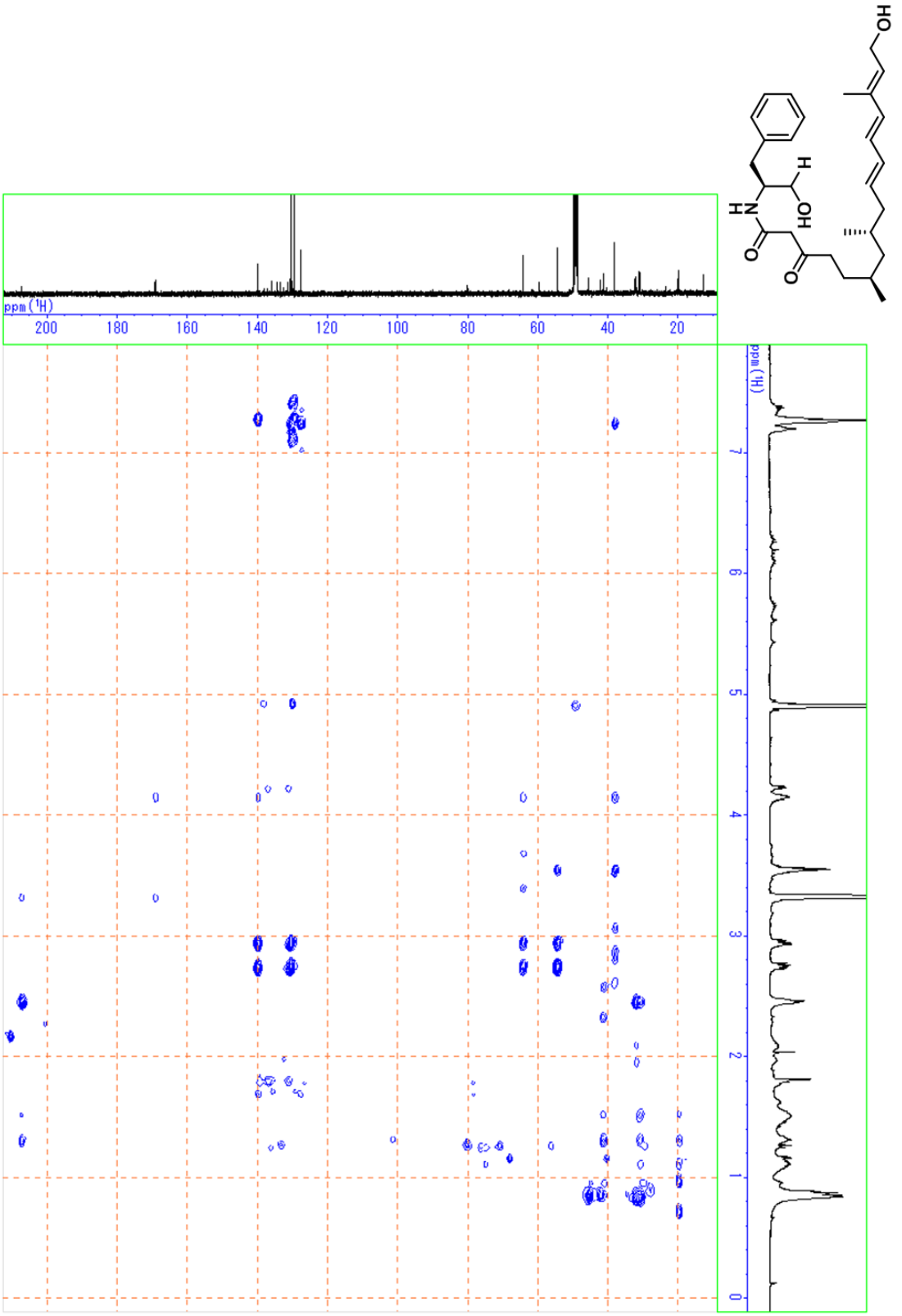
allyl alcohol **14** (H-H COSY)



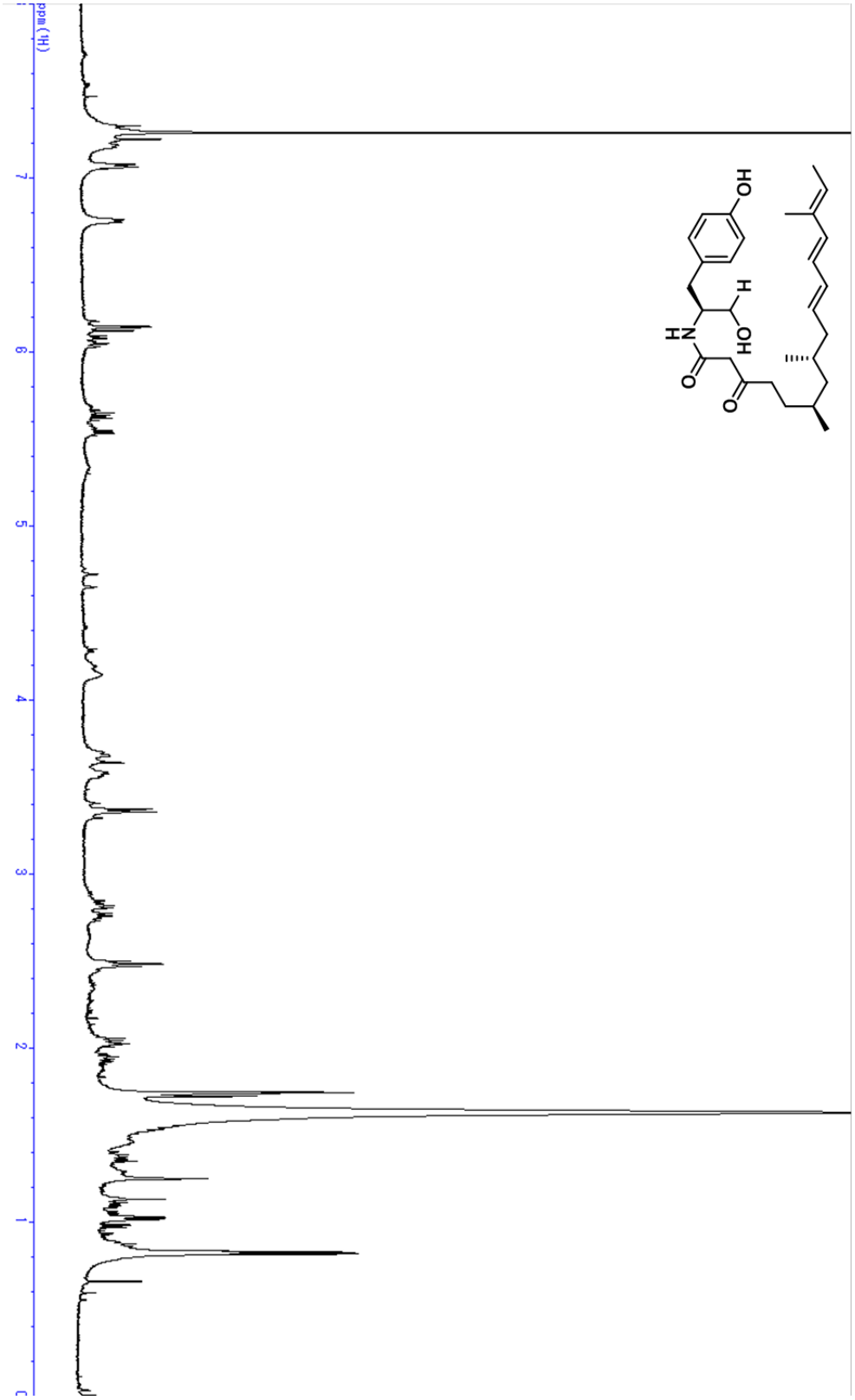
allyl alcohol **14** (HSQC)



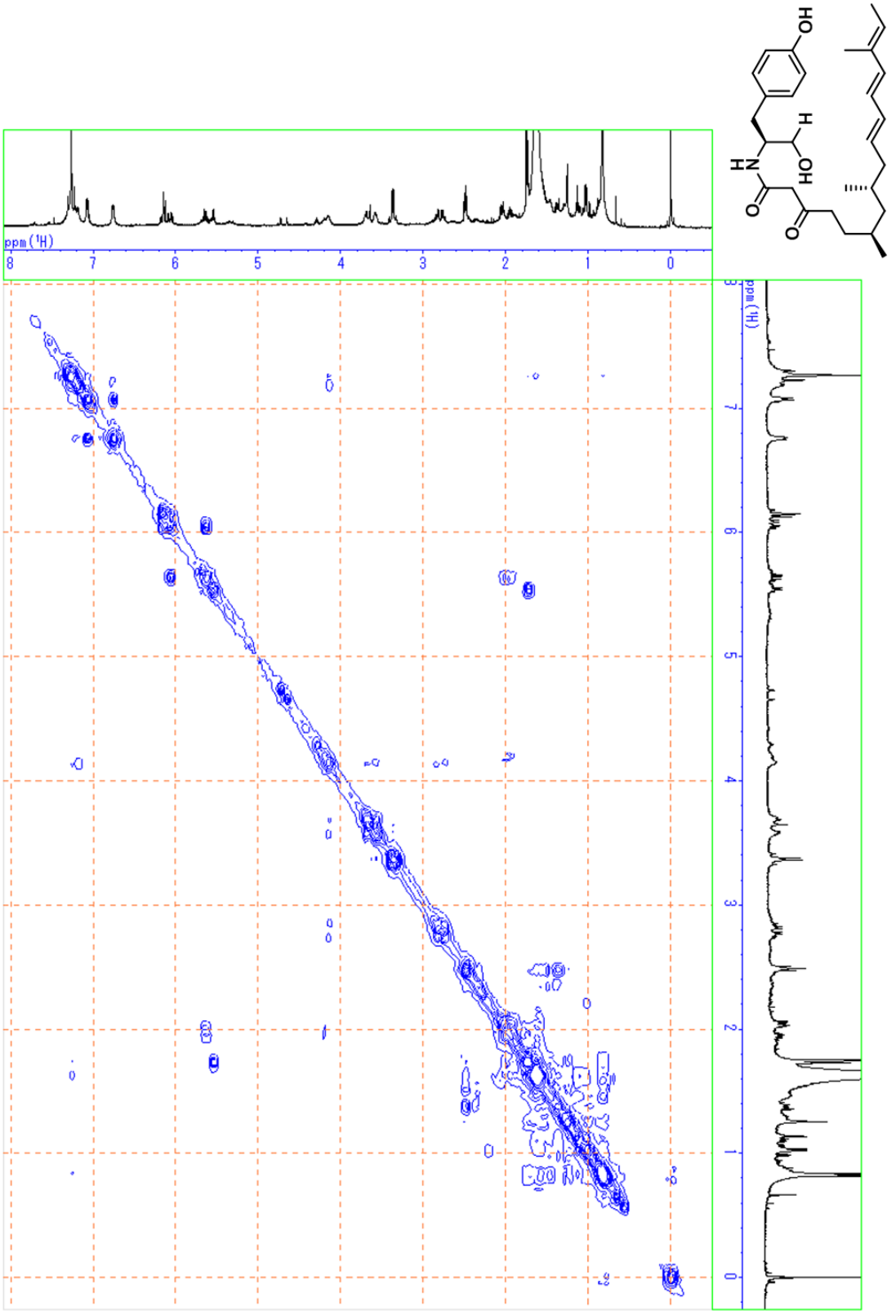
allyl alcohol **14** (HMBC)



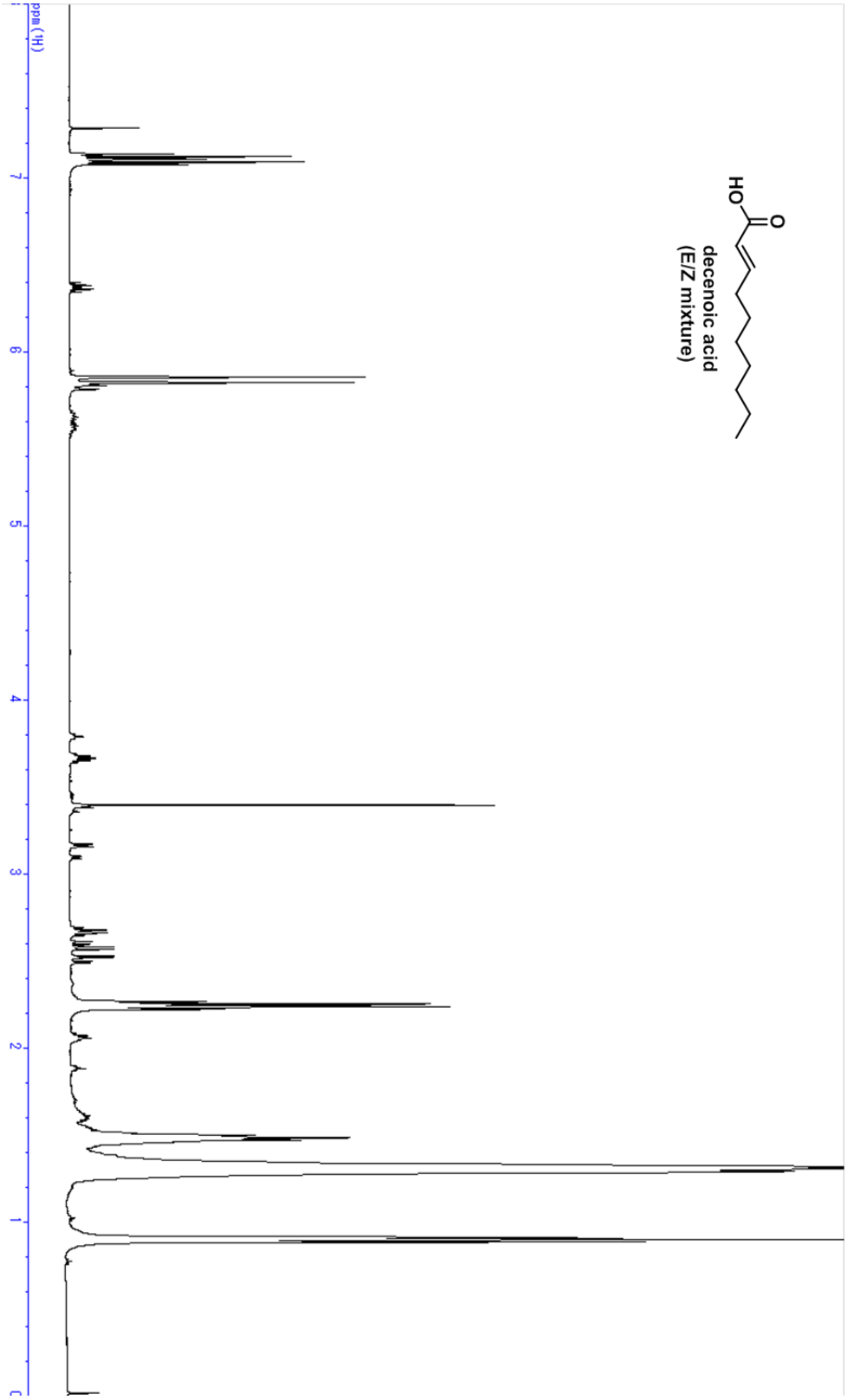
tyrosine type reduced product (^{1}H NMR)



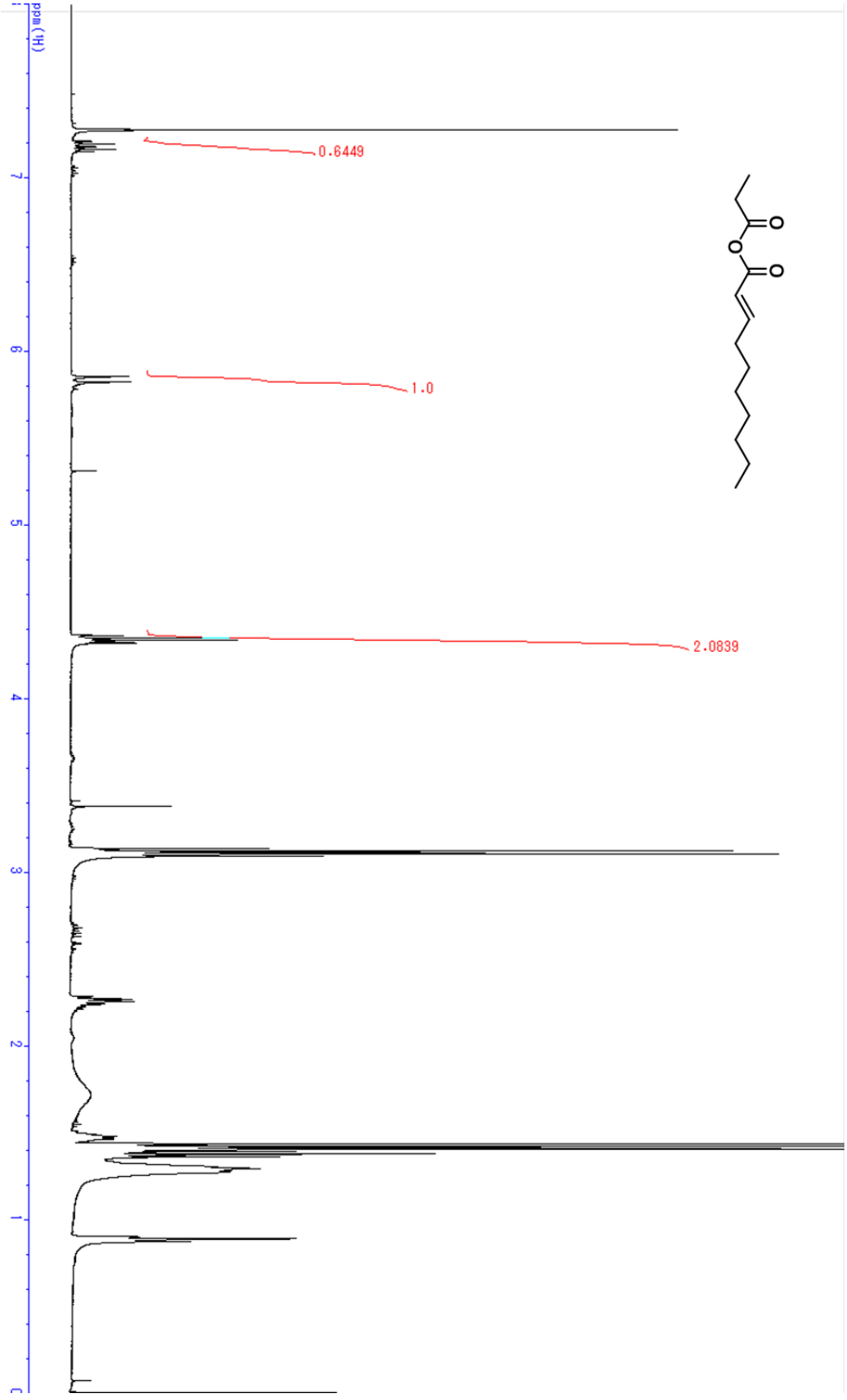
tyrosine type reduced product (H-H COSY)



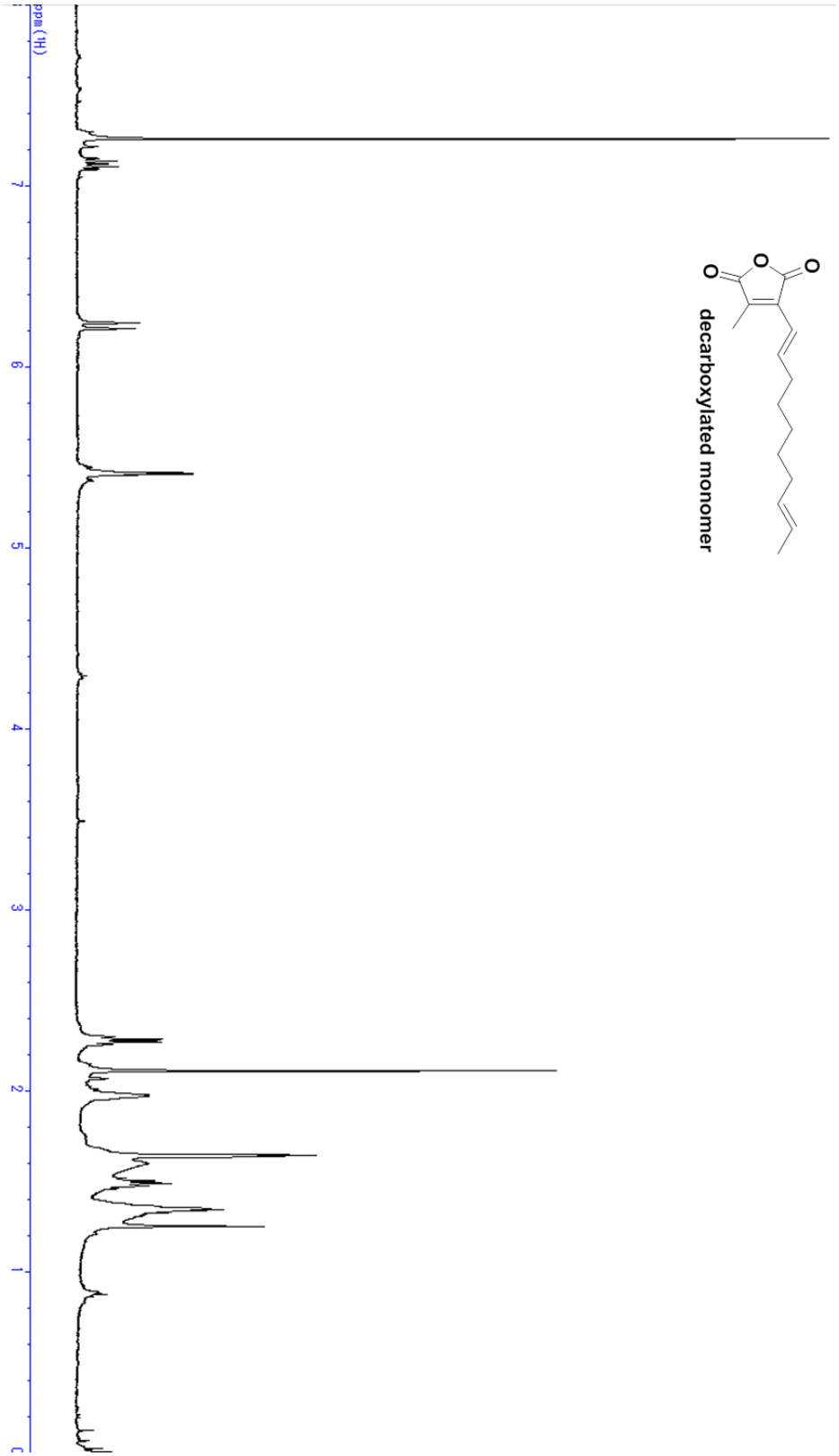
decenoic acid (^{1}H NMR)



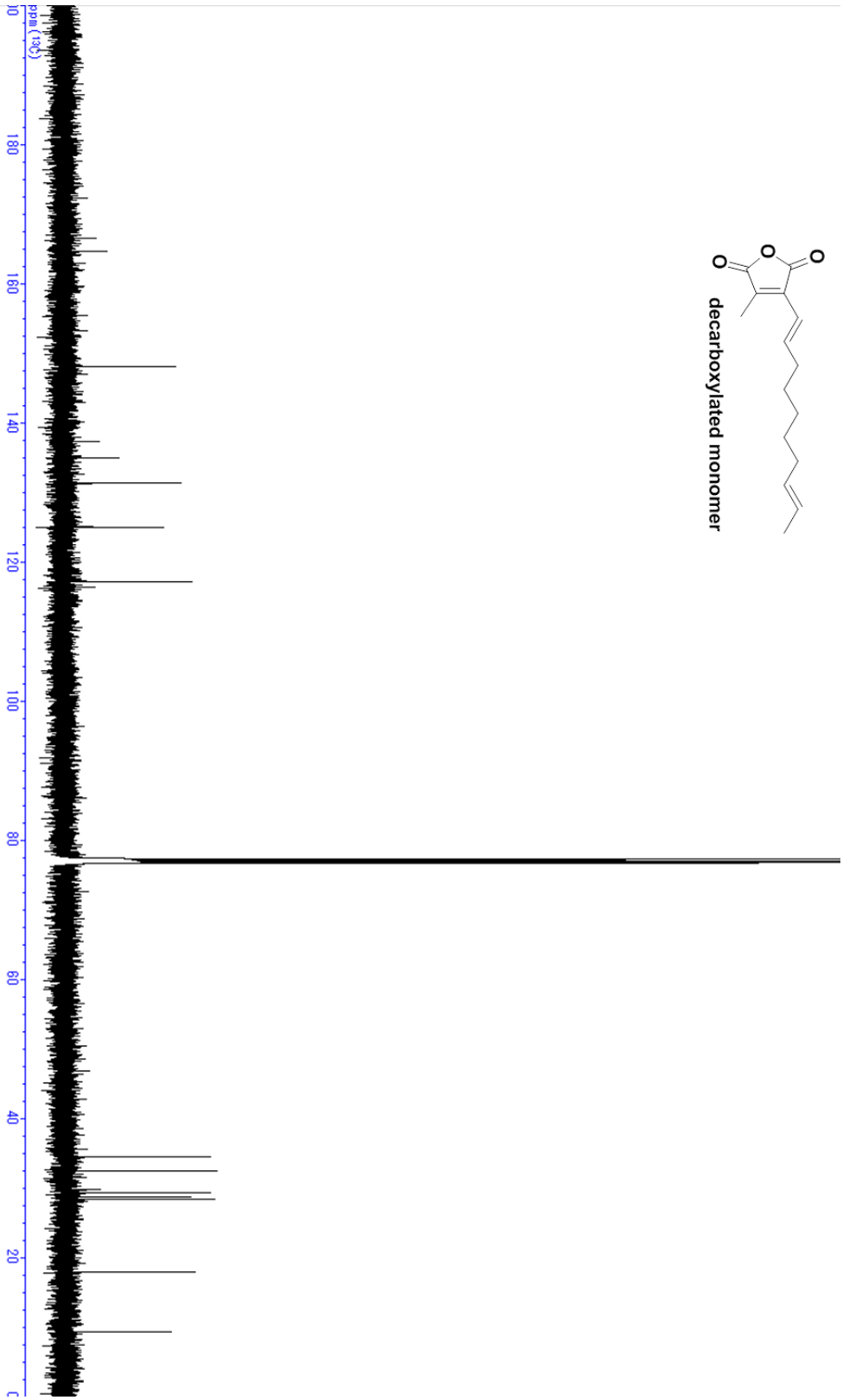
ethylcarbonate anhydride (^{1}H NMR)



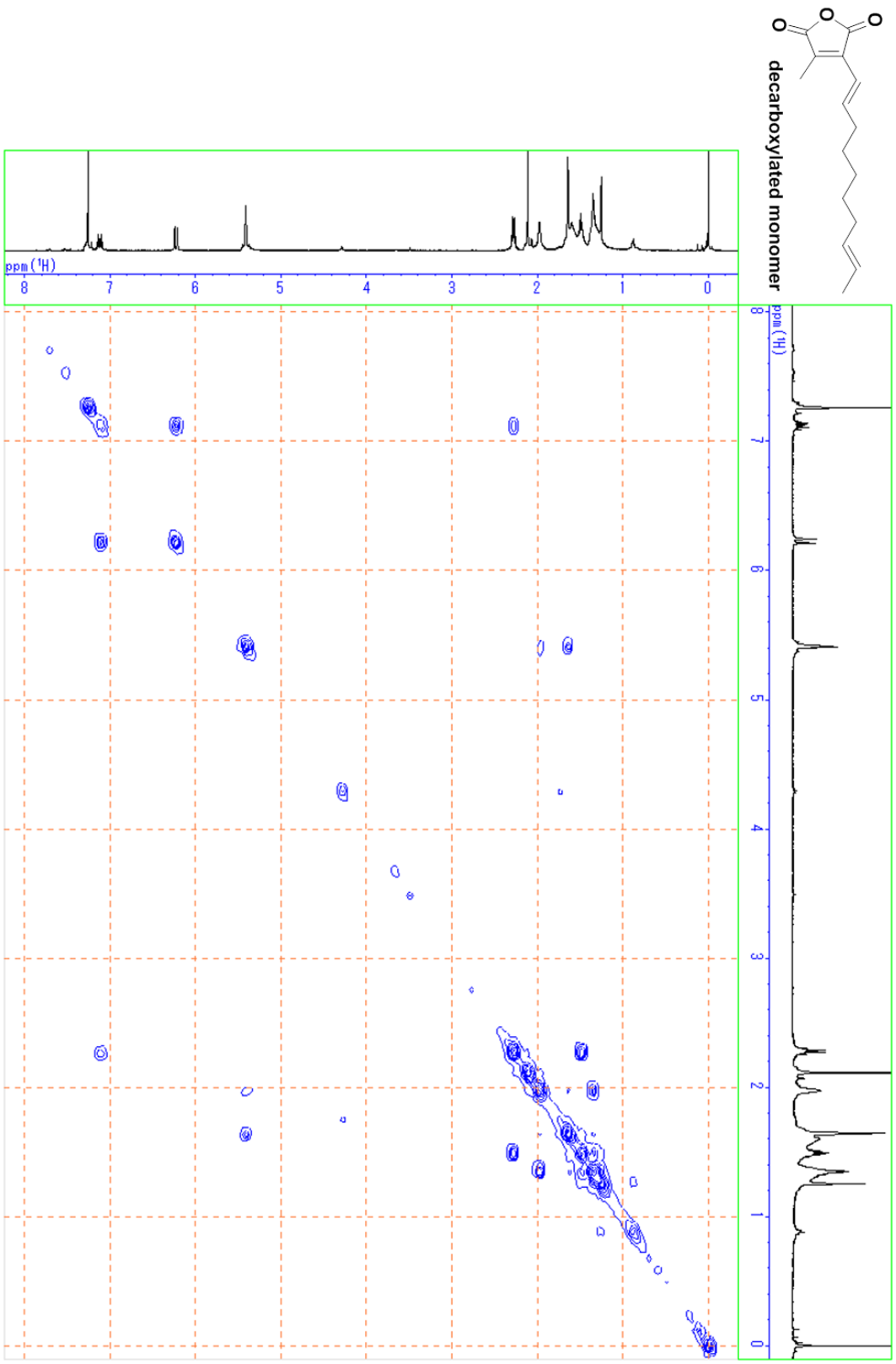
decarboxylated phomoidride type monomer **15** (^{1}H NMR)



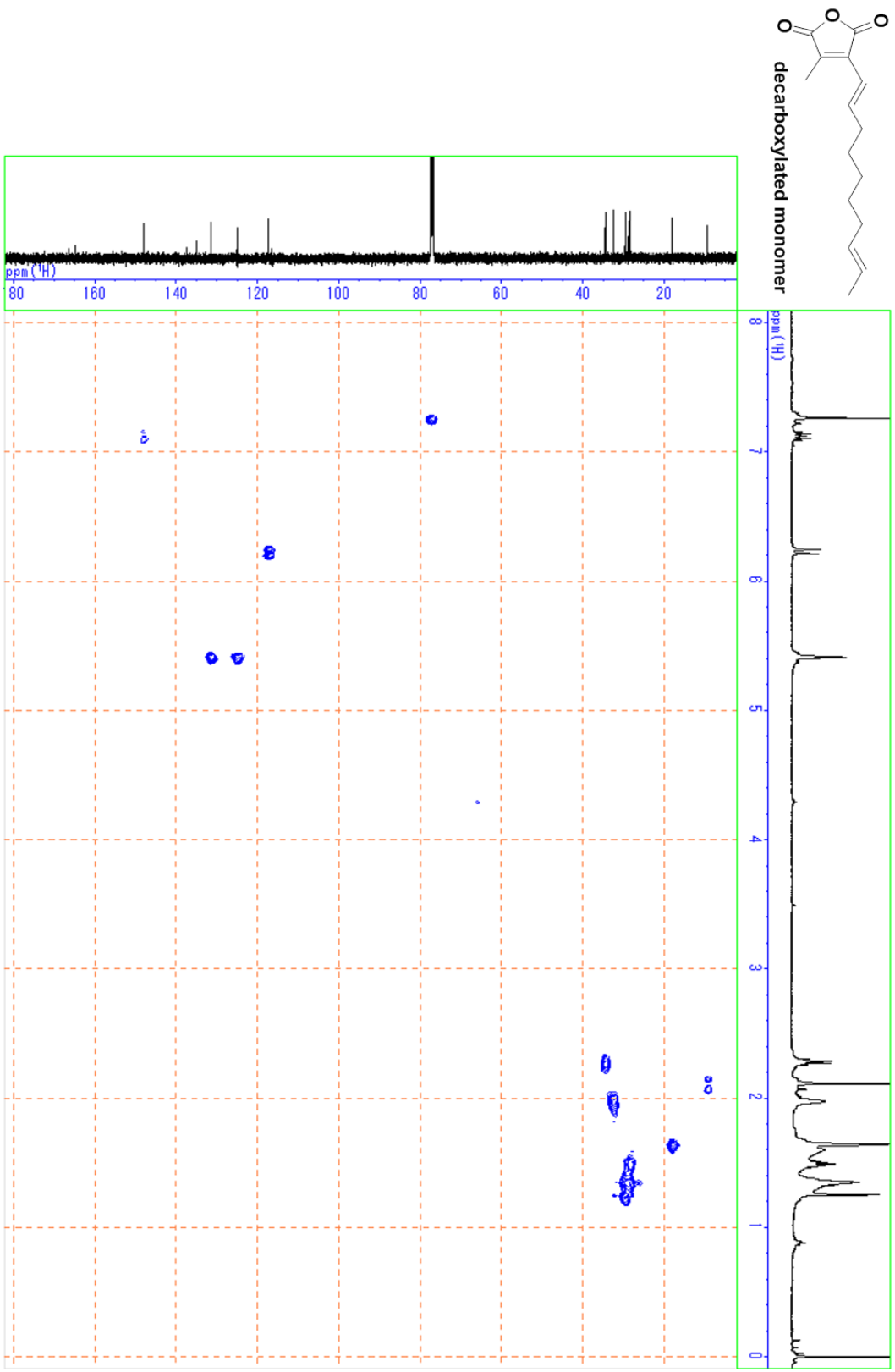
decarboxylated phomoidride type monomer **15** (^{13}C NMR)



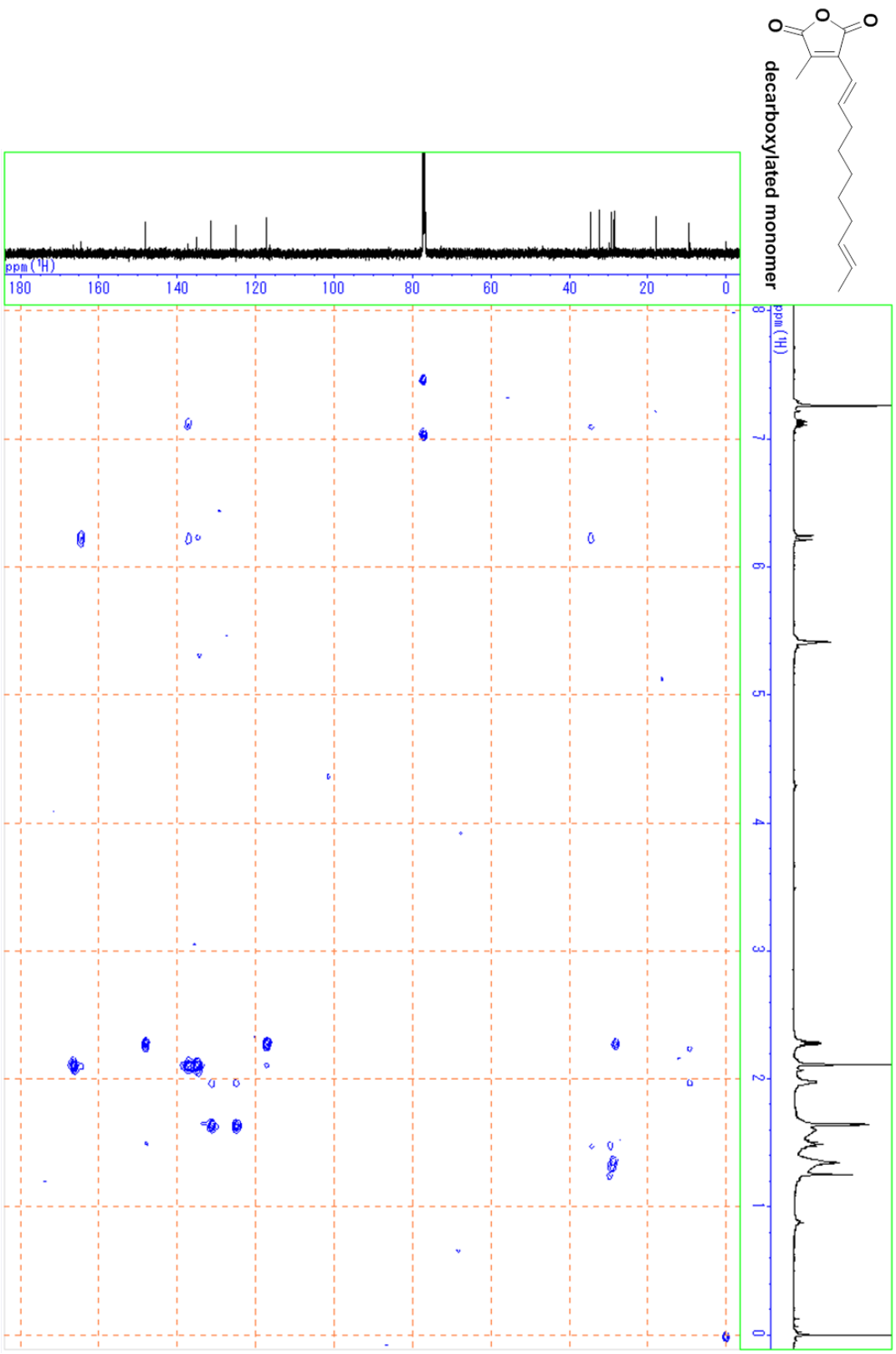
decarboxylated phomoidride type monomer **15** (H-H COSY)



decarboxylated phomoidride type monomer **15**(HSQC)

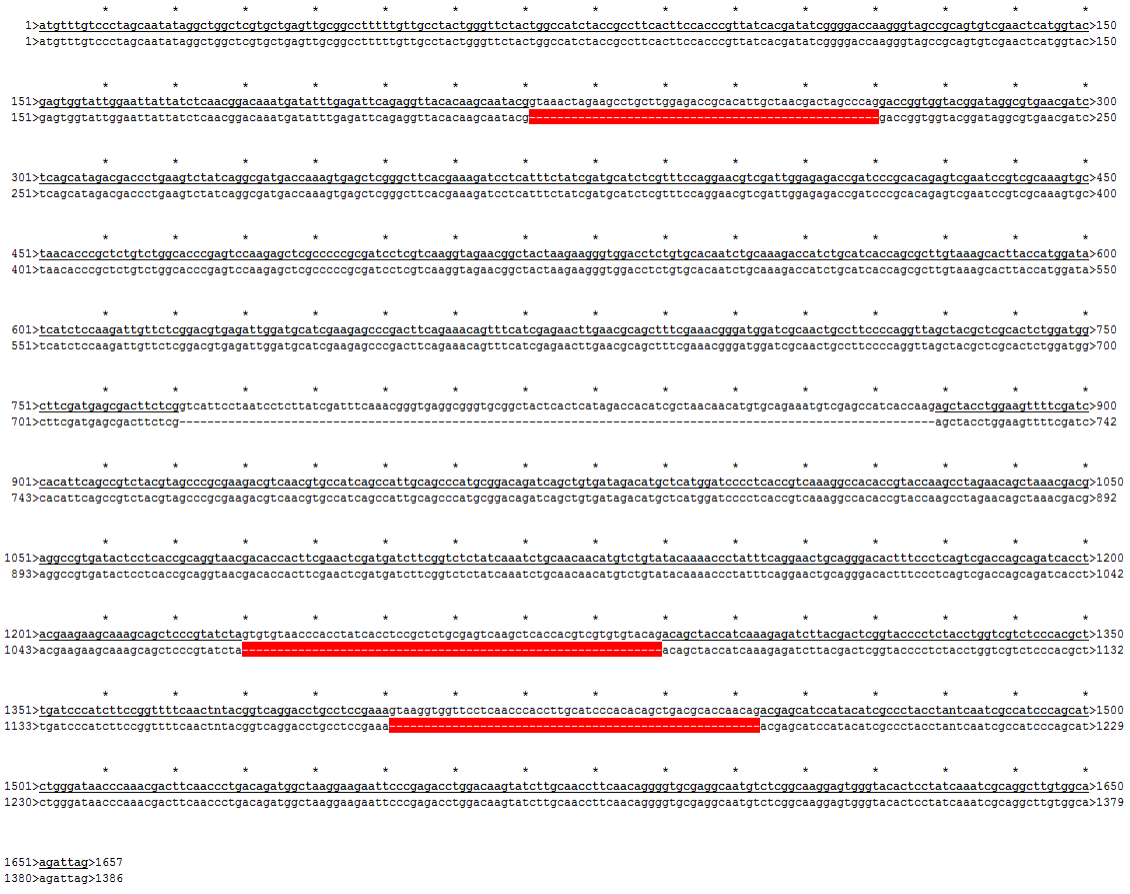


decarboxylated phomoidride type monomer **15** (HMBC)



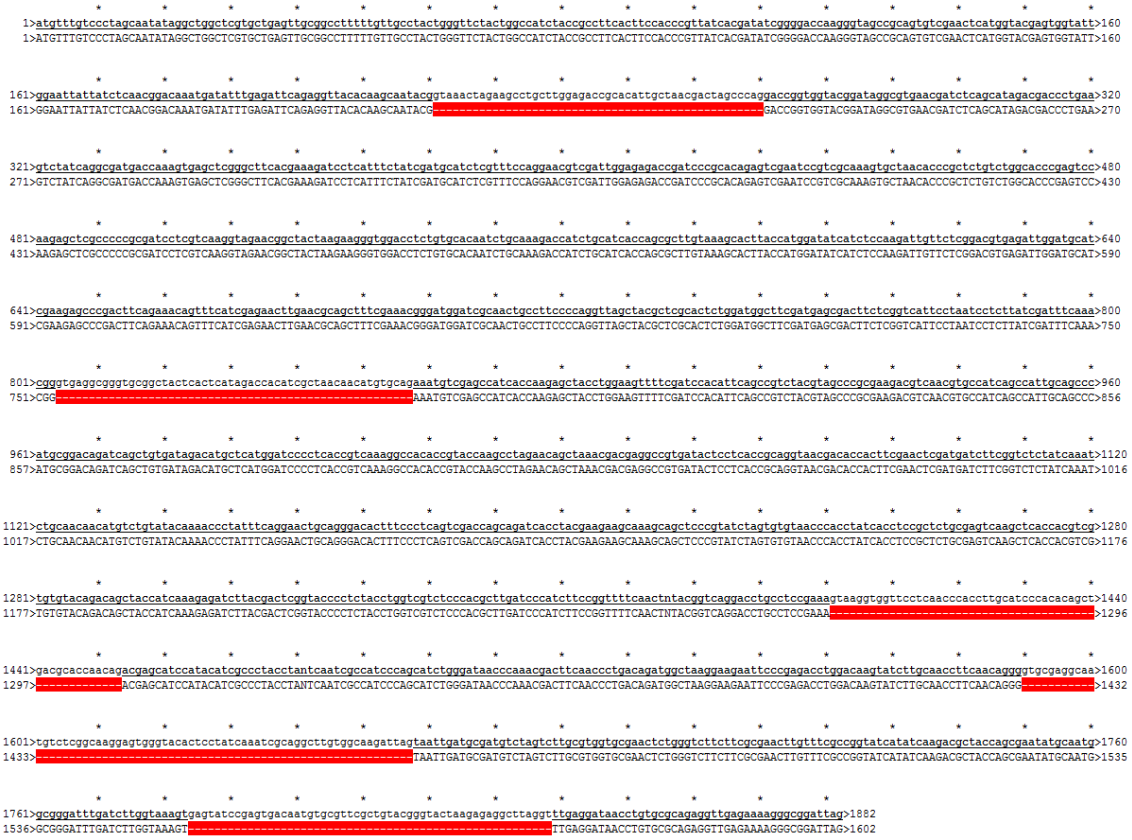
4-11. Predicted sequences of *sol6* gene by NCBI and 2ndFind

NCBI



Top: *sol6* with intron; bottom: *sol6* exon

2ndFind



Top: *sol6* with intron; bottom: *sol6* exon

参考文献

1 Kasahara, K.; Miyamoto, T.; Fujimoto, T.; Oguri, H.; Tokiwano, T.; Oikawa, H.; Ebizuka, Y.; Fujii, I., *Chembiochem* **2010,** *11* (9), 1245-1252.

2 Cha, J. Y.; Huang, Y.; Pettus, T. R. R., *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009,** *48* (50), 9519-9521.

3 Nawarathne, I. N.; Walker, K. D., *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 151-159.

5 章　総括

近年、DNA シーケンス技術が急速に進展するとともに、バイオインフォマティクスを駆使した、微生物ゲノム上に存在する天然物生合成遺伝子の同定法が開発され、多様な構造と生物活性を有する天然物の酵素合成が可能になりつつある。本研究では、*A. oryzae* 異種発現系を使用し、天然物の全生合成および、遺伝子の機能解析を行った。

A. oryzae 宿主は、20 年ほど前から糸状菌遺伝子の機能解析に用いられてきた実績があったが、複数遺伝子を同時発現した例は少なかった。本研究で用いた宿主 *A. oryzae* NSAR1 は、栄養要求性の 4 重変異株で、多数の遺伝子を同時に発現できる。ところが、二次代謝産物の生合成遺伝子を *A. oryzae* NSAR1 で異種発現した例は無く、以下の点において懸念がなされた；1) 他の糸状菌宿主と同様に、糸状菌遺伝子を正しく転写・翻訳できるか；2) 生成物の生理活性によって、ダメージを受けるか；3) 補完酵素が異種酵素に対して正しく働くか；4) 汎用性を示すにあたって、化合物種、菌種に対してどこまで許容できるか；5) 同じプロモーターで何個の遺伝子を同時発現できるか。

これらの懸念を取り除くため、aphidicolin と solanapyrine C の全生合成を行った(図 5-1)。その結果、以下のように多くのことがわかった；1) *A. oryzae* NSAR1 は糸状菌ゲノム DNA 由来の遺伝子を発現できる。2) 毒性のある化合物は、体外に排出するか、別の化合物に変換することで、ダメージを抑える；3) P450 の還元酵素や PKS の翻訳後修飾酵素など、補完酵素は異種タンパク質に対して問題なく機能する；4) テルペンだけでなく、ポリケタイドにも適用でき、化合物種に依存しない手法であるとともに、*Aspergillus* 属から遠縁の糸状菌遺伝子にも適用できる(図 5-2)；5) 同じプロモーターでは少なくとも 4 つの遺伝子は同時発現できる；6) 米培地を用いることで、常に発現を誘導でき、液体培地に比べて生産量が増加する；7) ポリケタイド系代謝産物に対しては、宿主による副反応が進行することもあるが、下流の酵素遺伝子を導入すれば、副反応を抑制できるといえる。このように、*A. oryzae* NSAR1 を用いた異種発現系は、汎用性が高く、有機合成に劣らない新たな天然物合成法となりうる。また、生合成中間体にもアクセスでき、天然物類縁体へと変換する目的でも使用可能である。

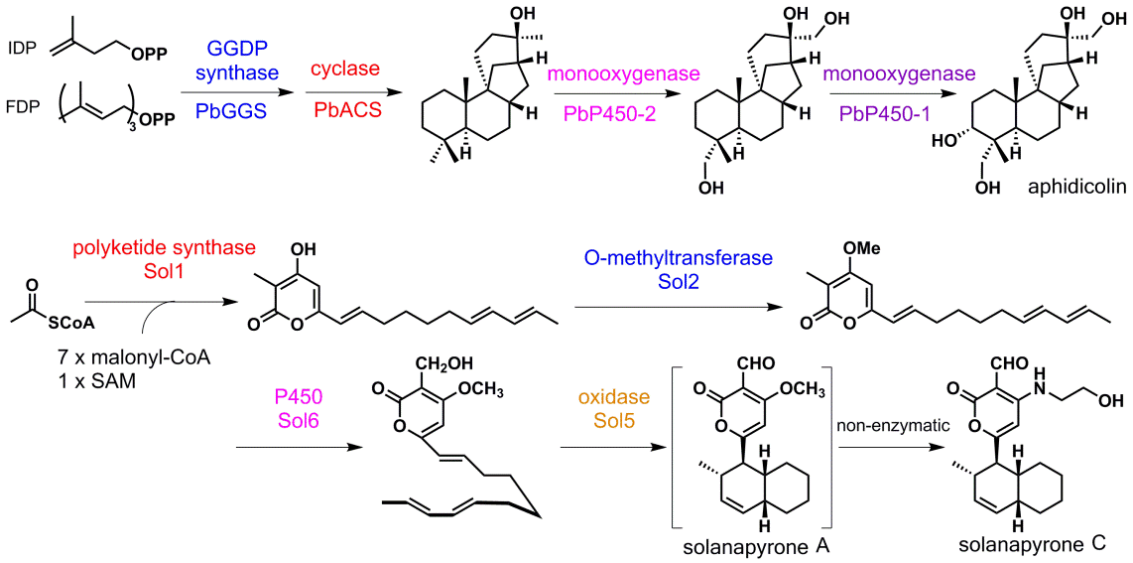


図 5-1.　aphidicolin および solanapyrone C の生合成経路

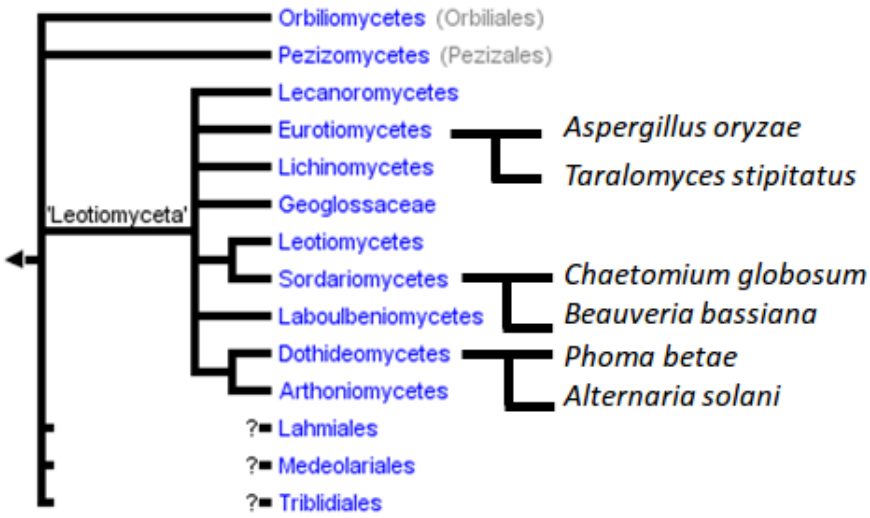


図 5-2.　糸状菌の系統樹解析

本研究では、検証した糸状菌遺伝子の異種発現法を用い、複雑な骨格を持つ天然物の生合成機構について知見を得た。cytochalasin 系天然物は、PKS-NRPS に作られた鎖状中間体から、Diels-Alder 反応を経由して生成すると推測されていたが、ジエノフィル部分の構築機構については 2 つの機構が提唱されていた。すなわち、還元を受けて PKS から切りだされ、アルデヒドとなった後、Knoevenagel 反応によってピロリノンを形成する経路と、Dieckmann 環化によって PKS から切りだされ、還元と脱水を経てピロリノンを生成する経路である。

本研究では、cytochalasin E の PKS-NRPS と ER を *A. oryzae* NSAR1 で異種発現し、予想した鎖状中間体がさらに還元を受けた化合物 **13** を単離した。この生合成機構を考えると、酵素からの切り出しは還元的に進行する経路が妥当であるといえる。同時に、Knoevenagel 反応は別の酵素が触媒することも判明した。次にジエノフィル部位の構築と、続く Diels-Alder 反応を触媒する酵素を特定するため、cytochalasin 系天然物の推定生合成遺伝子クラスターに高く保存されている機能未知タンパク質 CcsF の機能解析を検討した。その結果、PKS-NRPS から生成するアルデヒドは CcsF の基質にならないことが判明した。これにより、Knoevenagel 反応と Diels-Alder 反応を触媒する酵素は別々に存在し、過去の研究と合わせて考察することで、前者は CcsE によって触媒される可能性を見出した(図 5-3)。

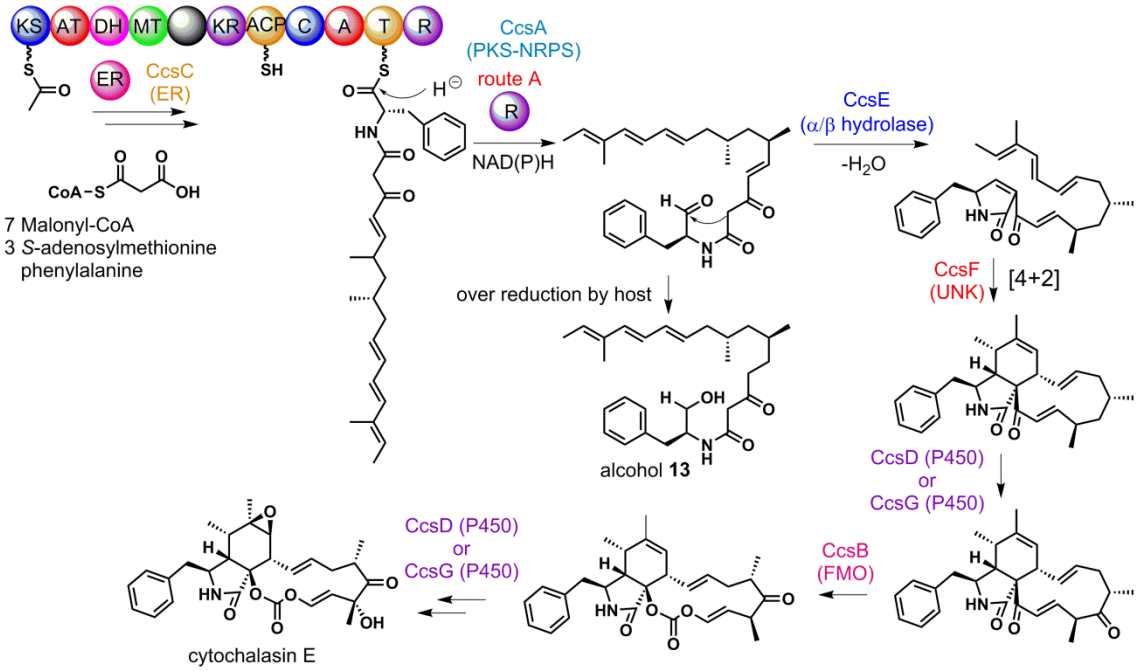


図 5-3.　cytochalasin E の推定生合成経路

最後に本研究では、nonadride 系天然物の生合成機構を解明するため、phomoidride の全生合成を検討した。nonadride 系天然物は、9 員環に付随する 2 つの無水マレイン酸構造を有しており、逆生合成解析から、この生合成には、無水マレイン酸を一つだけ持つモノマーの二量化が関与すると推定されていた。そして、このモノマーはオキサロ酢酸および脂肪酸の縮合によって生成することが Sulicowski や Sutherland らの同位体標識された前駆体の取り込み実験よって支持されていた。二量化の機構は、3 つの研究グループがそれぞれ予想したモノマーの同位体標識体を用いた取り込み実験を行ったが、全て実験結果を説明できる二量化機構は解明されていなかった。そこで本研究では、phomoidride

の生合成遺伝子を探索し、モノマーの生合成機構と二量化について検討することとした。初めに、アルキルクエン酸類の生合成経路を参考に、モノマーの生合成に関与する遺伝子を予測した。すなわち、オキサロ酢酸と PKS に連結したポリケタイドを基質に、CS がアルドール反応を触媒し、酵素から切り出す。その後 MCD が脱水反応を触媒し、無水マレイン酸部位を構築する。しかし、これまでに nonadride 系天然物の生合成遺伝子クラスターは特定されていなかった。そこで、phomoidride 生産菌 *Phoma* sp. (ATCC74256)のゲノム DNA を解析し、予想生合成経路に基づいて PKS と CS、MCD が近接している遺伝子クラスターを探索した。その結果、*phi* クラスターを発見し、これらの遺伝子 *phiA* (PKS)、*phiI* (MCD)、*phiJ* (CS)を *A.oryzae* NSAR1 で異種発現した。形質転換体の代謝産物を解析したところ、phomoidride 型モノマーの脱炭酸体 **15** を得た。このことから、標的とした遺伝子クラスターが phomoidride の生合成に関与することが判明した。同時に、無水マレイン酸構造を持つ化合物の生合成遺伝子クラスターには、一次代謝の CS とは相同性の低い CS 遺伝子が保存され、その周辺には、MCD および PKS が存在していることがわかった。次に、この知見を用いて、*T. stipitatus* の染色体上に眠る *phi* クラスターと相同性の高い遺伝子クラスターをゲノムマイニングした。標的とした *tst* クラスターの *tstA* (PKS)、*tstJ* (CS)、*tstI* (MCD)を異種発現し、代謝産物の構造を決定したところ、得られた化合物は、偶然にも *phiA*, *phiI*, *phiJ* を異種発現した時と同じ代謝産物 **15** であった。このことから、*tst* クラスターは phomoidride と似た酸無水物型二量体を生合成すると考えられる。

脱炭酸が発現した酵素によるものか、宿主の細胞内環境によるものかは不明であったため、*tstJ* および *tstI* を大腸菌で発現し、*in vitro* 実験を行った。酸無水物型モノマーの CS および MCD を大腸菌で活性試験した例は報告されておらず、脂肪酸 CoA エステルが基質として利用できるか、CS と MCD の連続反応は観測可能かといった問題点があった。活性試験の結果、TstJ および TstI は、鎖長 12、10、そして 8 の不飽和脂肪酸 CoA エステルを基質として変換し、脱炭酸前のモノマーを生成した。従って、TstJ はオキサロ酢酸とのアルドール反応の際、クエン酸合成酵素とは異なり、α位ではなくγ位のプロトンを引き抜くことで反応を触媒することが支持された。また、これにより、二量化の真の基質が脱炭酸しないモノマーであり、脱炭酸は酵素反応条件下では生じにくいことがわかった。

一方、二量化に必須な不飽和結合を持たないモノマー型天然物も単離されている。*A. niger* FH-X-213 は、asperanhydride を生産することが知られている。これは、PKS ではなく、脂肪酸合成酵素 FAS によって生合成されると考えられた。これまでの知見を踏まえ、ゲノム公開株の遺伝子情報を解析したところ、

CS と MCD の近傍に FAS が存在する *anh* クラスターを発見した。この遺伝子クラスターが側鎖に共役不飽和結合を持たないモノマーの典型的な生合成遺伝子クラスターであることを検証するため、この AnhJ と AnhI を大腸菌発現系での活性試験を行った。これらをコードする遺伝子を、一旦 *A. oryzae* NSAR1 で異種発現した後、cDNA を調製し、大腸菌発現用のベクターに組み込んだ。調製したこれらの酵素に飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸 CoA エステルを基質として添加したところ、鎖長 8 と 10 の脂肪酸 CoA エステルにおいてオキサロ酢酸との縮合が確認された。これにより、*anh* クラスターは asperanhydride の生合成に関与しているとわかった。その上、AnhJ は、α位のプロトンだけでなく、γ位のプロトンも引き抜け、OAA とのアルドール反応を触媒できると判明した。

最後に本研究では二量化反応に普遍的な反応機構を提唱した。すなわち、無水マレイン酸に共役した不飽和結合をもつモノマーA と、その脱炭酸体 B および C を考えることであらゆる酸無水物型二量体天然物の生合成機構を説明できる。このように、*in vivo* および *in vitro* の研究から、Sulikowski らの報告では明示されていなかったモノマーの生合成機構、脱炭酸のタイミング、二量化機構について知見を与えることができた（図 5-4）。

in vitro 実験を通して、脱炭酸する前のモノマーが主生成物として得られたことから、脱炭酸を伴う二量化反応は遺伝子クラスターに含まれる別の酵素が触媒すると考えられる。しかし、脱炭酸と二量化を一つの酵素が触媒するか否かは、今後の研究によって明らかになると期待される。

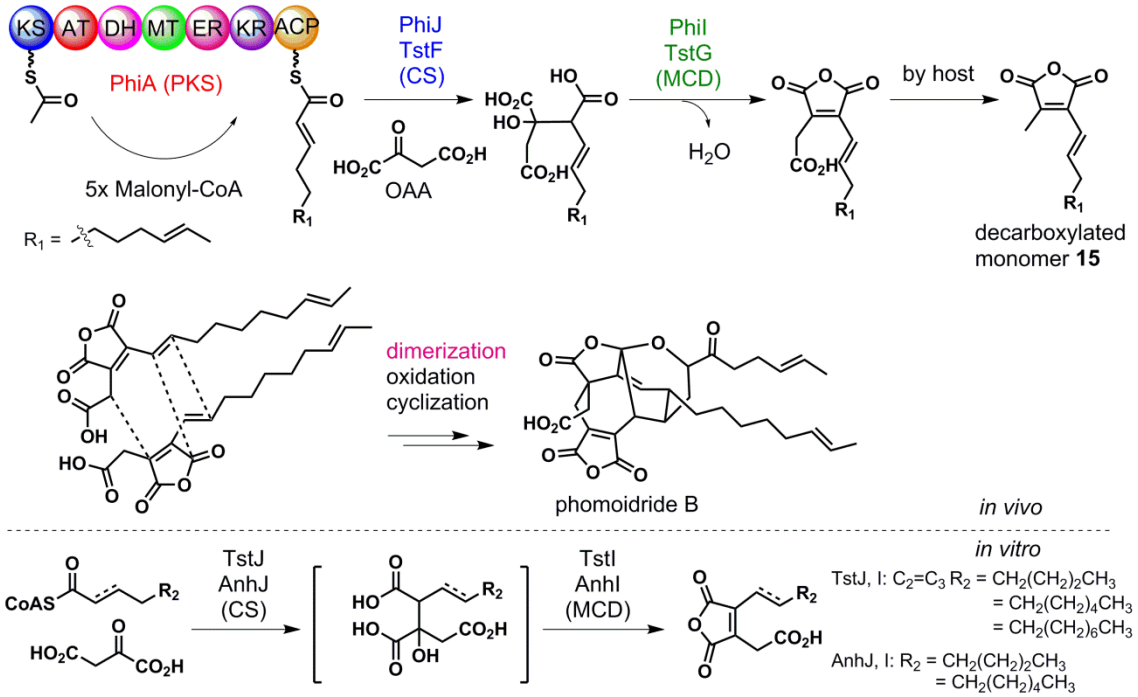


図 5-4.　*in vivo* および *in vitro* 実験によって解明されたモノマーの生合成機構

謝辞

研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院理学研究院　有機反応論研究室教授　及川英秋先生に心より感謝いたします。至らない私を時には厳しく指導し、時には任せてくれたことを通して、自分自身の成長を実感することが出来ました。ここで研究した経験は今後の人生でも大いに役立っていくと確信しております。

有機反応論研究室准教授　大栗博毅先生には、有機化学の深さを教えていただいたと共に、非常に有用な機器をいくつも使わせていただいたおかげで私の研究が加速したことを心より感謝いたします。

有機反応論研究室助教　南篤志先生には、大変有意義なご助言、ご指導を賜りました。ここに感謝いたします。

北海道大学大学院工学研究院　応用生物化学研究室教授　大利徹先生には、論文の審査委員として貴重なご意見を賜りましたほか、学会やシンポジウムなどでもご助言をいただいたことに心より感謝いたします。

東北大学大学院農学研究院の五味勝也教授には、麹菌の形質転換やベクターの改変についてお世話になりました。ここに深く感謝いたします。

麹菌宿主を提供してくださった、東京大学大学院農学生命科学研究科、北本勝ひこ教授およびsolanapyrone合成酵素遺伝子のプラスミドを提供してくださった、岩手医科大学薬学部、藤井勲教授に感謝いたします。

論文作成にあたり、審査委員として多くのご助言を頂きました、鈴木孝紀教授、谷野圭持教授には深く感謝いたします。

有機反応論研究室の皆様には、日々の生活の中で大変お世話になりました。ここに感謝いたします。

最後に、私を心身ともに支えてくださった、妻の奈緒美に心から感謝いたします。

2015年3月