



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	合成生物学的アプローチによる糸状菌由来セスタテルペンのゲノムマイニング
Author(s)	成田, 興司
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13239号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13239
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70103
Type	doctoral thesis
File Information	Koji_Narita.pdf



合成生物学的アプローチによる糸状菌由来
セスタテルペンのゲノムマイニング

北海道大学大学院 総合化学院 有機反応論研究室
成田 興司
2018 年 博士論文

目次

序章	p 1
序-1. 天然由来の生物活性テルペノイド	
序-2. 二機能性テルペン環化酵素の異種発現によるゲノムマイニング	
1 章 二機能性テルペン環化酵素の機能解析による新規セスタテルペンのゲノムマイニング	p 8
1-1. 二機能性テルペン環化酵素の系統樹解析	
1-2. 実験結果と考察	
1-2-1. クレード特異的なテルペン環化酵素の機能解析	
1-2-2. 新規セスタテルペンの推定環化機構	
1-2-3. NfSS に対する変異導入実験	
1-3. クレード A に属する二機能性環化酵素についての考察	
1-4. 1 章のまとめ	
2 章 テルペン環化体の酸化修飾による生物活性天然物の酵素的合成	p 38
2-1. テルペノイド生合成における修飾酵素遺伝子	
2-2. 実験結果と考察-クレード A 由来環化体の酸化修飾	
2-2-1. terpestacin 生合成遺伝子クラスターの機能解析	
2-2-2. terpestacin の推定生合成経路	
2-2-3. betaestacin 生合成遺伝子クラスターの機能解析	
2-3. 実験結果と考察-ophiobolin 類縁化合物の生合成研究	
2-3-1. ophiobolin 類縁化合物	
2-3-2. <i>Aspergillus clavatus</i> 由来修飾酵素遺伝子の機能解析	
2-3-3. <i>Bipolaris maydis</i> , <i>Emericella varicolor</i> 由来修飾酵素遺伝子の機能解析	
2-3-4. OblB の推定反応機構	
2-3-5. OblC _{Ac} (フラビン依存型酸化酵素)による 6 の推定生合成機構	
2-3-6. OblD (トランスポーター)についての考察	
2-4. 2 章のまとめ	
3 章 実験部	p 81
3-1. General	
3-2. Strains and culture condition	
3-3. Preparation of genomic DNA (gDNA) and complementary DNA (cDNA)	
3-4. Cloning and plasmids construction	
3-4-1. Construction of <i>A. oryzae</i> expression plasmids harboring <i>obl</i> genes	
3-4-2. Construction of <i>A. oryzae</i> expression plasmids harboring biosynthetic genes of sesterterpenoids	

- 3-4-3. Construction of *E. coli* expression plasmids harboring spliced *BmTS* genes
- 3-4-4. Construction of *E. coli* expression plasmids harboring mutated *NfSS* genes
- 3-5. Fungal transformation
- 3-6. Isolation and analysis of the metabolites
 - 3-6-1. Isolation and analysis of ophiobolins
 - 3-6-2. Isolation and analysis of Bm1, Bm3, and Pb1 from AO-transformants
 - 3-6-3. Isolation and analysis of Bm1, Bm2, and Bm3 from *E. coli* transformants
 - 3-6-4. Isolation and analysis of metabolites from EC-*NfSS* (mutants)
 - 3-6-5. Isolation and analysis of terpestacins and betaestacins
- 3-7. Chemical conversion of metabolites
 - 3-7-1. Chemical conversion of ophiobolines
 - 3-7-2. Chemical conversion of sesterterpenes
 - 3-7-3. Chemical conversion of preterpestacin III

序章

序-1. 天然由来の生物活性テルペノイド

テルペンは植物や微生物によって生産される主要な二次代謝産物のひとつである。現在までにおよそ 4 万種類ものテルペンが自然界から単離されており^{1,2}、その半数以上は植物由来であるといわれている。いくつかの代表例を Fig. 1-1 に示しており、その化学構造に注目すると、中/大員環を含む特徴的な多環性骨格に対し酸素官能基が選択的に導入された複雑な三次元構造をもつことがわかる。これらの中には顕著な生物活性を示すものが数多く知られており、主に医薬品として利用されている。例えば、1972 年にクソニンジンから単離された **artemisinin** はマラリアに対する特效薬として世界的に用いられ、発見者である Tu は 2015 年にノーベル生理学・医学賞を受賞した³。また、タイヘイヨウイチイの樹皮から単離された **taxol**⁴は臨床用抗癌剤として利用されているほか、植物ホルモンである **gibberellin** は種なしブドウ生産用の成長調節剤として用いられている⁵。このように多様な化学構造や生物活性を持つことから、多くの化学者が全合成研究などの標的化合物として注目してきた。しかしながら、一般に複雑な構造の天然物を化学合成的に供給することは困難であり、**taxol** はイチイや培養細胞からの抽出によって供給されている。一方、抗マラリア薬である **artemisinin** に関しては酵母による前駆体の発酵生産を利用した半合成法により大量供給が可能になった⁶。このような生合成を活用した手法は天然物の量的供給において有効であると考えられ、そのためには標的となる天然物の生合成経路の解明が重要である。

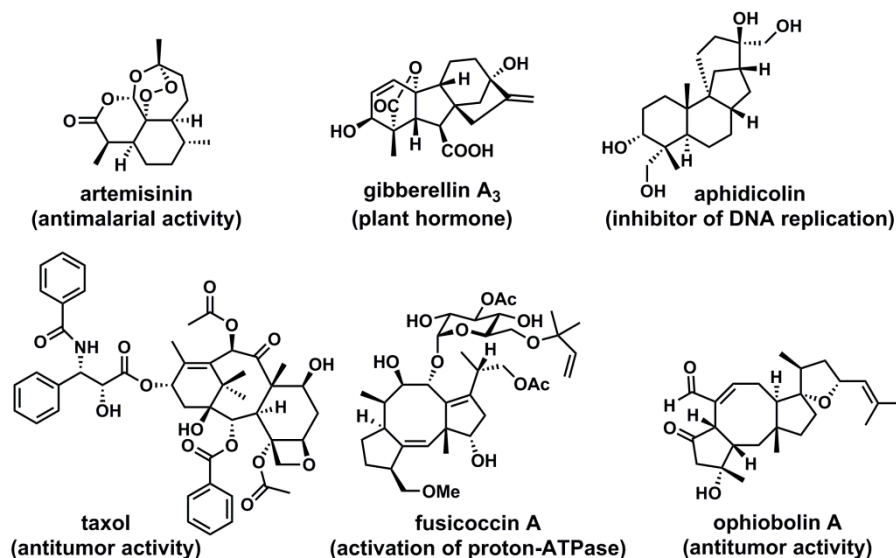


Fig. 1 天然由来の生物活性テルペノイド

テルペンの生合成機構は、主に骨格構築と酸化修飾の二段階に集約される(Fig. 2)。まず、生体内に普遍的に存在する炭素数 5 のイソプレンユニットであるイソペンテニルニリン酸(IPP)およびジメチルアリルニリン酸(DMAPP)を基質として、プレニル基転移酵素によって鎖状前駆体が合成される。ファルネシルニリン酸(FPP)合成酵素はほぼすべての生物種の一次代謝経路に保存されているのに対し、ゲラニルゲラニルニリン酸(GGPP)やゲラニルファルネシルニリン酸(GFPP)の合成には FPP からさらに炭素鎖を伸長するためのプレニル基転移酵素が必要である。この過程

において IPP の導入数の違いによって炭素鎖長が制御されており、炭素数 10, 15, 20, 25, 30 のテルペンはそれぞれモノテルペン、セスキテルペン、ジテルペン、セスタテルペン、トリテルペンと呼ばれる。続いて環化酵素によって多様な環構造が形成され、母骨格が構築される。この環化酵素は反応機構の違いにより class I と class II に分類され、前者では二リン酸の脱離によって生じたカルボカチオンを起点として環化反応が進行し、後者では二重結合のプロトン化を起点として環化が進行する⁷。例えばイチイにおける taxol の生合成では、class I に属する環化酵素 TXS がタキササン型骨格をもつジテルペン taxadiene を与える⁸(Fig. 3)。一方、イネにおける gibberellin 生合成では class II と class I の環化酵素が連続的に働くことでラブダン型骨格をもつジテルペン *ent*-kaurene を与える⁹(Fig. 3)。また、バクテリアからも *ent*-kaurene の様なラブダン型ジテルペン合成酵素¹⁰が見つかっている他、cyclooctat-9-en-7-ol 合成酵素 CotB2 (class I)¹¹などの機能解析例が報告されている(Fig 4)。糸状菌からはセスキテルペン aristolochene を与える環化酵素 (class I)¹²や、ジテルペン aphidicolan-16 β -ol を与える AbACS (class I, II のハイブリッド)¹³などが同定されている(Fig. 5)。

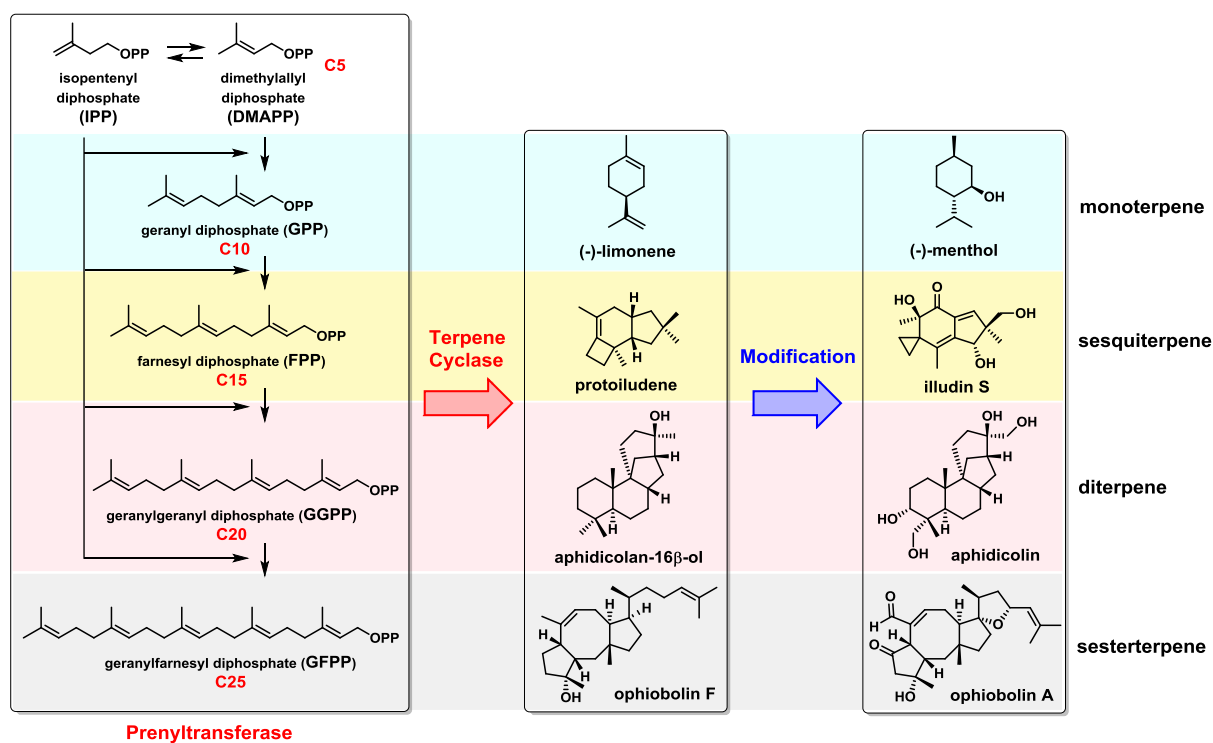
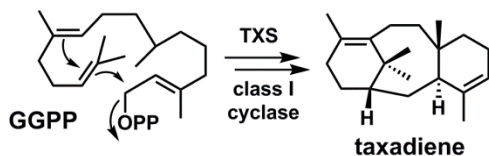


Fig. 2 テルペノイド生合成機構の概説図

< taxane-type diterpene >



< labdane-type diterpene >

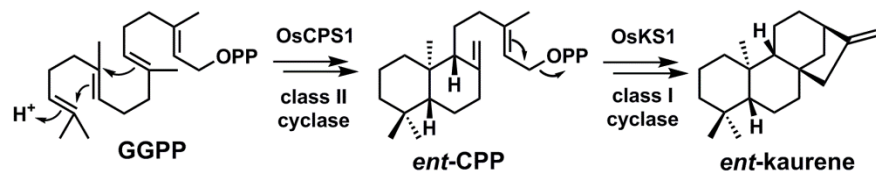
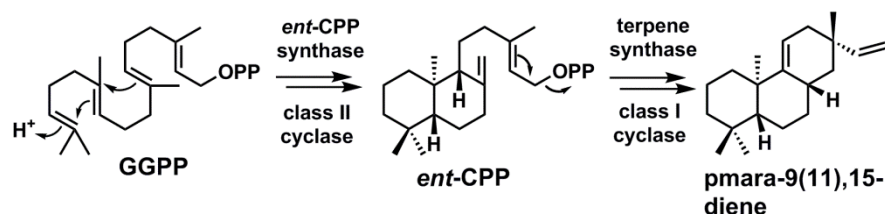


Fig. 3 植物由来のジテルペン環化酵素

< labdane-type diterpene synthase >



< cyclooctat-9-en-7-ol synthase (CotB2) >

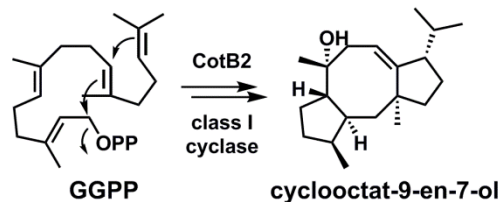
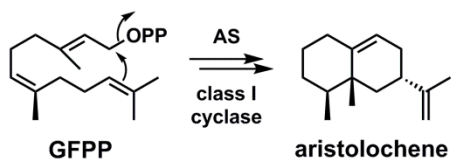


Fig. 4 バクテリア由来のジテルペン環化酵素

< aristolochene synthase >



< aphidicolan-16β-ol synthase (PbACS) >

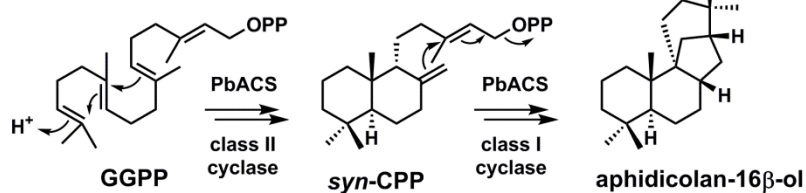


Fig. 5 糸状菌由来のテルペン環化酵素

生成した環化体は、種々の修飾酵素遺伝子によって様々な官能基が導入されることで天然物が生合成される。例えば、1997-2008 年にかけて **gibberellin** 生合成遺伝子に関する研究が複数の研究グループによって行われ、植物と糸状菌とではそれぞれ異なる酸化修飾機構によって **gibberellin** が生合成されていることが明らかにされた¹⁴。また、2011 年には当研究室の藤居によって麹菌異種発現系による **aphidicolin** 生合成クラスターの同定がなされ、初のジテルペン全生合成が達成された¹⁵。また、最近イギリスの研究グループおよび当研究室の山根らによって担子菌由来のジテルペン **pleuromutilin** の生合成遺伝子クラスターの同定・機能解析が行われた^{16,17}(Fig. 6)。このようにテルペンの分子構造および生物活性の多様性は、炭素鎖長や環化様式、官能基のバリエーションによって生じている。

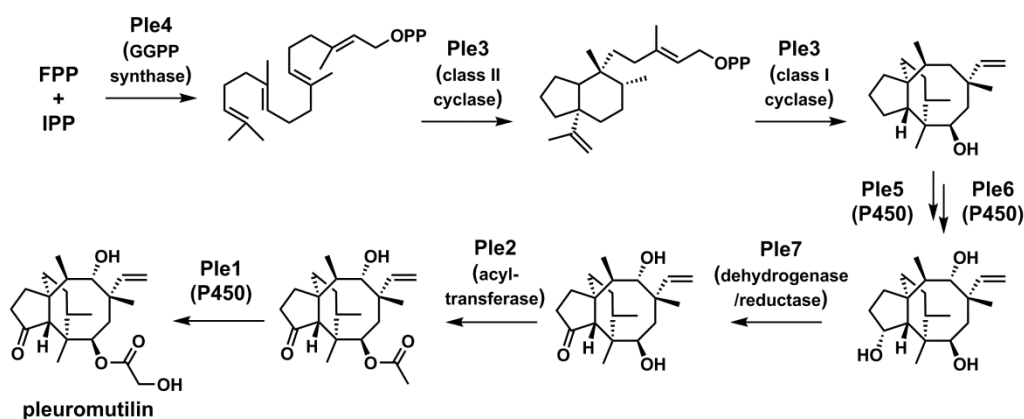


Fig. 6 pleuromutilin 推定生合成経路

前述の通り、ジテルペンについては骨格構築機構および酸化修飾機構を含む生合成経路の全容が解明されている例が少ないながらも報告されている。一方、天然由来のセスタテルペンとしては **ophiobolin** や **terpestacin**, **retigeranic acid**, **mangicol** などユニークな多環性骨格を有するものが単離されているものの^{18,19}(Fig. 7)、後述の **ophiobolin F** 合成酵素が 2013 年に発見されるまで、これらの生合成に関与する環化酵素および修飾酵素については機能解析例がなかった。このことから、テルペノイドの中でもセスタテルペンの生合成研究は特に遅れているのが現状であるといえる。

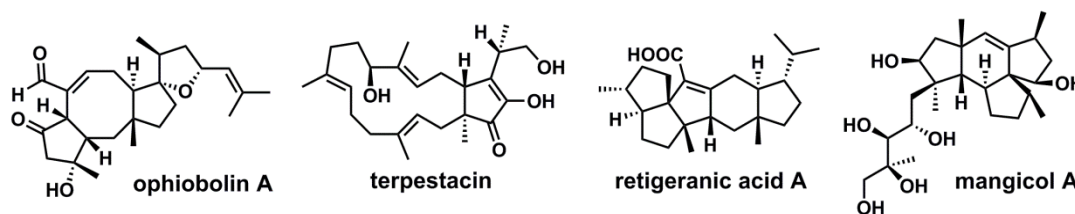


Fig. 7 天然由来のセスタテルペンの例

序・2. 二機能性テルペン環化酵素の異種発現によるゲノムマイニング

一般に、テルペノイドの炭素骨格構築段階においてプレニル基転移酵素と環化酵素は別々に存在している。しかしながら、これらが融合した二機能性テルペン環化酵素も近年見つかっている。2007年に山形大学の豊増・佐々らは、糸状菌 *Phomopsis amygdali* から世界初の二機能性環化酵素 PaFS を同定した²⁰。本酵素は FPP と IPP を基質として、C 末端側のプレニル基転移ドメインと N 末端側の環化ドメインが炭素鎖の伸長と環化を一挙に触媒することでジテルペンである fusicocca-2,10-diene を生合成する (Fig. 8)。PaFS は X 線結晶構造解析も行われており²¹、さらにその環化機構については同位体標識基質を用いた *in vitro* 解析により明らかにされた²² (Fig. 9)。まず、class I の環化酵素と相同性を示す環化ドメインにより、環化前駆体 GGPP から二リン酸が脱離することでカルボカチオンが生じる。次いで 1-11 位、10-14 位間で環化反応が進行し、11-5 員環をもつ中間体 A が形成される。その後水素移動に伴うカルボカチオンの転位を繰り返し、2-6 位間の環化によって 5-8-5 員環をもつ fusicocca-2,10-diene が生成する。

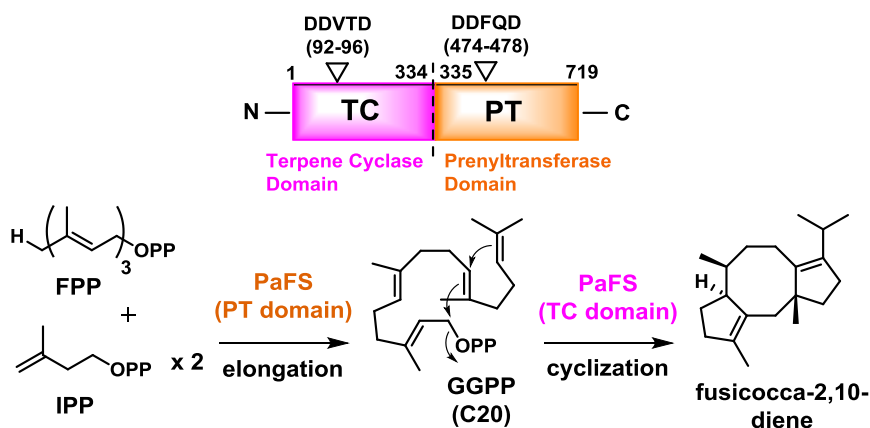


Fig. 8 fusicocca-2,10-diene 生合成酵素 (PaFS)

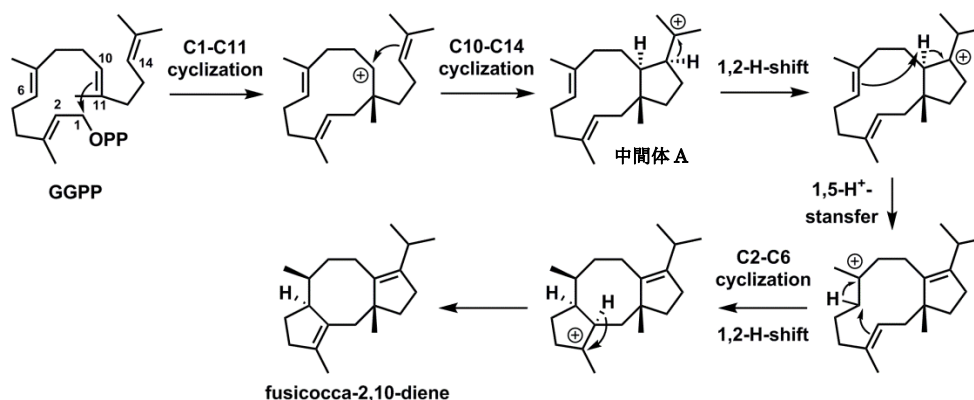


Fig. 9 PaFS による fusicocca-2,10-diene 合成機構

さらに、2009 年には同グループによって特徴的な四環性骨格をもつジテルペンである **phomopsene** を与える **PaFS** が発見された²³。その反応機構については我々の研究グループによって同位体標識前駆体を用いた詳細な解析が行われており、**PaFS** と同様に中間体 A を経て四環性骨格が構築されることが明らかにされた²⁴(Fig. 10)。また、当研究室の千葉、叶らは **PaFS** のホモログを標的として麹菌発現系を用いたゲノムマイニングを行い、*Aspergillus clavatus*, *Neosartorya fischeri* からそれぞれ炭素数 25 の **ophiobolin F**, **sesterfisherol** を与える **AcOS**²⁵, **NfSS**²⁶を見出した。**AcOS** はセスタテルペン合成酵素としては世界初の発見であり、**PaFS** と同様に中間体 A を経由して 5・8・5 員環骨格を与えると推定された。これに対して **NfSS** は初めに 15・5 員環骨格を形成し、その後 5・8・6 員環を順次形成することで四環性骨格を与えるという反応機構が提唱された (Fig. 10)。これらの発見以降、ゲノムマイニングによる二機能性ジ/セスタテルペン環化酵素の解析が急速に行われている。東京大学の研究グループは *Emericella varicolor*, *Penicillium* 属菌から 5 種の二機能性環化酵素(**EvAS**²⁷, **EvSS**²⁸, **PvPS**³¹, **EvVS**²⁹, **EvQS**³⁰, **PbSS**³¹)およびそれらの与える新規生成物(**astellifadiene**, **stellate-2,6,19-triene**, **variediene**, **quannulatene**, **sesterbrasiliatriene**)を取得した(Fig. 11)。

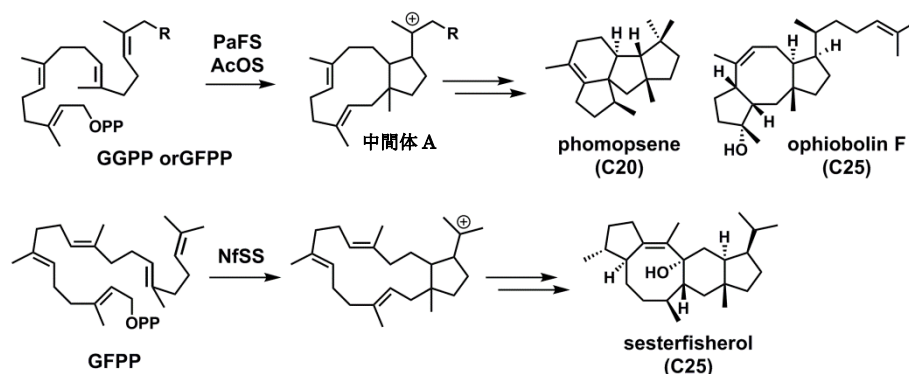


Fig. 10 PaFS, AcOS, NfSS の反応機構

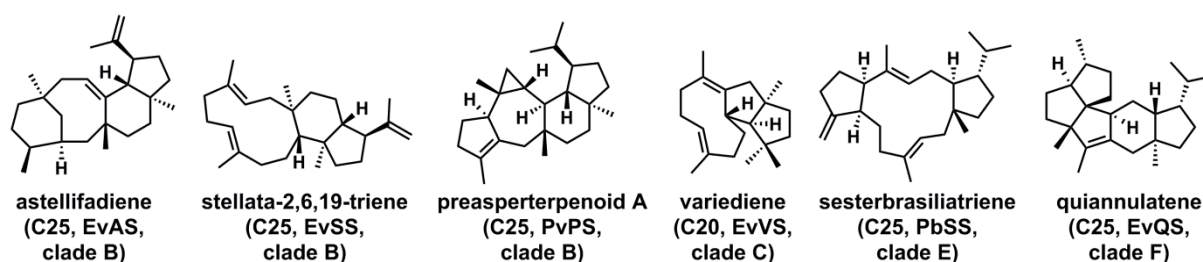


Fig. 11 *E. varicolor*, *P. brasilianum* 由来二機能性環化酵素およびその生成物

以上の結果から、二機能性環化酵素は、中/大員環を含む骨格やユニークな多環性骨格を与えること、機能解析例の少ないセスタテルペンを与えることが期待され、新規テルペノイド探索を行う上で非常に魅力的な標的であると考えられた。そこで 1 章では、糸状菌ゲノム上に眠る機能未知の二機能性環化酵素を探索し、それを強制発現させることにより物質生産を行うこと(ゲノムマイニング)を目的とした。さらに 2 章では、取得した環化体の酸化修飾による既知および新規天然物の異種生産を試みた。

参考文献

- ¹ Dictionary of natural products (2004) Version 8.1 (HRD), 1st edn. Chapman & Hall, London, UK
- ² Roberts, S. C. *Nat. Chem. Biol.* **2007**, *3*, 387-395.
- ³ Su, X.; Miller, L. H. *Sci. China Life Sci.* **2015**, *58*, 1175-1179.
- ⁴ Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 2325-2327.
- ⁵ Kishi, N.; Tasaki, M. *Agr. and Hort.* **1960**, *35*, 381-384.
- ⁶ Paddon, C. J. *et al. Nature*, **2013**, *496*, 528-532.
- ⁷ Christianson, D. W. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412-3442.
- ⁸ Xiaoyan Lin, X.; Hezari, M.; Koepp, A. E.; Floss, H. G.; Croteau, R. *Biochemistry*, **1996**, *35*, 2968-2977.
- ⁹ Kanno, Y.; Otomo, K.; Kenmoku, H.; Mitsuhashi, W.; Yamane, H.; Oikawa, H.; Toshima, H.; Matsuoka, M.; Sassa, T.; Toyomasu, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2006**, *70*, 1702-1710.
- ¹⁰ Ikeda, C.; Hayashi, Y.; Itoh, N.; Seto, H.; Dairi, T. *J. Biochem.* **2007**, *141*, 37-45.
- ¹¹ Kim, S.; Zhao, P.; Igarashi, M.; Sawa, R.; Tomita, T.; Nishiyama, M.; Kuzuyama, T. *Chem. Biol.* **2009**, *16*, 736-743.
- ¹² Proctor, R. H.; Hohn, T. M. *Printed in U.S.A.* **1993**, *268*, 4543-4546.
- ¹³ 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.
- ¹⁴ Tudzynski, B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2005**, *66*, 597-611.
- ¹⁵ Fujii, R.; Minami, A.; Tsukagoshi, T.; Sato, N.; Sahara, T.; Ohgiya, S.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1813-1817.
- ¹⁶ Bailey, A. M.; Alberti, F.; Kilaru, S.; Collins, C. M.; Mattos-Shipley, K.; Hartley, A. J.; Hayes, P.; Griffin, A.; Lazarus, C. M.; Cox, R. J.; Willis, C. L.; O'Dwyer, K.; Spence, D. W.; Foster, G. D. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 25202-25212.
- ¹⁷ Yamane, M.; Minami, A.; Liu, C.; Ozaki, T.; Takeuchi, I.; Tsukagoshi, T.; Tokiwano, T.; Gomi, K.; Oikawa, H. *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 2317-2322.
- ¹⁸ Hanson, J. R. *Nat. Prod. Rep.* **1996**, *6*, 529-535.
- ¹⁹ Liu, Y.; Wang, L.; Zhang, S. *Nat. Prod. Rep.* **2007**, *24*, 1401-1429.
- ²⁰ Toyomasu, T.; Tsukahara, M.; Kaneko, A.; Niida, R.; Mitsuhashi, W.; Dairi, T.; Kato, N.; Sassa, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 3084-3088.
- ²¹ Chen, M.; Chou, W. K. W.; Toyomasu, T.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 889-899.
- ²² Toyomasu, T.; Tsukahara, M.; Kenmoku, H.; Anada, M.; Nitta, H.; Ohkanda, J.; Mitsuhashi, W.; Sassa, T.; Kato, N. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3044-3047.
- ²³ Toyomasu, T.; Kaneko, A.; Tokiwano, T.; Kanno, Y.; Kanno, Y.; Niida, R.; Miura, S.; Nishioka, T.; Ikeda, C.; Mitsuhashi, W.; Dairi, T.; Kawano, T.; Oikawa, H.; Kato, N.; Sassa, T. *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 1541-1548.
- ²⁴ Sandip S Shinde, S. S.; Minami, A.; Chen, Z.; Tokiwano, T.; Toyomasu, T.; Kato, N.; Sassa, T.; Oikawa, H. *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 632-638.
- ²⁵ Chiba, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594-597.
- ²⁶ Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, C.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846-11853.
- ²⁷ Matsuda, Y.; Mitsuhashi, T.; Quan, Z.; Abe, I. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4644-4647.
- ²⁸ Qin, B.; Matsuda, Y.; Mori, T.; Okada, M.; Quan, Z.; Mitsuhashi, T.; Wakimoto, T.; Abe, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-5.
- ²⁹ Matsuda, Y.; Mitsuhashi, T.; Lee, S.; Hoshino, M.; Mori, T.; Okada, M.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Fujita, M.; Abe, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5785-5788.
- ³⁰ Okada, M.; Matsuda, Y.; Mitsuhashi, T.; Hoshino, S.; Mori, T.; Nakagawa, K.; Quan, Z.; Qin, B.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Kawaide, H.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10011-10018.
- ³¹ Mitsuhashi, T.; Rinkel, J.; Okada, M.; Abe, I.; Dickschat, J.S. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 10053-10057.

1 章 二機能性テルペン環化酵素の機能解析による新規セスタテルペンのゲノマイニング

1-1. 二機能性テルペン環化酵素の系統樹解析

序章にて述べた通り、二機能性テルペン環化酵素はジテルペンやセスタテルペン合成において鍵となる酵素である。単独発現により特徴的な多環性骨格が得られる点や、その酸化生成物が顕著な生物活性を示す点から、新規天然物探索における有力な標的である。また、環化に関与し得る反応点の多いセスタテルペン骨格において、その環化機構がどのように制御されているのかについても大変興味を持たれる。これに対して具体的な知見を得るためには、より多くの環化酵素について詳細な機能解析を行う必要がある。

ゲノマイニングの標的遺伝子を決定するために、公開ゲノムデータベース上に登録されている糸状菌由来の機能未知二機能性テルペン環化酵素を 114 種選択し、これらの環化ドメインについて系統樹解析を行った(Fig. 1-1)。その結果、クレード A~F に分類され、特にクレード A, B は全体のおよそ 50%を占める主要なクレードであることがわかった。過去に機能解析が行われた環化酵素のうち PaFS, PaPS, AcOS の 3 種はクレード B に、NfSS はクレード A に属している¹。また、近年東京大学の研究グループによって機能解析が行われた EvAS, EvSS はクレード B、EvVS はクレード C、EvQS はクレード F に属している^{2,3,4,5}(Fig. 1-2)。カビやキノコのセスキテルペン環化酵素においては、アミノ酸配列相同性と環化機構との関連性が指摘されていることから⁶、クレード B に属する環化酵素の環化機構に着目したところ、それぞれ初発の環化様式が共通しており、環化前駆体の 1 位から数えて 3 番目と 4 番目の二重結合が 1 段階目の環形成に関与していることがわかる(Fig. 1-3, Type B)。これに対し、クレード A に属する NfSS の場合は 4 番目と 5 番目の二重結合が初めの環化に関与している(Fig. 1-3, Type A)。このことから、二機能性環化酵素の環化ドメインにおいても、アミノ酸配列の相同性と環化機構には関連性があるのではないかと予想された。この相関について調べることは、環化様式の制御機構について体系的な理解を得る上で重要であると考えられる。

そこで、機能解析例が NfSS の 1 例のみである主要なクレード A に着目し、これに属する環化酵素について網羅的な機能解析を行うこととした。114 種の候補遺伝子のうち、*Bipolaris maydis* C5 株のゲノムから発見された遺伝子が 4 種(ophiobolin F 合成酵素 OblA_{Bm} も含めると計 5 種)存在しており、その内 3 種(BmTS1, 2, 3)がクレード A に、BmTS4 がクレード C に属していた。これらの環化ドメインについて、BmTS1, 2, 3 は NfSS と 30%以上の相同性(identity)を示したのに対し、AcOS との相同性は 30%未満であることから、30%という相同性がクレードの境界を定める上でひとつの判断基準になるのではないかと考えられる(Table 1-1)。*B. maydis* のように 5 種以上の環化酵素を持つ糸状菌は珍しく、他に知られているのは *Emericella varicolor* のみである。*E. varicolor* のもつ環化酵素 EvAS (クレード B), EvVS (クレード C)などは全て異なる生成物を与えていることから、BmTS1, 2, 3, 4 からそれぞれ新たな生成物が得られると期待されたため、これらを標的として機能解析を行うこととした。また、*Phoma betae* PS-13 株由来の PbTS もクレード A に属しており、当研究室の工藤によってその機能解析が行われた。本章では PbTS に関する実験結果および考察についても併せて記載する。

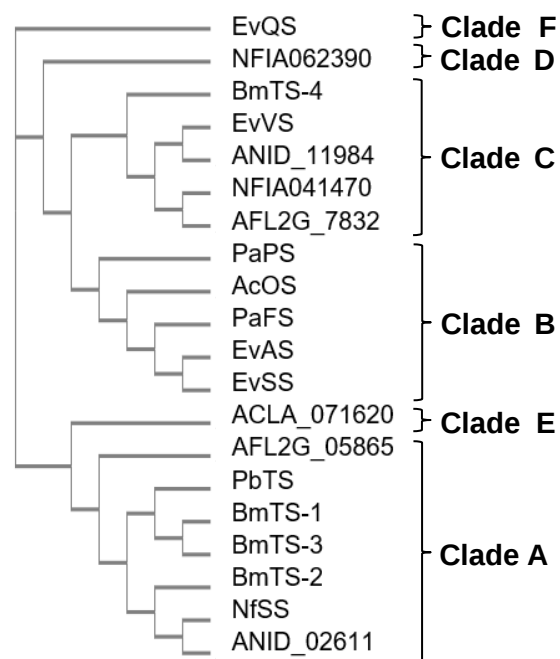
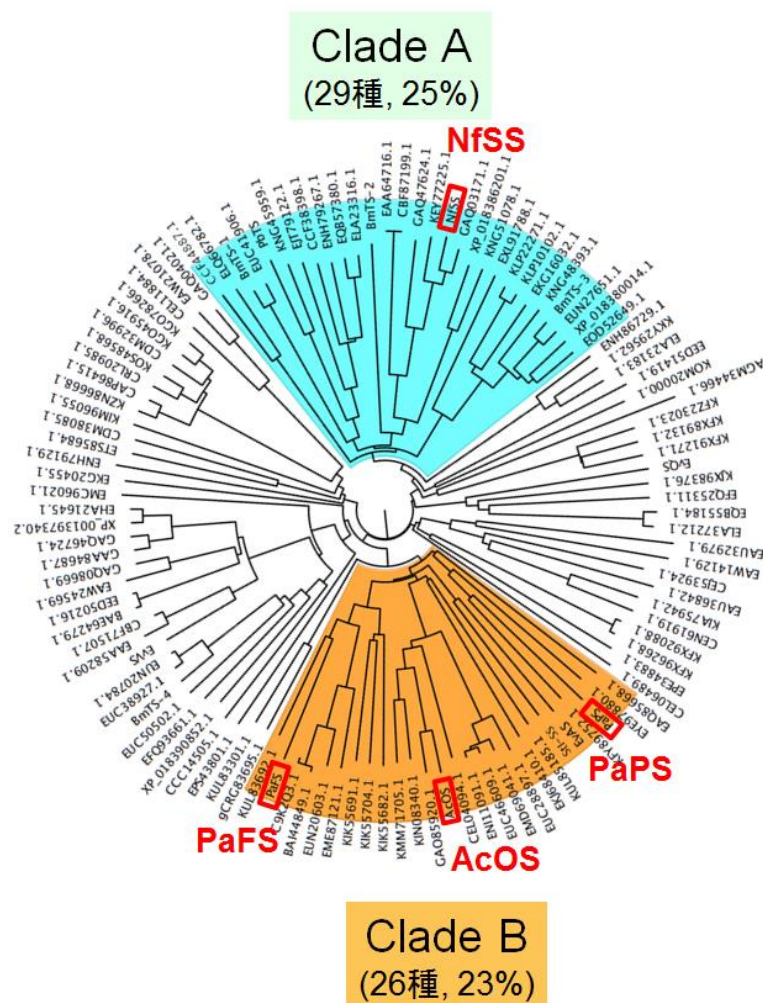


Fig. 1-1 二機能性環化酵素遺伝子の系統樹解析

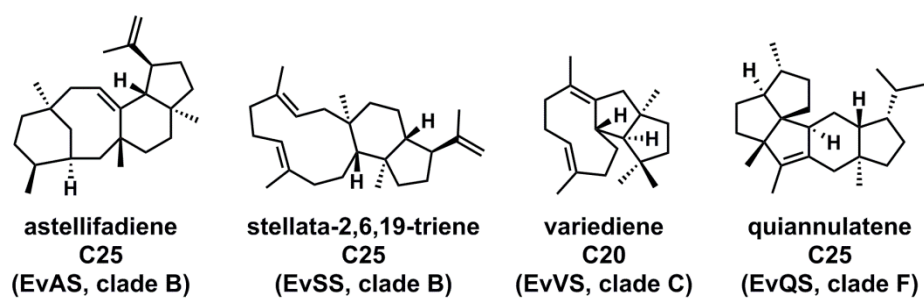
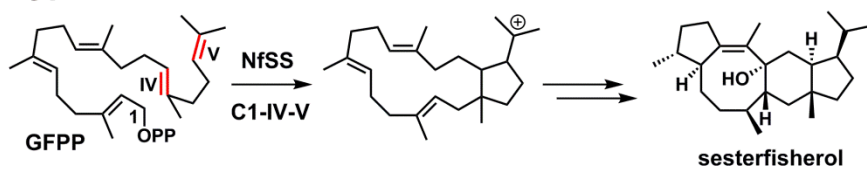


Fig. 1-2 *E. varicolor* 由来の環化酵素(EvAS, EvSS, EvVS, EvQS)が与える生成物

Type A



Type B

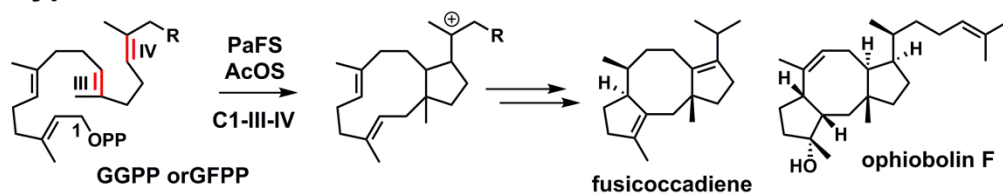


Fig. 1-3 クレード A, B の環化酵素における初発の環化様式

gene	BmTS1	BmTS2	BmTS3	PbTS	PaFS	PaPS
identity/similarity (%) with AcOS	23/58	26/56	26/57	22/55	39/65	33/64
identity/similarity (%) with NfSS	38/68	39/71	38/68	30/62	25/58	24/54

Table 1-1. クレード A, B に属する環化酵素の相同性比較

1-2. 実験結果と考察

まず、麹菌異種発現系を利用して標的遺伝子の機能解析を行った。*B. maydis* C5 株, *P. betae* PS-13 株からそれぞれ *BmTS1,2,3,4* および *PbTS* をそれぞれクローニングし、発現用ベクター *BmTS1/2*-pUARA2, *BmTS3/4*-pUSA2, *PbTS*-pTAex3 を調製した。これを用いて 4 重形質転換体 AO-*BmTS1/2/3/4* および単独発現株 AO-*PbTS* を構築し、米培養によって得られた代謝産物を解析した。GC-MS 分析の結果、AO-*BmTS1/2/3/4* からは 3 つの新たな生成物が確認され、これらを Bm1, Bm2, Bm3 とした (Fig. 1-4)。AO-*PbTS* からは 1 つの新たな生成物が確認され、これを Pb1 とした。Bm1, Bm2, Pb1 は m/z 340 で観測され、HR-MS から分子式を $C_{25}H_{40}$ と決定し、Bm3 は m/z 358 で観測され、HR-MS から分子式を $C_{25}H_{42}O$ と決定した (Fig. 1-5)。形質転換体の大量培養により、Bm1, Bm3, Pb1 をそれぞれ米培地 1 kg あたり 40 mg, 2.5 mg, 14 mg 単離した (Fig. 1-6)。Bm2 の生産量はごく微量であったことから、AO-*BmTS1/2/3/4* からは単離できなかった。

続いて、AO-*BmTS1/2/3/4* においてどの遺伝子がどの化合物を生産しているのか対応づけるため、それぞれ大腸菌発現系による生産確認を行った。AO-*BmTS1/2/3/4* から全 RNA を抽出し、cDNA へ逆転写することで *BmTS1*, 2, 3 のエキソン配列を取得した。これらを用いて発現用プラスミド *BmTS1*-pColdI, *BmTS2*-pColdI, *BmTS3*-pColdI をそれぞれ調製し、大腸菌発現系 EC-*BmTS1*, EC-*BmTS2*, EC-*BmTS3* を構築した (Fig. 1-7)。各発現株を酵素発現条件下で培養し、菌体から抽出した代謝産物を GC-MS によって分析したところ、EC-*BmTS1* が Bm1 を、EC-*BmTS2* が Bm2 を、EC-*BmTS3* が Bm3 を生産していることが確認された (Fig. 1-4)。これにより、各遺伝子と生成物とを対応づけることができ、さらに EC-*BmTS2* の大量培養により培地 9.6 L から Bm2 を 1.2 mg 単離することに成功した。これら 4 種の生成物について、NMR による構造解析を行った (Table 1-2)。

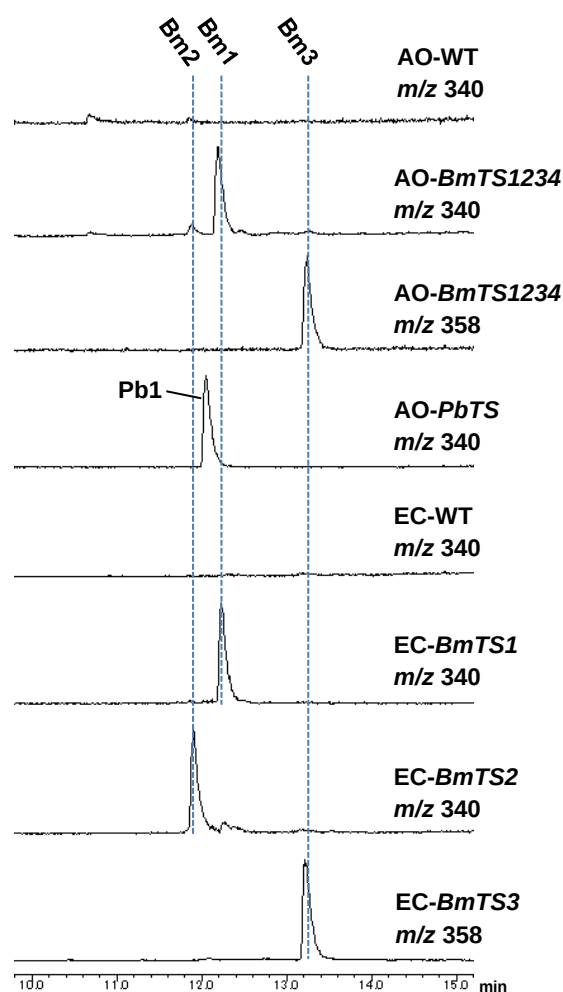


Fig. 1-4 環化酵素発現株の代謝産物の GC-MS 分析

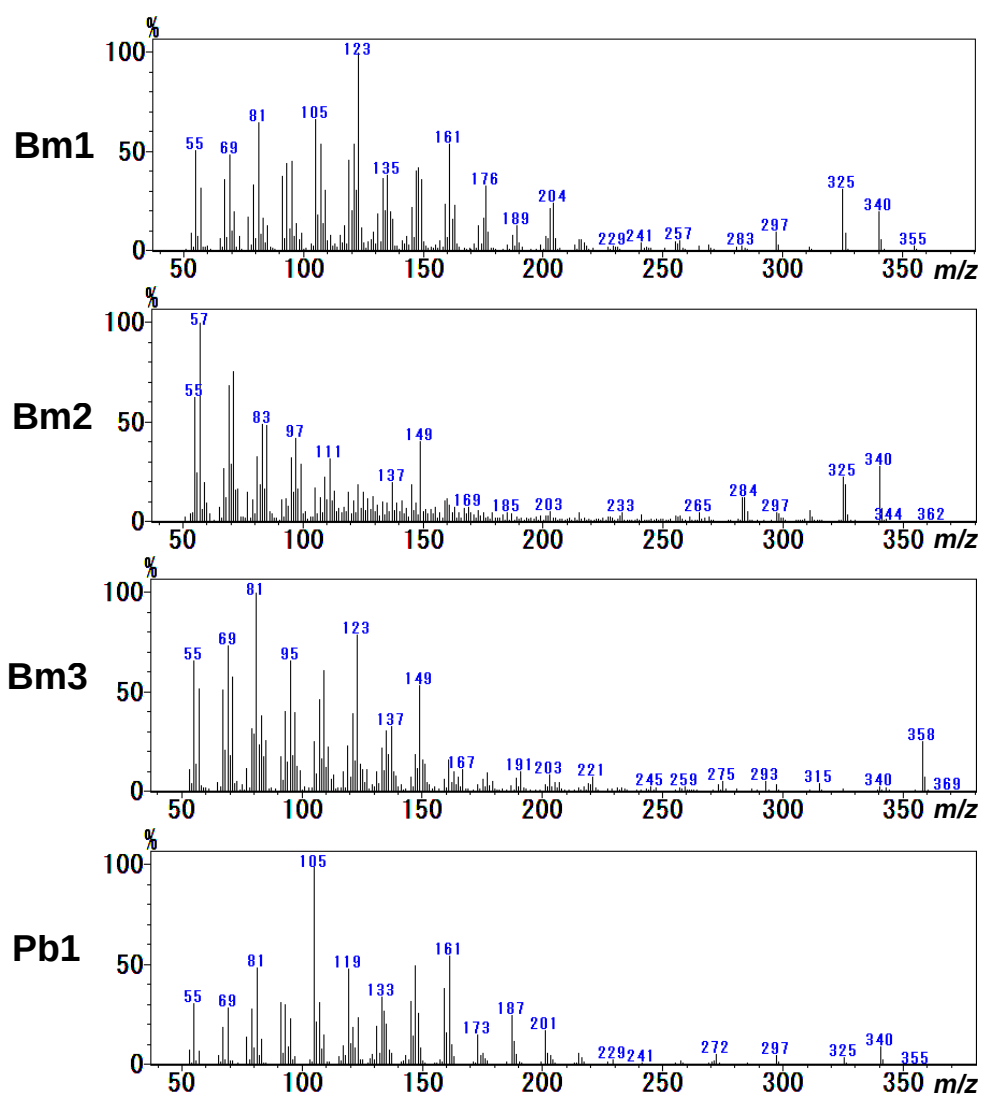


Fig. 1-5 環化体の GC-MS スペクトル

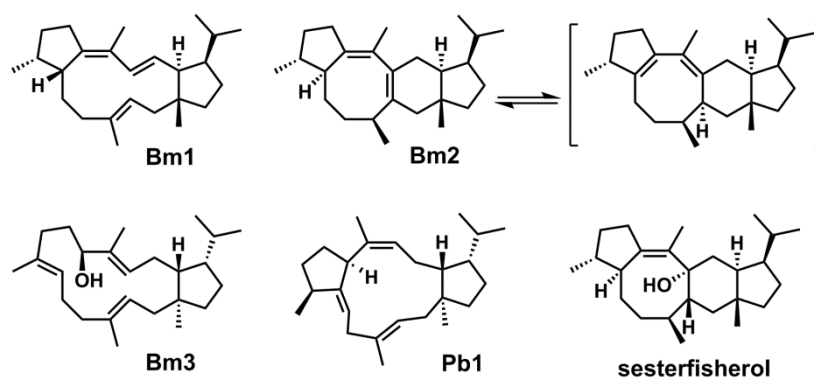
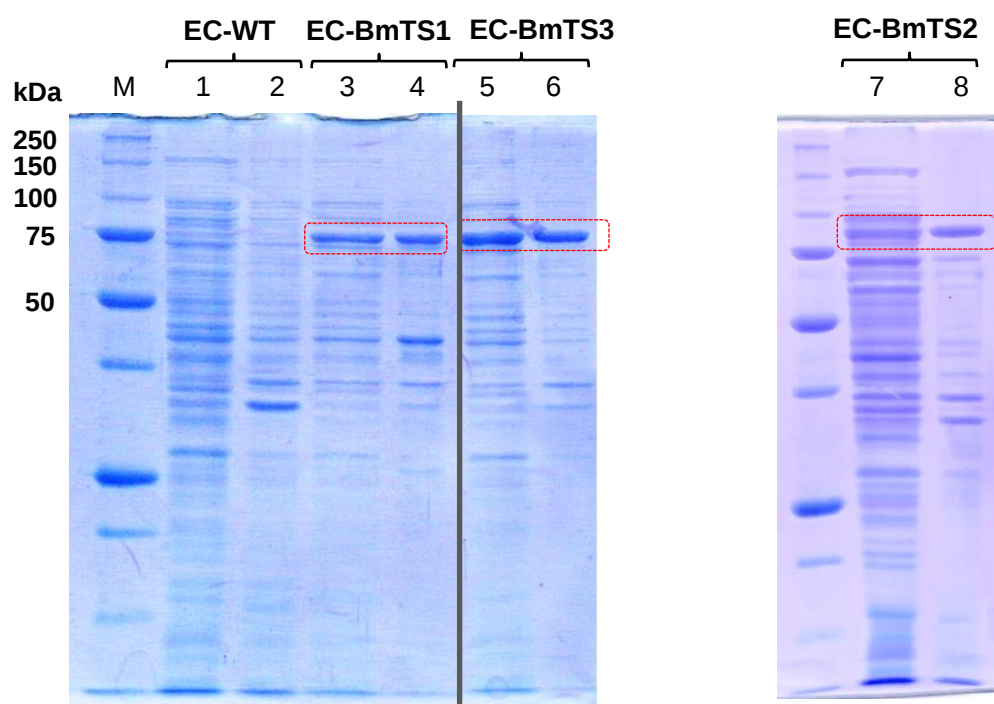


Fig. 1-6 新規環化生成物および sesterfisherol の化学構造



1, 3, 5, 7: 可溶性画分 2, 4, 6, 8: 不溶性画分

Fig. 1-7 大腸菌異種発現株無細胞抽出液の SDS-PAGE 分析

Table 1-2 NMR spectral data of novel sesterterpenes

C_6D_6	$Bm1$		C_6D_6	$Bm3$		C_6D_6	$Pb1$		C_6D_6	$epoxy-Bm2$	
	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)		δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)		δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)		δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)
1	43.5	2.18 (d, 8.5)	1	42.9	1.88 (m) 2.23 (dd, 7.7, 13.5)	1	44.1	1.87 (m) 2.20 (m)	1	48.8	*
2	124.7	5.56 (t, 8.5)	2	125.9	5.38 (brt, 8.2)	2	127.1	5.32 (d, 11.2)	2	134.5	-
3	133.8	-	3	134.7	-	3	139.2	-	3	*	1.76 (m)
4	39.2	1.97 (m)	4	40.2	2.10 (m)	4	37.9	2.45 (d, 14.0) 2.98 (m)	4	32.7	1.43 (m)
		2.06 (m)									1.67 (m)
5	27.1	1.18 (m)	5	24.3	2.08 (m)	5	123.3	5.15 (dd, 2.5, 10.7)	5	30.2	1.33 (m)
		1.58 (m)			2.13 (m)						1.33 (m)
6	42.9	2.88 (t, 6.7)	6	124.9	5.36 (brt, 7.5)	6	142.3	-	6	42.2	*
7	39.2	2.06 (m)	7	132.9	-	7	32.7	2.68 (m)	7	36.3	2.49 (m)
8	32.3	1.38 (m)	8	35.6	1.91 (m)	8	33.9	1.42 (m)	8	29.3	1.23 (m)
		1.67 (m)			2.06 (m)			1.82 (m)			1.82 (m)
9	29.6	2.16 (m)	9	30.6	1.70 (m)	9	27.6	1.6 (m)	9	29.6	1.55 (m)
		2.27 (dd, 9.4, 17.1)			1.84 (m)						1.98 (t, 12.5)
10	145.2	-	10	77.0	3.96 (dd, 4.3, 9.6)	10	50.9	3.4 (m)	10	79.2	-
11	125.7	-	11	134.6	-	11	133.3	-	11	63.9	-
12	134.1	5.93 (d, 15.7)	12	131.9	5.27 (br)	12	128.9	5.7 (d, 10.6)	12	130.8	-
13	131.2	5.49 (dd, 10.1, 15.7)	13	23.0	1.94 (m) 2.02 (m)	13	26.0	2.25 (m) 1.76 (m)	13	26.4	2.15 (dd, 1.4, 14.0) 2.96 (dd, 3.2, 15.8)
					1.91 (m)			1.88 (m)			1.41 (m)
14	53.6	2.57 (t, 10.6)	14	46.5	1.41 (m)	14	47.9	1.88 (m)	14	46.1	1.11 (m)
15	48.1	-	15	46.5	-	15	44.8	-	15	40.7	-
16	43.1	1.37 (m)	16	41.9	1.41 (m)	16	42.9	1.41 (m)	16	40.6	1.11 (m)
		1.44 (m)			1.55 (m)			1.52 (m)			1.55 (m)
17	28.0	1.37 (m)	17	28.6	1.16 (m)	17	26.8	1.52 (m)	17	29.0	1.51 (m)
		1.58 (m)			1.69 (m)						1.76 (m)
18	51.5	1.84 (m)	18	52.4	1.65 (m)	18	49.7	1.83 (m)	18	46.8	1.69 (m)
19	29.2	1.65 (m)	19	29.6	1.53 (m)	19	27.3	1.79 (m)	19	31.1	1.68 (m)
20	16.7	1.65 (s, Me)	20	15.9	1.57 (s, Me)	20	22.8	1.07 (d, 6.0)	20	*	1.02 (d, Me, 6.5)
21	15.8	1.04 (d, Me, 7.5)	21	15.5	1.57 (s, Me)	21	22.8	1.07 (d, 6.0)	21	14.7	0.89 (d, Me, 6.7)
22	19.0	1.74 (s, Me)	22	10.9	1.60 (s, Me)	22	20.7	1.73 (s)	22	20.4	1.40 (s, Me)
23	22.0	0.96 (s, Me)	23	24.2	1.06 (s, Me)	23	24.9	1.01 (s)	23	18.3	0.76 (s, Me)
24	21.5	0.86 (d, Me, 6.7)	24	21.9	0.93 (d, Me, 6.6)	24	21.3	0.88 (d, 6.5)	24	22.2	0.85 (d, Me, 6.3)
25	23.7	1.02 (d, Me, 6.5)	25	22.6	0.95 (d, Me, 6.3)	25	24.4	1.03 (d, 6.0)	25	24.4	1.00 (d, Me, 6.2)

The signals with asterisk were not observed possibly due to significant broadening.

< Bm1 の構造決定 >

まず ^1H -NMR において特徴的な 2 つの二重線メチル基(δ_{H} 0.86, 1.02)と1つの一重線メチル基(δ_{H} 0.96)のシグナルが観測され、これらが C18/C19, C1/C14/C15/C16 と HMBC 相関を示したことから、sesterfisherol に見られる 18 位, 15 位にイソプロピル基とメチル基が置換した 5 員環(A 環)をもつことがわかった。 ^{13}C -NMR において 6 つのオレフィン炭素のシグナルが観測され、不飽和度 6 からトリエンをもつ 3 環性骨格であることがわかり、各種 NMR の解析から平面構造を決定した(Fig. 1-8)。

立体化学について、NOESY 相関から相対配置を決定した。H23-H24 間、H14-H18 間でそれぞれ相関が見られたことから、A 環まわりの置換基は H14 に対して 23 位のメチル基と 18 位のイソプロピル基がそれぞれトランス配置になっていることがわかった。また、H6-H7 間の相関から C 環まわりの置換基は 21 位のメチル基と H6 がトランス配置であることがわかった。さらに、H23 との相関から H2 と H13 はそれぞれ 23 位のメチル基と同一面上に位置していることがわかり、これらが 6H と相関を示したことから A, C 環上の置換基の相対配置を関連づけた。これにより、分子全体の相対配置を決定した。

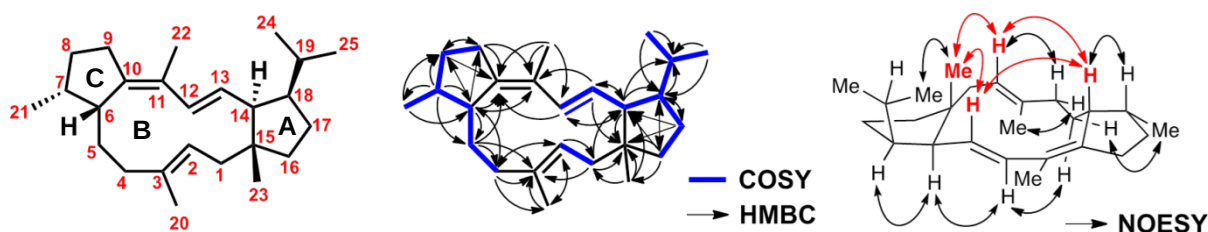


Fig. 1-8 Bm1 の化学構造および 2D-NMR 相関

続いて、VCD 測定による絶対配置の決定を行った。Bm1 は不安定であり数日で分解されてしまうことから、オゾン酸化および還元によって分解生成物 Bm1-R を合成した(Fig. 1-9)。Bm1-R の IR, VCD スペクトルについて、実測値と DFT 計算値とを比較したところ(Fig. 1-10)、Region I, II がそれぞれよく一致したことから、A 環まわりの絶対配置を 14*S*, 15*R*, 18*R* と決定した。以上、分子全体の相対配置と A 環まわりの絶対配置から、Bm1 の絶対配置を 6*R*, 7*R*, 14*S*, 15*R*, 18*R* と決定した。

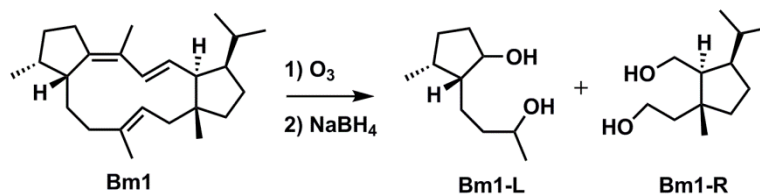


Fig. 1-9 Bm1 のオゾン分解

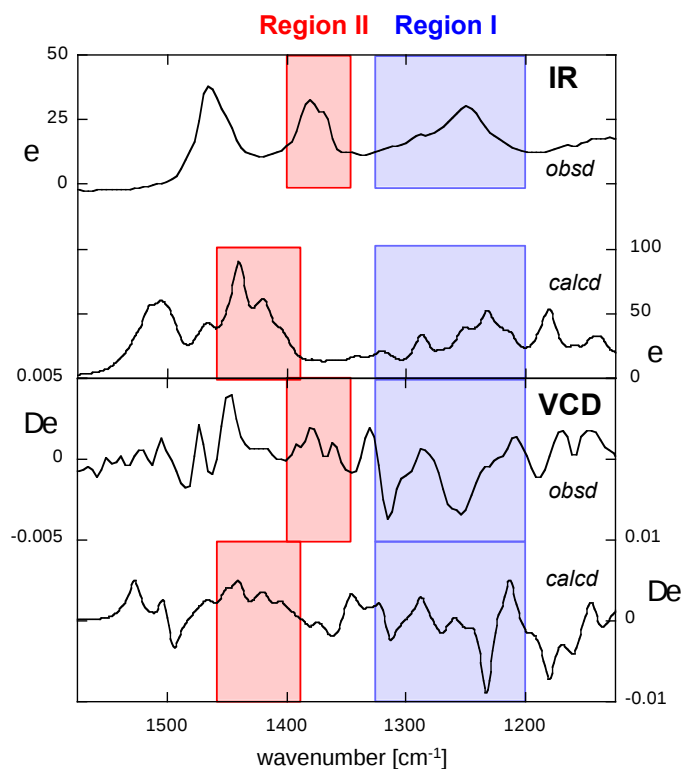


Fig. 1-10 Bm1-R の IR, VCD スペクトルデータ

< Bm2 の構造決定 >

Bm2 は室温で徐々に異性化し、分離困難な 2 種類の異性体の混合物となることが $^1\text{H-NMR}$ によって示された(Fig. 1-11)。共役二重結合の転位による異性化が原因であると推測されたため、*m*CPBA 酸化によって二重結合をエポキシ化することで誘導体 epoxy-Bm2 とし(Fig. 1-12)、その構造解析を行った。

Bm1 と同様、H24, H25, H23 のシグナルが C18/C19, C1/C14/C15/C16 と HMBC 相関を示したことから、sesterfisherol に見られる五員環(A 環)をもつことがわかった。 $^{13}\text{C-NMR}$ において 2 つのオレフィン炭素のシグナルが観測され、不飽和度 6 から二重結合とエポキシドを一つずつもつ四環性骨格であることがわかった。COSY, HMBC 解析から sesterfisherol と同様の環構造を持つことがわかり、epoxy-Bm2 の構造から Bm2 は sesterfisherol の 2-12 位に二重結合が導入された平面構造であると決定された(Fig. 1-13)。

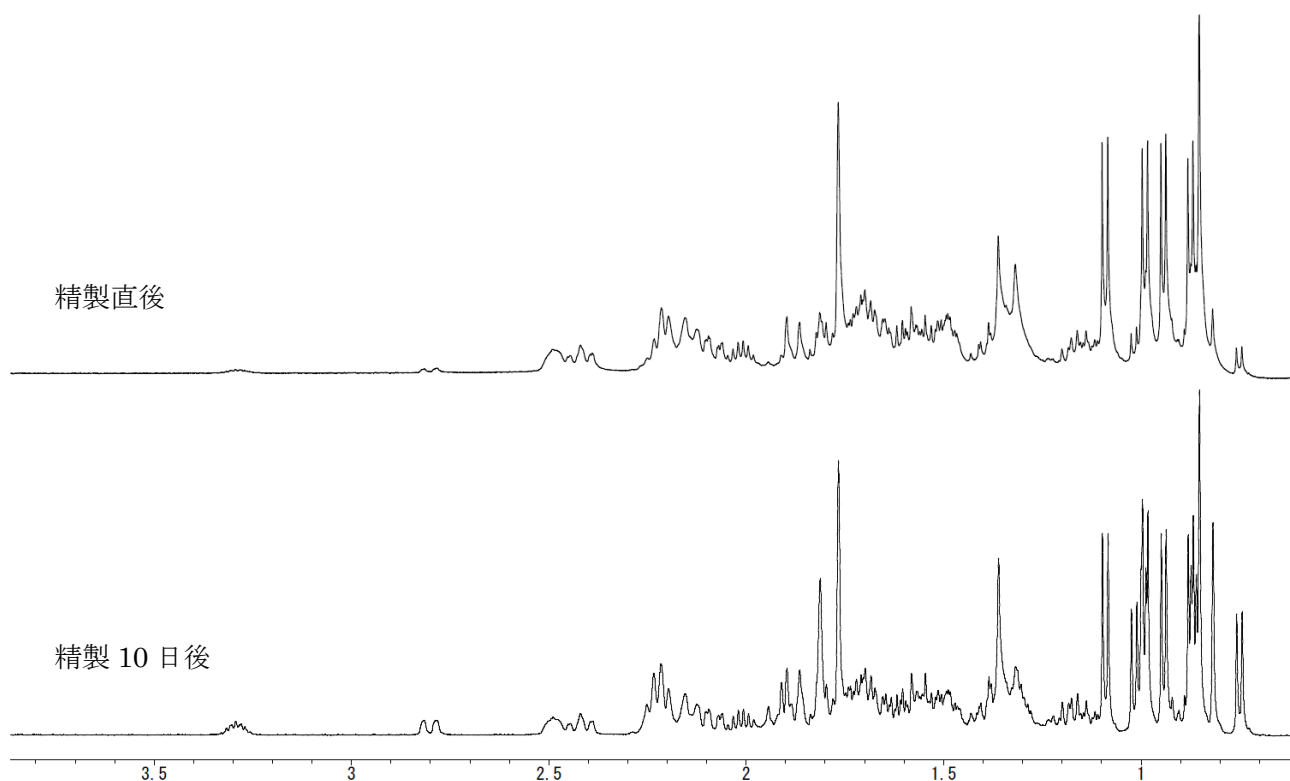


Fig. 1-11 Bm2 の ^1H -NMR

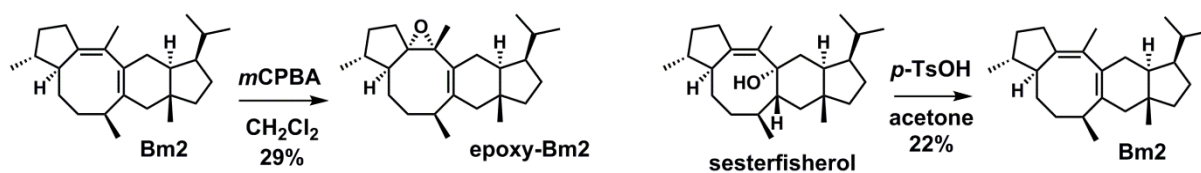


Fig. 1-12 Bm2 のエポキシ化反応および sesterfisherol の脱水反応

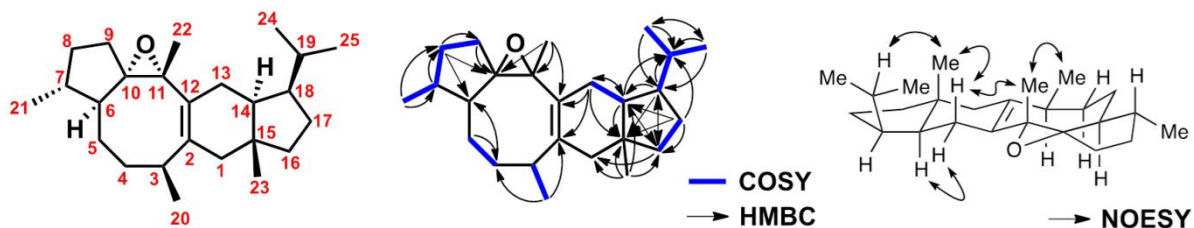


Fig. 1-13 epoxy-Bm2 の化学構造および 2D-NMR 相関

Bm2 の平面構造は sesterfisherol の脱水体に相当することから、実際に sesterfisherol の酸処理による脱水反応を試みた。sesterfisherol に対して $p\text{-TsOH}$ を作用させたところ、予想通り Bm2 の生成が確認され、EC-*BmTS2* から得られたものと旋光度の符号が一致した。このことから、Bm2 は絶対配置を含め sesterfisherol と同一の立体化学であることが確かめられた。

epoxy-Bm2 の NOESY 相関からもこの立体化学が支持された。

< Bm3 の構造決定 >

Bm1 と同様、H24, H25, H23 のシグナルが C18/C19, C1/C14/C15/C16 と HMBC 相関を示したことから、sesterfisherol に見られる五員環(A 環)をもつことがわかった。また、H10 のシグナル(δ_H 3.96)および分子式から水酸基を持つことが分かった。 ^{13}C -NMR において 6 本のオレフィン炭素のシグナルが観測され、不飽和度 5 からトリエンを持つ二環性骨格であると推定され、各種 NMR の解析から最終的に平面構造を決定した。後述のオゾン分解反応により、A 環の相対配置を決定した(Fig. 1-14)。

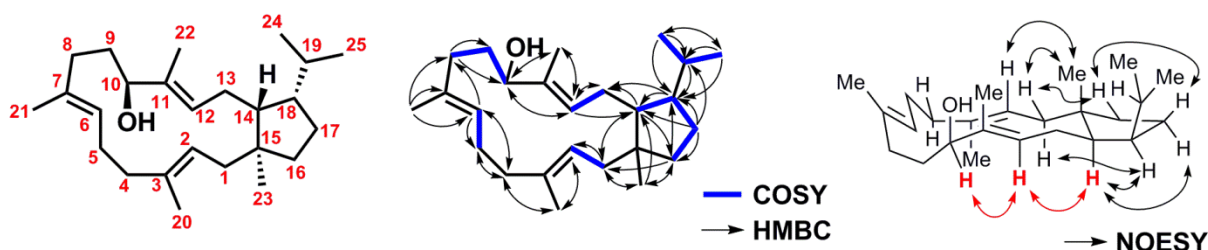


Fig. 1-14 Bm3 の化学構造および 2D-NMR 相関

Bm3 の絶対配置については、3 章にて述べる通り、環化酵素と酸化修飾酵素との共発現により既知天然物 terpestacin へと導くことで決定された(Fig. 1-15)。18 位の立体化学に関しては NOESY 相関から決定した。

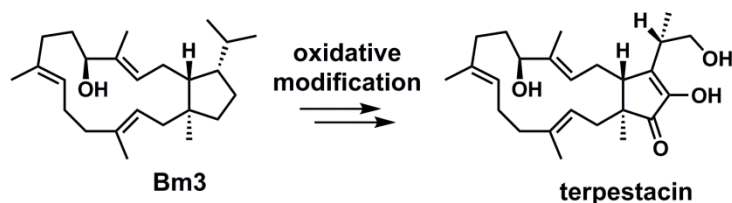


Fig. 1-15 Bm3 の酸化修飾による terpestacin の生合成

< Pb1 の構造決定 >

Bm1 と同様、H24, H25, H23 のシグナルが C18/C19, C1/C14/C15/C16 と HMBC 相関を示したことから、sesterfisherol に見られる五員環(A 環)をもつことがわかった。 ^{13}C -NMR において 6 つのオレフィン炭素のシグナルが観測され、不飽和度 6 からトリエンを持つ三環性骨格であることがわかり、各種 NMR の解析から平面構造を決定した(Fig. 1-16)。

立体化学について、NOESY 相関から相対配置を決定した。H19-H23 間、H14-H5 間でそれぞれ相関が見られたことから、A 環まわりの置換基は H14 に対して 23 位のメチル基と 18 位のイソプロピル基がそれぞれトランス配置になっていることがわかった。また、H21- β H8 間、H7- α H8 間の相関から C 環まわりの置換基は 21 位のメチル基と H10 が異なる面上に置換していることがわかった。さらに、H23-H13-H5 間の相関から A, C 環上の置換基の相対配置を関連づけ、これ

により分子全体の相対配置を決定した。

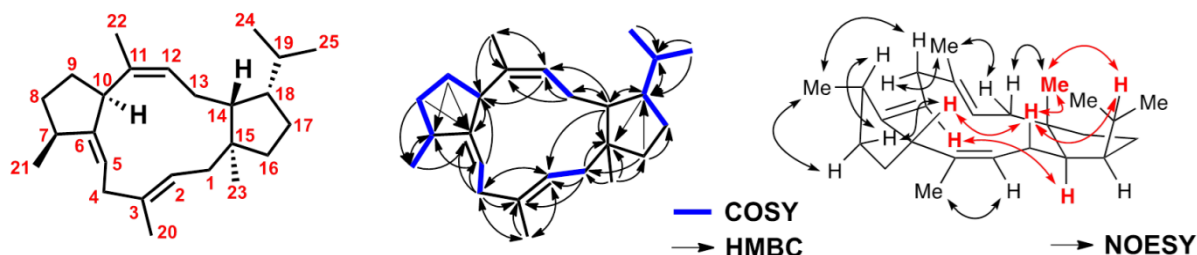


Fig. 1-16 Pb1 の化学構造および 2D-NMR 相関

Pb1 の絶対配置を決定するために、Pb1 と Bm3 のオゾン分解を行った(Fig. 1-17)。平面構造から、Pb1 と Bm3 はオゾン分解によって同一の平面構造を持つ生成物 Pb1-R, Bm3-R を与えると予想されたため、その旋光度を比較することで絶対配置を決定することができると考えた。実際にオゾン分解によって得られた Pb1-R, Bm3-R は同一の NMR スペクトルを与え、旋光度も一致したことから、これらは立体化学を含めて同一の分子であることが確認された。このことから、Pb1 の A 環まわりの絶対配置を $14R, 15S, 18S$ と決定した。以上、分子全体の相対配置と A 環まわりの絶対配置から、Pb1 の絶対配置を $7R, 10S, 14R, 15S, 18S$ と決定した。

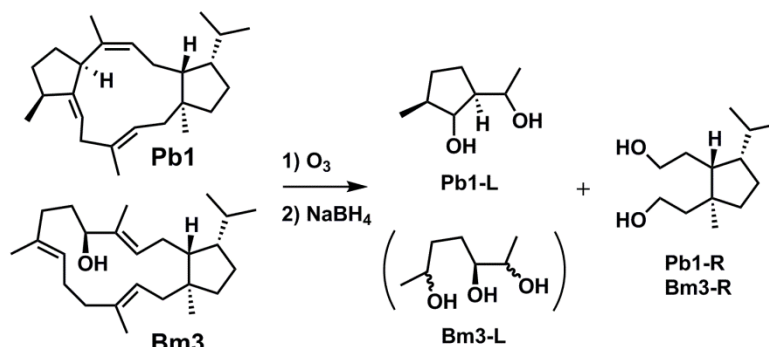


Fig. 1-17 Bm3, Pb1 のオゾン分解

以上の結果から、得られた 4 種の環化生成物は *sesterfisherol* あるいはその生合成中間体と類似した骨格をもつ炭化水素・アルコール体であり、いずれも新規セスタテルペンであることがわかった。

1-2-2. 新規セスタテルペンの推定環化機構

1-2-1 で得られた 4 種の環化生成物はいずれも平面構造が *sesterfisherol* 生合成経路における中間体とよく一致していることがわかった(Fig. 1-18)。*sesterfisherol* 生合成機構は、先行研究における標識基質の取り込み実験⁷および後述する分子軌道計算の結果から次のように推定された。まず環化前駆体における 4 番目と 5 番目の二重結合の位置で環化が進行し二環性中間体 IM4 を与える。続いて、環形成と水素移動を繰り返すことで三環性中間体 IM6a、IM8a、四環性中間体 IM10a が順次生成し、最後に IM10a に対して水分子が付加することで *sesterfisherol* が生合成されると推定される。この経路中において Bm3 は IM4a の立体異性体 *ent*-IM4a から水分子の付加によって生成していると考えられる。また、Pb1、Bm1 はそれぞれ IM6a、IM8a の異性体 *ent*-11*Z*-10-*epi*-IM6a、6-*epi*-IM8a から脱プロトン化によって生成し、Bm2 は IM10a から脱プロトン化によって生成すると推定される。以上のことから、これらの化合物は類似の生合成経路から分岐して生じたものであると考えられる。

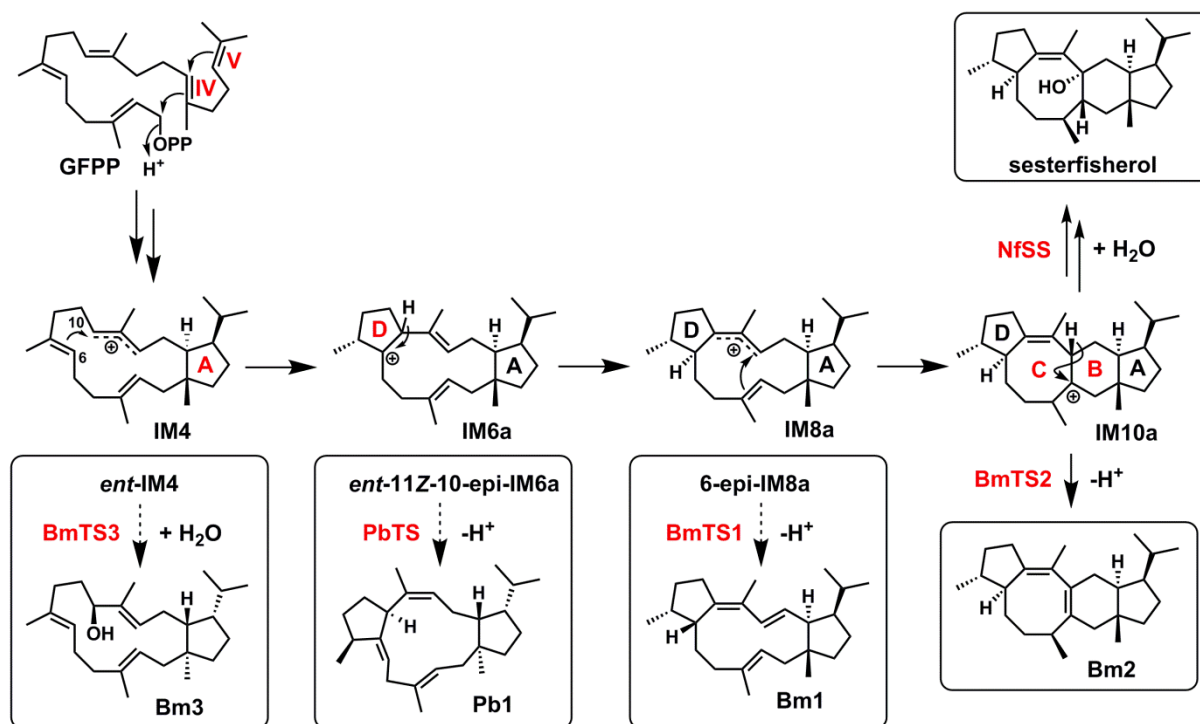


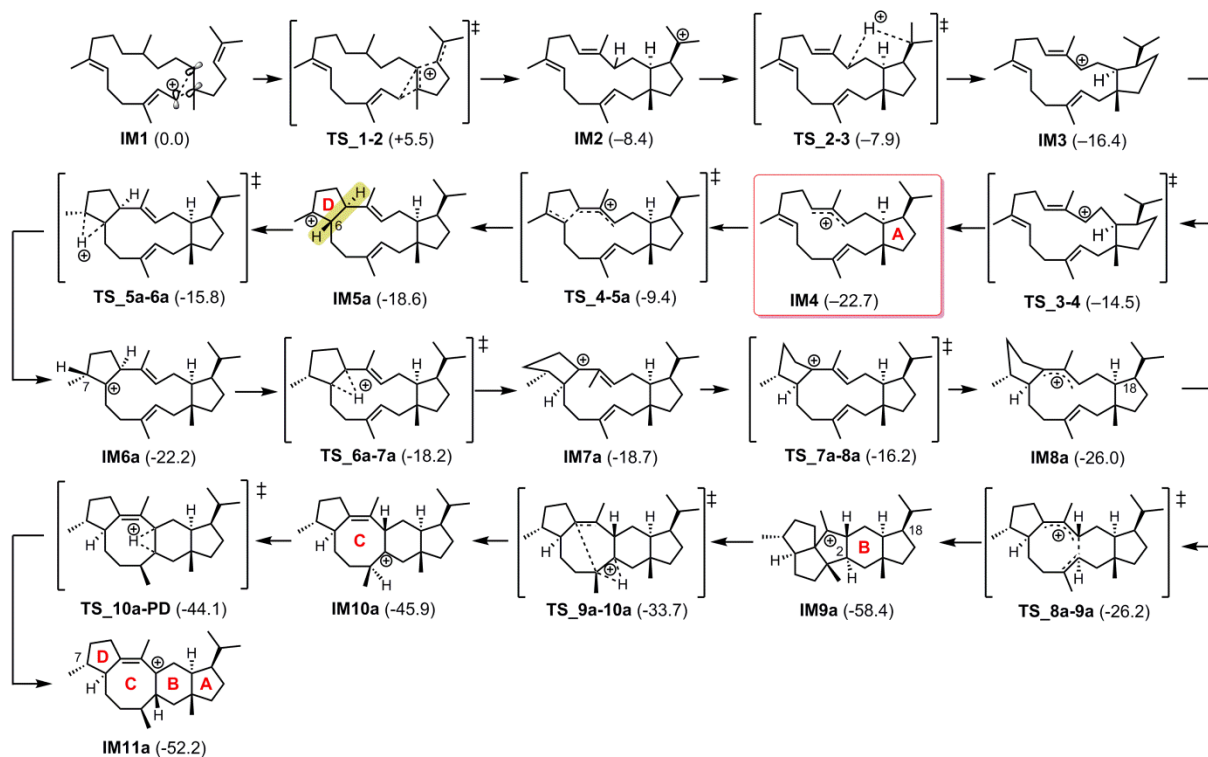
Fig. 1-18 新規環化体および *sesterfisherol* の推定生合成経路

1-2-3. NfSS に対する変異導入実験

テルペン環化酵素による多環性骨格の構築において、複数の環がどのような順序で形成されるのか調べることは、その環化機構を詳細に理解する上で重要であると考えられる。*sesterfisherol* のもつ四環性骨格が構築される際の環形成の順序としては、A 環が構築された後に D 環→B/C の順で形成される Path A と B 環→C/D 環の順で形成される Path B の 2 通りが考えられる。

この 2 通りの経路については、共同研究者である東京大学の佐藤玄 博士が DFT 計算を用いて計算化学的に検証・考察している⁸ (Fig. 1-19)。Path A では、まず環化前駆体の 4 番目と 5 番目の二重結合の位置で一段階目の環化が進行し、A 環を形成することで二環性中間体 IM4 を与える。続いて D 環の形成によって三環性中間体 IM5a が生成し、その後五環性中間体 IM9a を経て B/C 環が形成され、四環性中間体 IM10a が生じる。最後に IM11a に対して水が付加することで *sesterfisherol* が生合成される。全体を通して各中間体と遷移状態とのエネルギー差はおよそ 20 kcal/mol 以内に収まっていることから、室温で十分進行しうる経路であると考えられる。一方、Path B では A 環の形成によって IM4 が生成した後、続いて B 環が形成されることで IM5b を与える。その後、五環性中間体 IM12b を経由して C/D 環が形成されることで *sesterfisherol* の四環性骨格を与える。両者とも同位体標識実験と矛盾しない経路であることから、NfSS の環化機構解明にはさらなる実験的な検証が必要である。そこで、NfSS に対する変異導入実験により *sesterfisherol* 生合成経路の解明を試みた。変異酵素により *sesterfisherol* へ至る中間体から分岐した生成物を得ることができれば、その分子構造からどちらの経路を経て生じたものであるか判断することができる。

Path A



Path B

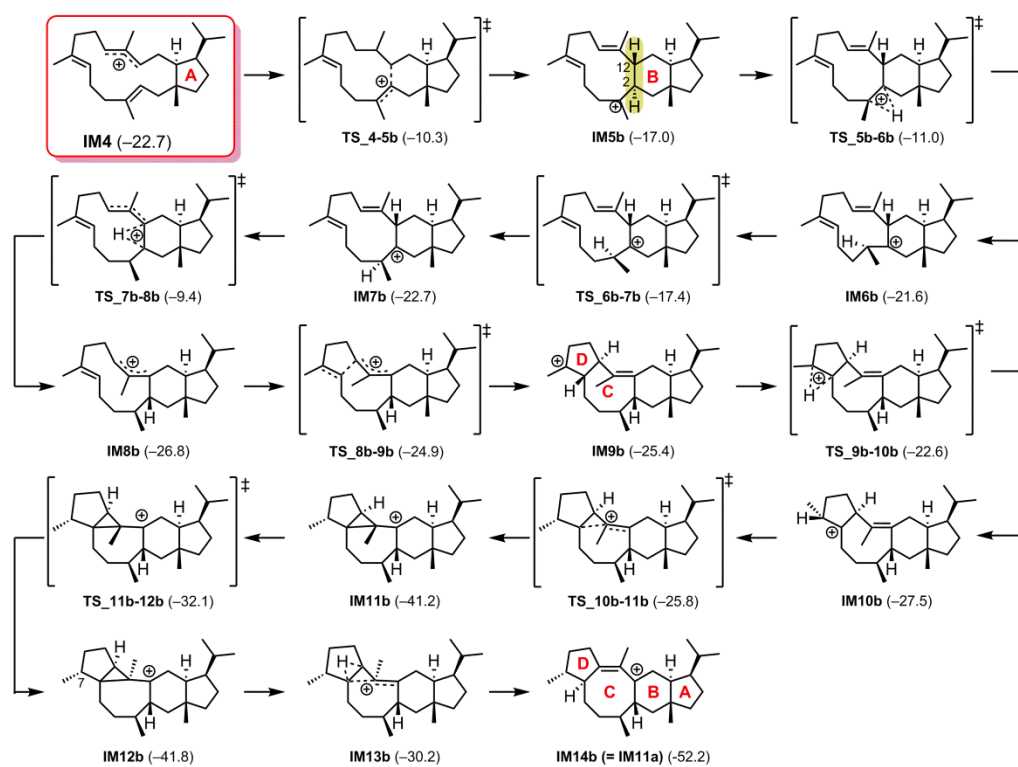


Fig. 1-19 DFT 計算に基づく sesterfisherol の推定生合成経路

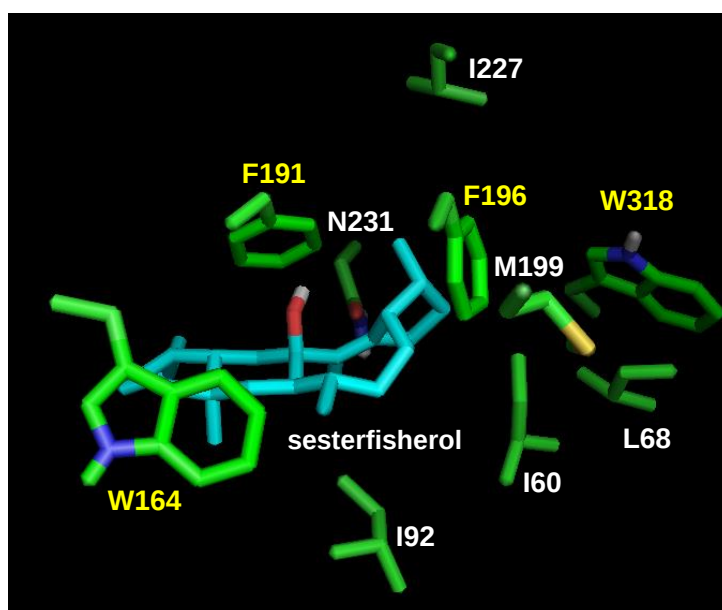


Fig. 1-21 PaFS に基づいた NfSS のホモロジーモデリング

実際に NfSS 変異体の大腸菌発現系の構築を行った。NfSS 発現用プラスミド *NfSS*-pMAL c4E をテンプレートとし、変異導入キットを用いて F191, W164, F196, W318 をそれぞれアラニンに置換したプラスミドを調製した。これら大腸菌に導入し、得られた形質転換株の代謝産物を GC-MS によって分析した。その結果、すべての変異体で *sesterfisherol* の生産が確認されなくなり、F191A のみ新たな生成物のピークを与えた (Fig. 1-22)。EC-*NfSS* (F191A) の大量培養により得られた代謝産物を TLC によって分析した(呈色試薬としてバニリンリン酸塩を用いた)ところ、テルペンなどの化合物に特徴的な赤紫の発色を示すスポットが 2 つ観察された (Fig. 1-22)。これらをシリカゲルカラムおよび逆相 HPLC によって精製することで、2 種の生成物 NFM-1, NFM-2 を LB 培地 11.2 L からそれぞれ 2.1 mg, 0.5 mg の収量で単離した。これらはいずれも GC-MS 分析によって m/z 340 で観測され (Fig. 1-23)、HR-MS から分子式を $C_{25}H_{40}$ と決定した。さらに NMR による構造解析を行い、NFM-1, NFM-2 の化学構造を決定した (Table 1-3, Fig. 1-24)。

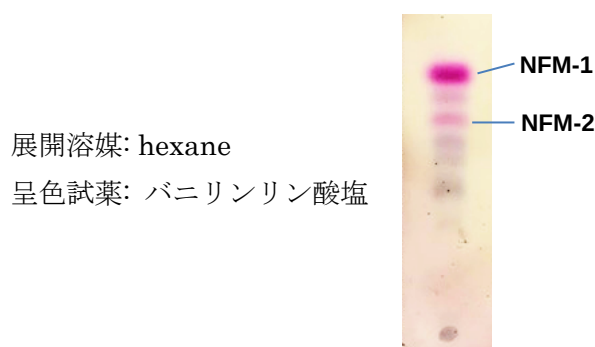


Fig. 1-22 EC-NfSS (F191A) から得られた代謝産物の TLC 分析

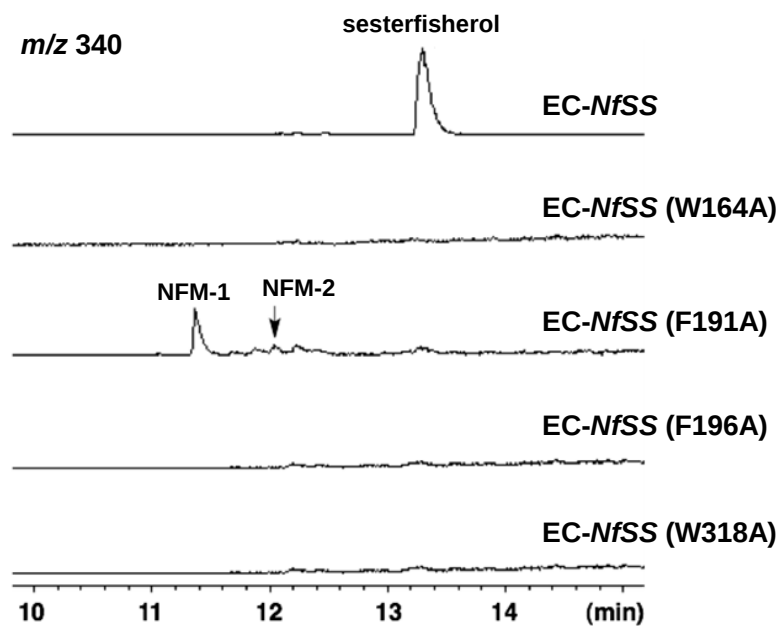


Fig. 1-22 EC-NfSS (mutants)から得られた代謝産物の GC-MS 分析

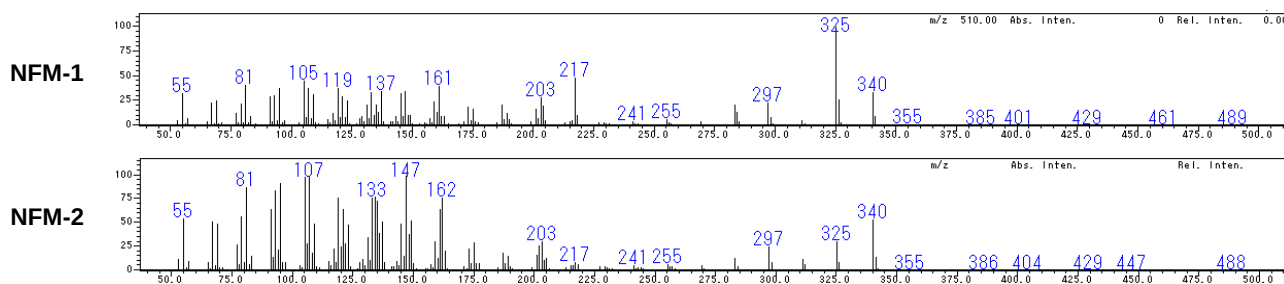


Fig. 1-23 NFM-1, NFM-2 のマススペクトル

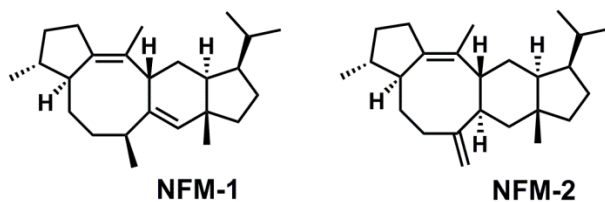


Fig. 1-24 NFM-1, NFM-2 の化学構造

< NFM-1 の構造解析 >

Bm1 と同様、H24, H25, H23 のシグナルが C18/C19, C1/C14/C15/C16 と HMBC 相関を示したことから、sesterfisherol に見られる五員環(A 環)をもつことがわかった。 ^{13}C -NMR において 4 つのオレフィン炭素のシグナルが観測され、不飽和度 6 から 2 つの二重結合を持つ四環性骨格であることがわかり、各種 NMR の解析から平面構造を決定した(Fig. 1-25)。

NOESY 解析により、H19-H23-H12-H20 間、H18-H14-H6-H21 間の相関から置換基の相対配置を決定した。絶対配置については sesterfisherol における A, C 環の絶対配置と同様であると推定した。

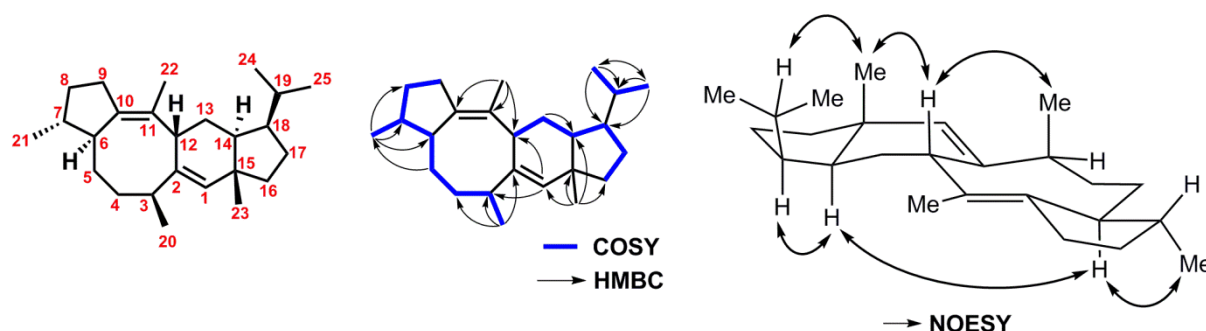


Fig. 1-25 NFM-1 の化学構造および 2D-NMR 相関

< NFM-2 の構造解析 >

^1H , ^{13}C -NMR データが NFM-1 のものと類似しており、エキソオレフィンプロトンに相当するシグナル(δ_{H} 4.90, 4.98)が観測された。このことから、NFM-1 の二重結合の位置が異なる異性体であると推定され、COSY, HMBC 解析から平面構造を決定した(Fig. 1-26)。

NOESY 解析により、H19-H23-H12-H20- $\beta\text{H}4$ 間、H18-H14-H2 間、 $\alpha\text{H}4$ - $\alpha\text{H}5$ -H6-H21 間の相関から置換基の相対配置を決定した。絶対配置については sesterfisherol における A, C 環の絶対配置と同様であると推定した。

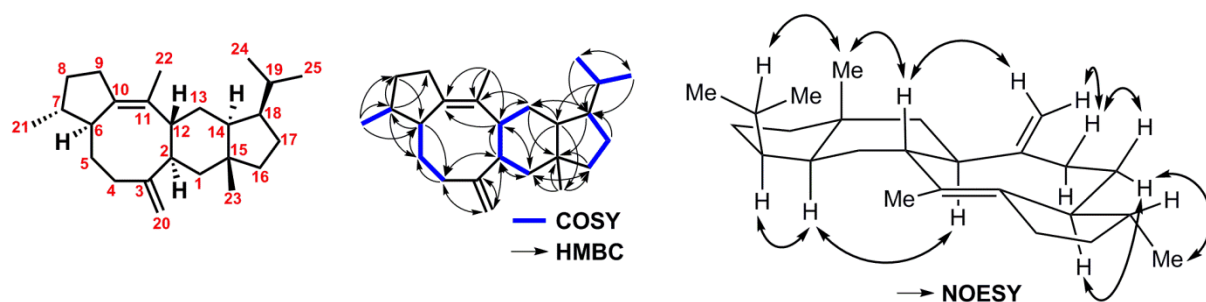


Fig. 1-26 NFM-2 の化学構造および 2D-NMR 相関

Table. 1-3 NFM-1, NFM-2 の 1D-NMR データ

NFM-1			NFM-2		
C ₆ D ₆	δ _C	δ _H (multiplicity, J in Hz)	C ₆ D ₆	δ _C	δ _H (multiplicity, J in Hz)
1	133.4	5.64 (s)	1	47.6	1.42 (dd, 11.0, 13.6) 1.89 (m)
2	144.6		2	43.2	2.77 (ddd, 7.2, 11.0, 12.1)
3	45.8	2.34 (m)	3	156.2	
4	32.3	1.43 (m)	4	39.4	2.03 (m)
		1.56 (m)			2.45 (dt, 5.1, 12.7)
5	26.1	1.08 (m)	5	26.7	1.09 (m)
		1.46 (m)			1.71 (m)
6	41.1	3.81 (dt, 6.5, 11.9)	6	44.7	2.84 (dd, 6.0, 10.9)
7	39.3	2.07 (m)	7	40.3	1.91 (m)
8	29.6	1.20 (m)	8	30.0	1.18 (m)
		1.53 (m)			1.55 (m)
9	31.9	2.14 (m)	9	29.9	1.30 (m)
					1.80 (m)
10	139.9		10	131.1	
11	129.1		11	137.1	
12	44.3	2.93 (d, 6.1)	12	48.4	2.38 (dt, 9.6, 12.8)
13	28.4	1.75 (dd, 6.1, 12.9)	13	30.8	1.61 (m)
		2.10 (m)			2.23 (m)
14	46.5	2.04 (m)	14	44.0	2.05 (m)
15	43.6		15	41.9	
16	37.2	1.41 (m)	16	43.0	1.15 (m)
		1.50 (m)			1.53 (m)
17	29.2	1.56 (m)	17	31.5	2.22 (m)
		1.91 (m)			2.26 (m)
18	47.1	1.62 (m)	18	45.9	1.62 (m)
19	32.7	1.63 (m)	19	31.0	1.54 (m)
20	23.6	1.11 (d, Me, 6.9)	20	108.3	4.90 (s)
					4.98 (s)
21	15.0	0.94 (d, Me, 6.9)	21	15.5	0.97 (d, Me, 6.9)
22	20.5	1.71 (s, Me)	22	22.4	1.67 (s, Me)
23	21.8	0.86 (s, Me)	23	25.3	1.00 (s, Me)
24	23.0	0.82 (d, Me, 6.0)	24	21.7	0.87 (d, Me, 6.4)
25	23.8	0.99 (d, Me, 5.8)	25	24.6	0.91 (d, Me, 6.1)

NfSS F191A 株では IM10a から分岐することで NFM-1, NFM-2 を与えると推定される。これにより *sesterfisherol* は Path A を経て生合成されていると推定された。したがって、これまで機能解析に成功したクレード A の環化酵素はいずれも Path A を経ており、環化の順序はすべて共通(A 環→D 環→B/C 環の順)であることがわかった。

sesterfisherol 生合成機構における F191 の役割について考察する。佐藤博士によって計算化学的に推定された Path A では、五環性中間体 IM9a から IM10a への反応にはおよそ 25 kcal/mol という高いエネルギー障壁が存在することが示されている。一方、F191 が化合物近傍に位置することで生じる CH- π 相互作用を考慮した場合には、IM9d→IM10d→IM11d の変換における活性化エネルギーが大きく減少する経路が提案された(Fig.1-27)。これにより、NfSS WT では五環性中間体 IM9a を経由しない反応が連続的に進行することで *sesterfisherol* のみを与えると考えられる。一方、NfSS (F191A)株ではこの CH- π 相互作用が働かなくなったことにより、オリジナルの推定経路 Path A を経て NFM-1, NFM-2 を与えたと考えられる(Fig. 1-28)。

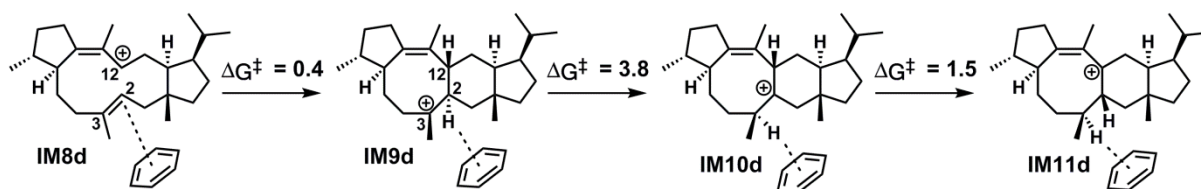


Fig. 1-27 CH- π 相互作用による IM8d から IM11d への変換における活性化エネルギーの減少

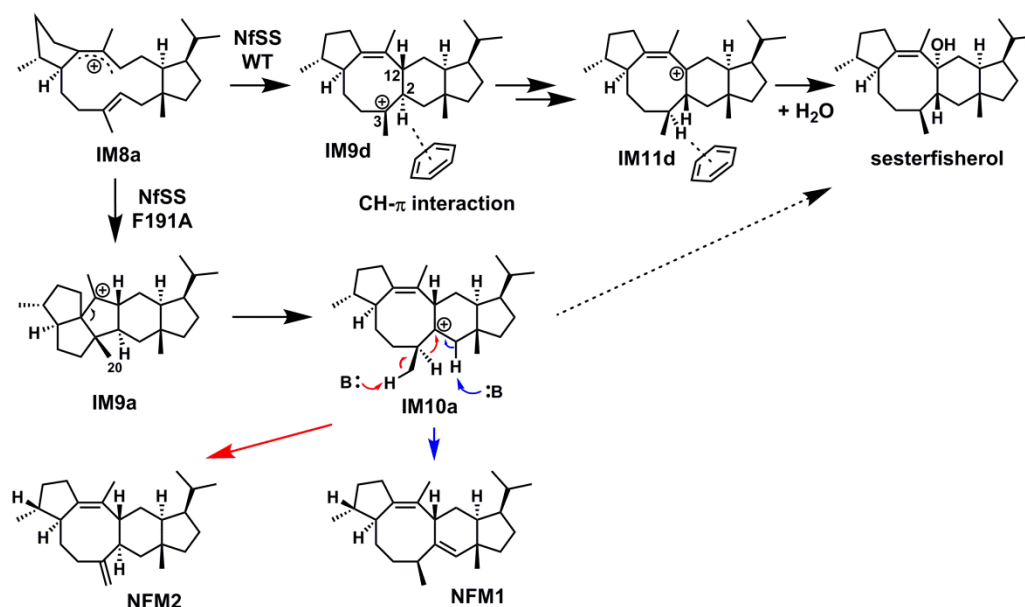


Fig. 1-28 NFM-1, NFM-2 および *sesterfisherol* の推定生合成機構

NfSS の変異実験により、クレード A に属する環化酵素はいずれも Path A を経た生成物を与えることが示された。しかし天然からは、Path B を経て生合成されていると推定される *thalianatriene* や *aspterpenacid* も単離されている^{10,11}(Fig. 1-29)。今後、糸状菌由来からこれらの生合成にかかわる環化酵素が特定されれば、NfSS との比較により環化順序の制御について知見が得られる可能性があると考えられる。

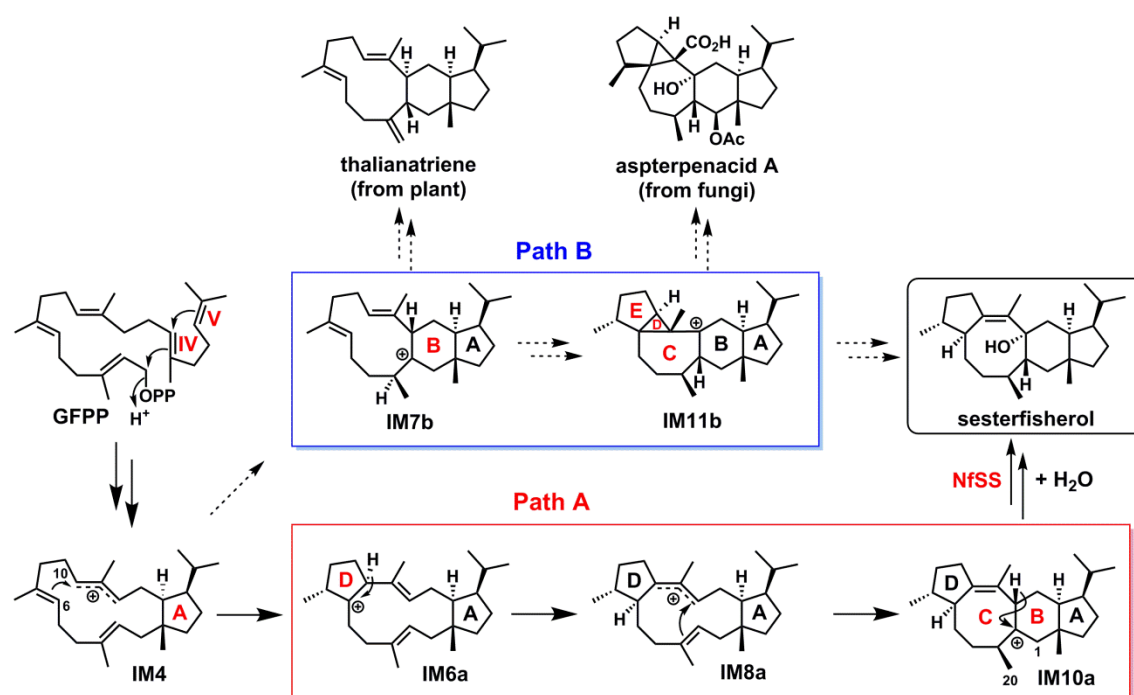


Fig. 1-29 Path B を経て生合成されると推定される天然物

クレード A に属する環化酵素の生合成機構において、初発の環化位置と環化の順序が制御されていることが示された。続いて、経路中の中間体から各生成物へと分岐する際のクエンチング機構の制御に関して知見を得ることを目的としてさらなる変異実験を行った。

クレード A の環化酵素についてアライメントを比較し、ホモロジーモデリングの結果と合わせてクエンチングの制御に関与しそうなアミノ酸残基を数種類候補として選択した(Fig.1-30)。

これらの変異体について機能解析を行ったところ、I60F, I60N, I60S, T88G, I92F, G169E は *sesterfisherol* のみが主に生産されており、L68W, F191V は生成物を与えていないことがわかった(Fig. 1-31)。いずれの変異体からも *sesterfisherol* 生合成経路中の中間体から分岐して生じた新たな生成物は得られなかったことから、これらのアミノ酸残基は環化反応にほとんど関与しないもの(I60, T88, I92, G169)か、あるいは環化酵素としての機能に必須なもの(L68, F191)であることが示唆された。この結果から、クエンチングの制御に関わるアミノ酸残基については、ホモロジーモデリングや一次配列の比較のみで推定・議論することは困難であると考えられた。生成物の近傍からある程度離れた位置にあるアミノ酸残基が重要である可能性も考えられるため¹²、結晶構造解析等も含めた今後のさらなる詳細な解析が待たれる。

		I60N	I60F	I60S	L68W	T88G	
bicyclic	BmTS-3	QSTHFSFSPVGNW	SLIYPEAIPERLGVLAY	SDLGLIHDDG	-----	98	
	EXL91788.1	KRAHFCPSFVGNW	NSLLYPEAMPERLGAVSYL	LDLGLIHNDL	-----	98	
	KLP22271.1	KKTYFSFSPVGNW	SLIYPEAIPERLGVLAY	SDLGLIHDDT	-----	98	
	KLP10102.1	KKTYFSFSPVGNW	SLIYPEAIPERLGVLAY	SDLGLIHDDT	-----	98	
	EKG16032.1	KKTYFSFSPVGNW	SLIYPEAIPERLGVLAY	SDLGLIHDDT	-----	98	
	KNG48393.1	-----	MVILPS	-----R-----	RSFSISDKNSDG	19	
	EOD52649.1	-----	-----	-----	-----	0	
	EUN27651.1[Bipolaris]	QSTHFSFSPVGNW	SLIYPEAIPERLGVLAY	SDLGLIHDDG	-----	98	
	CCF44887.1	KKSNGSPCVVGNW	SFIWPESEIPDRMGLLCYL	LDVGC FHDDA	-----	101	
	ELQ66782.1	KKSNGSPCVVGNW	SFIWPESEIPDRMGLLCYL	LDVGC FHDDA	-----	101	
tricyclic	BmTS-1	SESNSLSLEVGNW	CSLVFPETKPERLGTLYL	TDLGLIHDDN	-----	98	
	PbTS	SRSGSAISKVGNW	CSFIFSEALPERLPCITYL	ANIGNIHDPHYHSTPTM	-----	110	
	CoTS-2	QRSQSSWSFVGNW	GAFFIPFESLPDLRGVITYL	ANMGNIHDDL	-----	98	
	EUC41906.1[Bipolaris]	SESNSLSLEVGNW	CSLVFPETKPERLGTLYL	TDLGLIHDDN	-----	98	
	KNG45959.1	AKSQSAISKVGNW	CSFIFSESLPERLASITYL	ANIGNIHGGERPIHKLSKGDPCGLTAF	-----	120	
	EJT79122.1	QKSQSCWSFVGNW	GAFFIPFETVPERLGVITYL	ANMGNIHDDL	-----	98	
	CCF38398.1[Colletotrichum]	RKSQSCWSFVGNW	GAFFIPFESLPDLRGVITYL	ANMGNIHDDL	-----	98	
	EQB57380.1	HKSQSCWSFVGNW	GAFFIPFESLPDLRGVITYL	ANMGNIHDDL	-----	98	
	ELA23316.1	HKSQSCWSFVGNW	GAFFIPFESLPDLRGVITYL	ANMGNIHDDL	-----	98	
	BmTS-2	LLTINACSKLGNM	SFTFIESPPDLRDVAAY	WGLGLLHDDH	-----	96	
tetracyclic	NfSS	ERAILISISELGNL	GAFAYPEVPPERLAIVTYL	TDLGILHDDG	-----	97	
	GAQ03171.1	ERAILVISDLGNL	GAFAYPEVAPERLAITYL	TDLGMLHDDG	-----	97	
	ANID_02611.1_cyc	ARAILVFSDDLGNL	GAFAYPEAPEPEKLHILTYL	TDMGMLHDDG	-----	100	
	CBF87199.1[Aspergillus]	ARAILVFSDDLGNL	GAFAYPEAPEPEKLHILTYL	TDMGMLHDDG	-----	100	
	GAQ47624.1[Aspergillus]	EKAILISTSELGNL	GAFAYPEKVPKRLAILTYL	TDLGMLHDDG	-----	97	
	KEY77225.1	QKVQISISDLGNL	GAFAYPEVPPERLAITYL	TDLGMLHDDG	-----	97	
	KNG51078.1	KKAILTSFHLGNL	NAFTTYEALPERLGVLSYL	LDLGLIHDDA	-----	99	
						</	

Fig. 1-30 二機能性環化酵素のアミノ酸配列比較

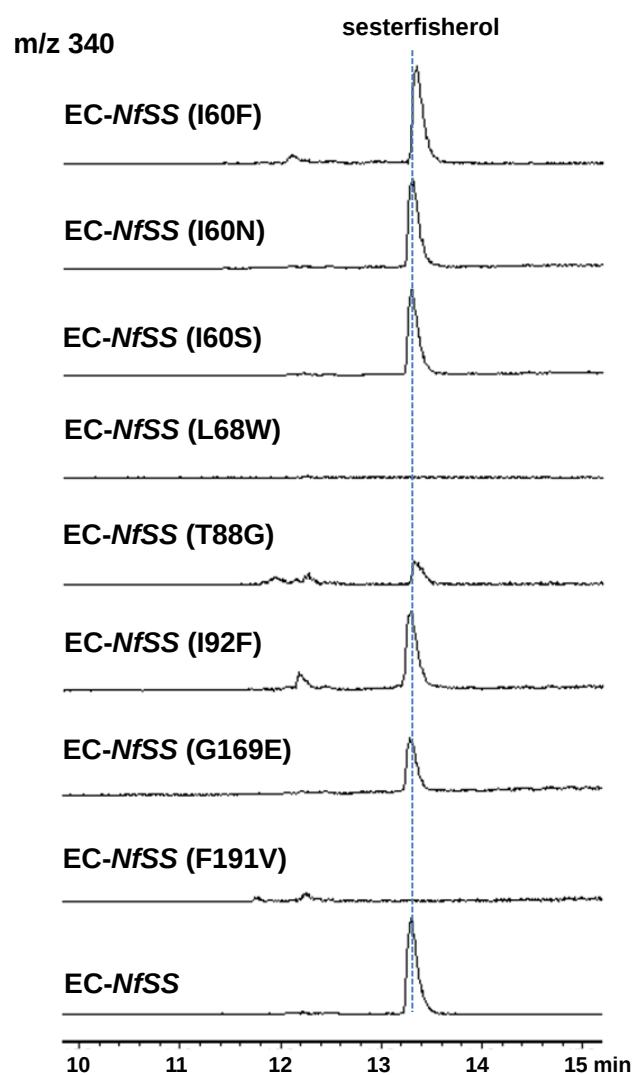


Fig.1-31 EC-NfSS (mutants)から得られた代謝産物の GC-MS 分析

1-3. クレード A に属する二機能性環化酵素についての考察

クレード A の環化酵素ではいずれも環化前駆体の 4 番目と 5 番目の二重結合が一段階目の環化に関わることで 15-5 員環を形成する。これに対し、クレード B の環化酵素では 3 番目と 4 番目の二重結合が環化に関わることで 11-5 員環を形成する。このことから、環化酵素は初めに大員環を形成する際に環のサイズを厳密に認識することで環化位置を制御していると考えられる。クレード A と B から得られている環化体の炭素鎖長のバリエーションについても環化位置の違いから説明することができる。3 番目と 4 番目の二重結合の位置で環化が始まるクレード B からはジテルペンとセスタテルペンの両方が得られているのに対し、5 番目の二重結合が環化に必要なクレード A からは炭素数 25 のセスタテルペンのみが得られている (Fig. 1-32)。以上のことから、少なくともクレード A と B についてはアミノ酸配列相同性と初発の環化機構との間に明確な関連性があることが示された。

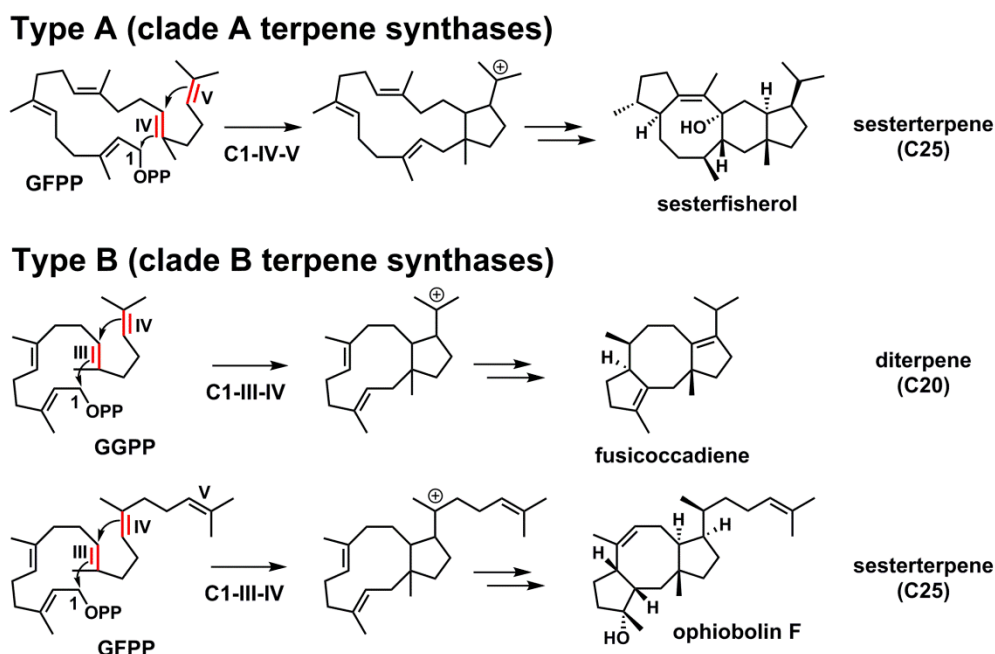


Fig. 1-32 クレード A, B の環化酵素によって生成し得る環化体の炭素数の違い

続いて、クレード A の環化酵素における立体化学の制御について考察する。1-2-2 で述べた通り、クレード A から得られた環化生成物はいずれも類似した平面構造を持つものの、置換基の立体化学にはバリエーションが見られる。この立体化学は、2 つの二重結合間で C-C 結合を形成し環構造が構築される際に生じている。重要なのはこの環化反応が二重結合どうしの面と面での反応であるという点であり、その面選択性の違いによって立体化学が制御されていると考えられる。例えば A 環の形成において、環化前駆体の配座が Fig. 1-33 における IM1 のような状態で環化が進行すれば sesterfisherol 型の立体配置(14*S*, 15*R*, 18*R*)をもつ IM2 が形成される。これを基準に考えると、片方のオレフィン面が反転した配座(IM1')からはエナンチオマー(*ent*-IM2)、両方のオレフィン面が反転した配座(IM1'')からはジアステレオマー(18-*epi*-IM2)に相当する立体異性体が生じることがわかる。すなわち、一度の環化によって生じる立体異性体は 18-*epi*-IM2 のエナンチオマーも含めると計 4 種類である。

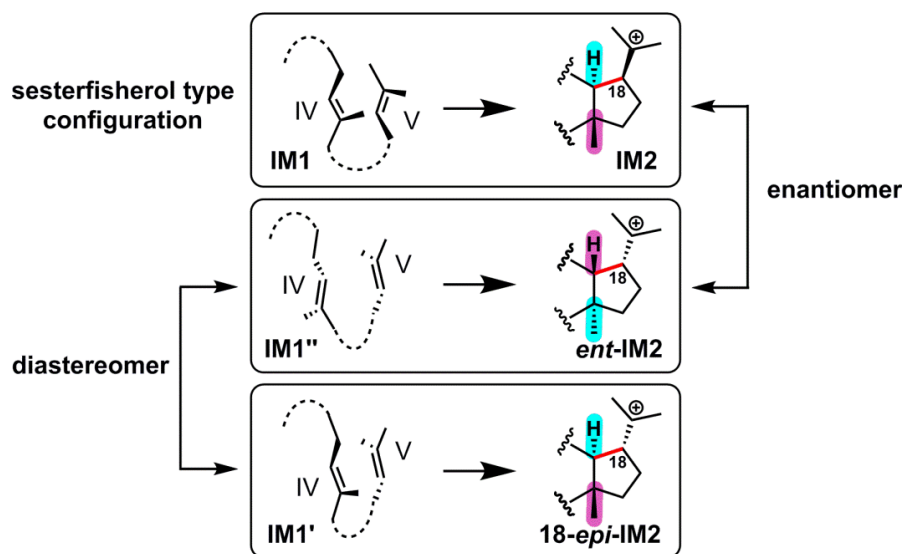


Fig. 1-33 A 環形成における二重結合の面選択性の違いによって生じ得る立体異性体

同様の立体化学の制御は B/C 環、D 環形成時にも生じるとすると、環形成の際に生じ得る異性体は最大 64 種類であると考えられる (Fig. 1-34)。また、最初の環化で生じた二環性中間体から四環性中間体へ至るまでの間に、Fig. 1-19 における Path A, B のいずれの中間体からも脱プロトン化や水の付加による生成物が生じ得る。さらに、Pb1 に見られるような二重結合の幾何異性も含めると、最終的に生成する環化体の種類は大幅に増大することになる。このようにクレード A に属する環化酵素は、環化の際の立体化学や環数、二重結合の幾何異性などを制御することにより、類似した平面構造を持ちながらも立体的には異なる構造を有する一連の化合物群を創出していると考えられる。

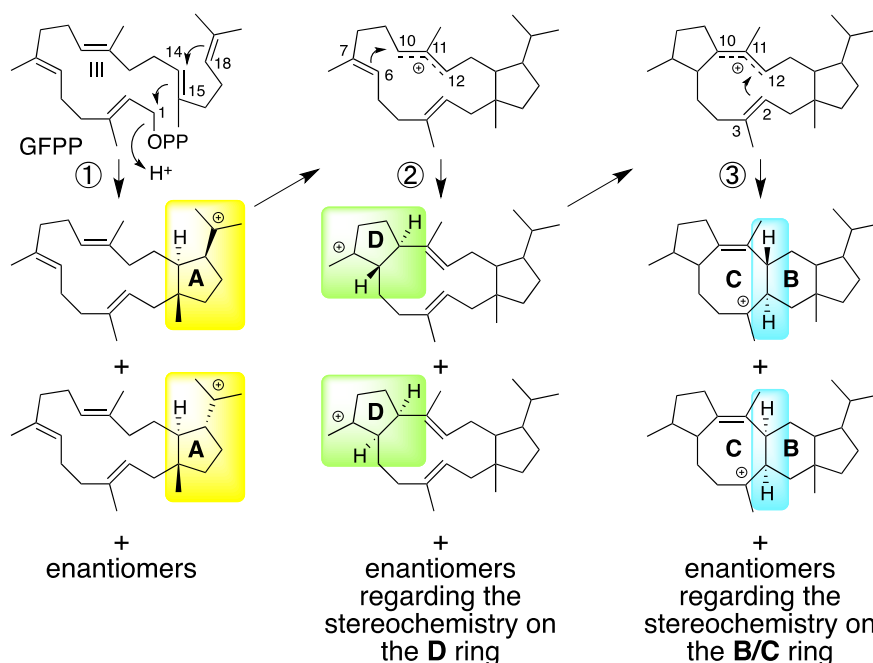


Fig. 1-34 3 つの環形成時に生じ得る sesterfisherol 型骨格の構造多様性

実際に、糸状菌や植物からは *sesterfisherol* と類似した骨格をもつ *retigeranic acid*^{13,14}や *nitinol*¹⁵、*aleurodiscal*¹⁶などが単離されており、その立体化学にはバリエーションが見られることがわかる(Fig. 1-35)。これらの A 環まわりの置換基に着目すると、*retigeranic acid B* は Bm1 や Bm2, *sesterfisherol* と同じ立体化学(14*S*, 15*R*, 18*R*)であるのに対し、*nitinol*, *aleurodiscal* の立体化学はそのエナンチオマー(14*R*, 15*S*, 18*S*)やジアステレオマー(14*S*, 15*R*, 18*S*)になっている。最近、植物由来のセスタテルペン環化酵素について機能解析が行われており、糸状菌におけるクレード A の環化酵素と類似の反応機構によって *sesterfisherol* と類似の骨格を与えることが示された¹⁷。これらの環化酵素はプレニル基転移ドメインを持たないものの、糸状菌由来の環化酵素の環化ドメインと相同性を示すことがわかった。例えば、糸状菌由来の *quiannulatene* 合成酵素 *EvQS* と、そのエナンチオマーを与える植物由来の環化酵素 *AtTPS25* (Fig. 1-36)¹⁷ との間には 22/57% (identity/similarity)の相同性が見られた。植物と糸状菌のもつ類似したセスタテルペン環化酵素の進化的な起源や生物学的意義については大変興味深く、今後のさらなる研究が待たれる。

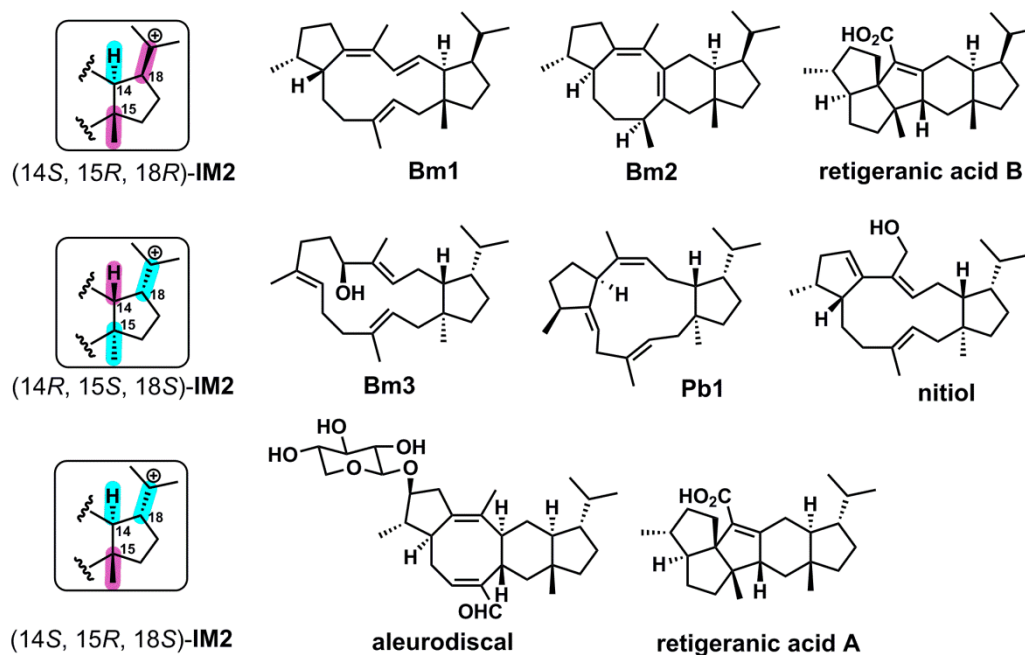


Fig. 1-35 *sesterfisherol* と類似した天然物における立体化学のバリエーション

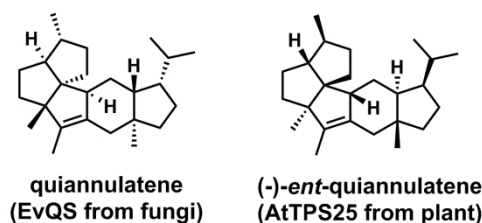


Fig. 1-36 糸状菌および植物由来の環化酵素 *EvQS*, *AtTPS25*

1-4. 1 章のまとめ

2007 年の PaFS の発見以降、複数の二機能性環化酵素遺伝子について探索・機能解析が進められてきた。しかしこれまでのゲノムマイニングでは、標的遺伝子は PaFS など既知環化酵素との相同性のみに基づいて選択されており、それがどのような環化体を与えるのか(あるいは生成物を与えないのか)を予め推定することはできなかった。本章では、環化ドメインの系統樹解析によって見出された主要なクレード A に着目し、これに属する 4 種の環化酵素について機能解析を行った。その結果得られた 4 種の新規化合物 Bm1, Bm2, Bm3, Pb1 は、いずれも同じクレード A に属する *sesterfisherol* と類似した平面構造を持つ一方で、立体化学はそれぞれ異なっていることがわかった。さらに計算化学で検証した環化機構を基に考察を加え、汎用性の高い環化経路を提唱することができた。本章における実験結果および考察から得られた知見を以下にまとめる。

a) クレード A, B における共通点と相違点

2つのクレードの共通点は、初めに大員環が形成された後に小員環が順次形成される点である。クレード A に属する NfSS や Bm1 など初めに 15-5 員環が形成され、その後 Fig. 1-19 に示した Path A, B のいずれかを経て 5-8-6-5 員環が形成される。同様にクレード B に属する PaFS や PaPS ではまず 11-5 員環が形成され、その後 5-8-5 員環や骨格転移反応を伴うことで 5-6-5-5 員環などが形成される。

一方、クレード A, B の相違点としては、初発の環化様式が異なることが挙げられる。クレード A の環化酵素では環化前駆体の 4 番目と 5 番目の二重結合の位置で環化が進行するのに対し、クレード B の環化酵素では 3 番目と 4 番目の二重結合の位置で環化が進行する。このことから、環の員数が厳密に認識されることによって環化位置が制御されていると考えられる。この違いによりクレード A からはセスタテルペンのみが得られると考えられ、クレード B からはジテルペンとセスタテルペンの両方が作り分けられる。また、環形成の機構に関して、クレード A では水素移動のみを繰り返すことで類似した平面構造を持つ骨格が構築されるのに対し、クレード B では水素移動のみの場合と炭素骨格の組換えが起こる場合の 2 通りの機構によって多様な骨格構造を与えている。

b) クレード A における環化酵素の機能

クレード A において、環化酵素が制御しているものは主に、①環化前駆体の初期配座、②環化に関わる二重結合の面選択性、③環化の順序、④クエンチング の 4 点であると考えられる。

①については前述のとおり環化に関わる二重結合の位置を制御しており、これはクレード内で共通の制御機構となっている。

②については、環が一つ形成される度に 4 種類の立体異性体が生じる可能性があり、この制御機構は環化酵素ごとに異なっている。実際、今回得られた化合物および構造類似天然物のもつ置換基の立体化学は環ごとにバリエーションが見られ、さらに二重結合の幾何異性体も生じ得ることがわかった。これにより、平面構造が類似しつつも立体的には異なる骨格をもつ天然物群が創出されている。

③については、現在機能解析済みの環化酵素から得られた化合物はいずれも Path A (A→D→

B/C 環)を経て形成されていると考えられる。しかし天然からは、Path B (A→B→C/D 環)を経ていると推定されるものもみられることから、環化の順序に関してはこの 2 通りの制御機構があるのではないかと考えられる。

④については、クエンチの位置や様式(脱プロトン化、水の付加)は環化酵素ごとに異なっている。これについては NfSS に対する変異導入実験により、脱プロトン化の位置の異なる生成物を得ることに成功したが、その詳細な制御機構は明らかになっていない。今後さらなる変異導入実験により詳細な知見が得られることが期待される。

このように、クレード A, B に関して言えばアミノ酸配列相同性と環化機構との間には確かに相関があることが示され、クレード A の環化酵素における構造多様性の創出戦略について新たな知見を得ることができた。環化様式の制御に関わるアミノ酸残基の特定などさらに詳細な解析が進められれば、アミノ酸配列に基づく生成物の推定や、人為的な酵素改変による天然物の骨格多様性の創出に繋がる可能性があると考えている。また、セスタテルペン環化機構における計算化学の有効性が示され、実験的には確かめられていない生合成経路や中間体について、計算化学に基づく推定が可能になると考えられる。

以上の知見に基づき、アミノ酸配列相同性に基づく新規テルペノイドの探索手法を今回新たに提案することができた。1)アミノ酸配列相同性をもとに機能未知のクレードを探索する。2)それに属する環化酵素遺伝子の機能解析を行い、環化生成物の構造を明らかにする。3)実験的、計算化学的にその生合成経路や中間体を推定することで、同じクレードから得られる化合物の構造について知見を得られるはずである。4)これに基づいてクレード特異的な機能解析を行うことにより、新規構造類似天然物群の網羅的合成が可能になるのではないかと考えている。本手法は新規骨格合成酵素の探索に加え、既知天然物の生合成に関わる環化酵素の同定においても有効であると考えられる。

参考文献

- ¹ Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, C.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K.; Oikawa, H.; *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846-11853.
- ² Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Quan, Z.; Abe, I. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 4644-4647.
- ³ Qin, B.; Matsuda, Y.; Mori, T.; Okada, M.; Quan, Z. Mitsunashi, T. Wakimoto, T.; Abe, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 1-5.
- ⁴ Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Lee, S.; Hoshino, M.; Mori, T.; Okada, M.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Fujita, M.; Abe, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5785-5788.
- ⁵ Okada, M.; Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Hoshino, S.; Mori, T.; Nakagawa, K.; Quan, Z.; Qin, B.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Kawaide, H.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10011-10018.
- ⁶ Quin, M. B.; Flynn, C. M.; Schmidt-Dannert, C. *Nat. Prod. Rep.*, **2014**, *31*, 1449-1473.
- ⁷ Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, C.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846-11853.
- ⁸ 佐藤玄, 東京大学大学院薬学研究科・薬学部 博士論文, **2016**.
- ⁹ Chen, M.; Chou, W. K. W.; Toyomasu, T.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *ACS Chem. Biol.* **2016**, *11*, 889-899.
- ¹⁰ Shao, J.; Chen, Q.; Lv, H.; He, J.; Liu, Z.; Lu, Y.; Liu, H.; Wang, G.; Wang, Y. *Org. Lett.* **2017**, *19*, 1816-1819.
- ¹¹ Liu, Z.; Chen, Y.; Chen, S.; Liu, Y.; Lu, Y.; Chen, D.; Lin, Y.; Huang, X.; She, Z. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1406-1409.
- ¹² Yoshikuni, Y.; Ferrin, T. E.; Keasling, J. D. *Nature*, **2006**, *440*, 1078-1082..
- ¹³ Kaneda, M.; Takahashi, R.; Iitaka, Y.; Shibata, S. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 4609-4611.
- ¹⁴ Sugawara, H.; Kasuya, A.; Iitaka, Y.; Shibata, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1991**, *39*, 3051-3054.
- ¹⁵ Kawahara, N.; Nozawa, M.; Kurata, A.; Hakamatsuka, T.; Sekita, S.; Satake, M. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1344-1345.
- ¹⁶ Lauer, U.; Anke, T. *J. Antibiot.* **1989**, *42*, 875-882.
- ¹⁷ Huang, A. C.; Kautsar, S. A.; Hong, Y. J.; Medema, M. H.; Bond, A. D.; Tantillo, D. J.; Osbourn, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2017**, *114*, E6005-E6014.

2 章 テルペン環化体の酸化修飾による生物活性天然物の酵素的合成

2-1. テルペノイド生合成における修飾酵素遺伝子

テルペノイド生合成では、環化酵素により構築された環化体が種々の修飾反応を受けることによって生物活性天然物へと導かれる。こうした修飾反応を触媒する酵素遺伝子は、糸状菌ゲノム上において環化酵素遺伝子の周辺に存在している。テルペノイド生合成遺伝子クラスターにおいては、酸化修飾を担う P450 や α -ケトグルタル酸依存型酸化酵素、フラビン依存型酸化酵素、short-chain dehydrogenase (SDR) などが多く存在する。基質となる環化体は炭化水素あるいはアルコール体であるため、不活性な sp^3 炭素の C-H 結合を活性化し酸化することができる P450 や α -ケトグルタル酸依存型酸化酵素が酸化修飾の第一段階を担うことが多い。一方、フラビン依存型酸化酵素や SDR は水酸基やオレフィン、アリル位炭素など比較的活性な部位の酸化に関わるため、生合成中期~後期の修飾段階を担うことが多い。また、これらによって導入された酸素官能基を足掛かりとして、種々の修飾酵素によってアセチル基やメチル基、糖などの官能基が導入される。例えば糸状菌由来のトリテルペンである helvolic acid の生合成経路^{1, 2} (Fig. 2-1)では、まず環化体である protosta-17(20)Z, 24-dien-3-ol から CYP5081A1 (P450)によって 29 位がカルボン酸に、AfuSDR1 (SDR)によって 3 位の水酸基がケトンに酸化される。続いて 29 位の脱炭酸が起こり、その後 P450 による 6, 7, 21 位の酸化、アシル基転移酵素による 6, 7 位のアセチル化、脱水素酵素による 1, 2 位への二重結合導入によって最終産物が生合成される。

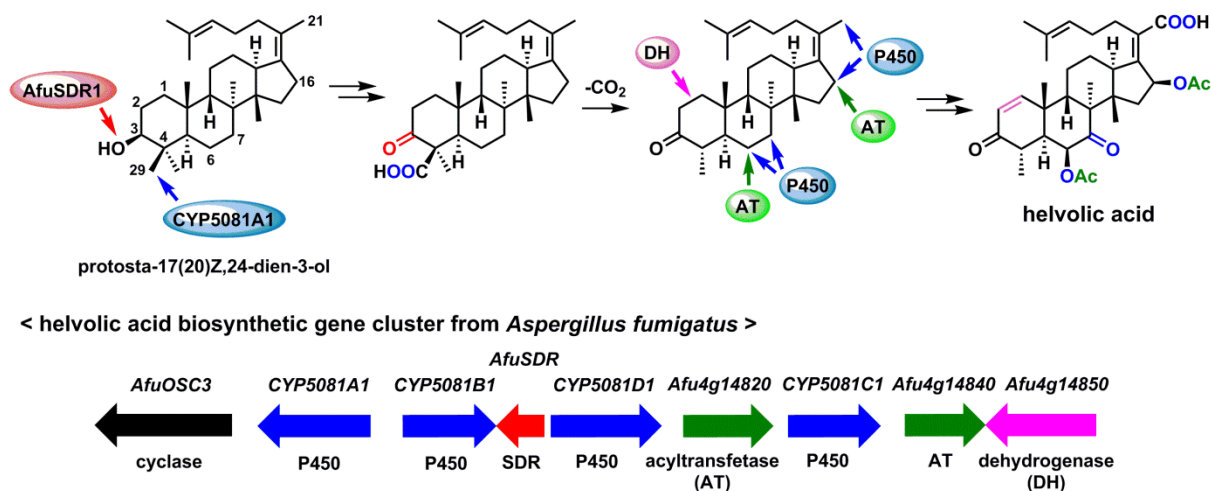


Fig. 2-1 *A. fumigatus* における helvolic acid 生合成経路

一般に、酵素反応の立体および位置選択性は厳密に制御されている。helvolic acid 生合成においても、4 位に置換している gem-ジメチル基の一方のみが酸化されている点や、6, 16 位に導入される官能基の立体化学から、酸化酵素による反応の選択性が見て取れる。また、CYP5081A1 が単独でメチル基をカルボン酸へ変換していることからわかるように、P450 などの酸化酵素は多段階の酸化反応を触媒する場合がある。そのため、テルペノイド生合成経路遺伝子クラスター中に見られる酸化酵素遺伝子は最終産物の酸化度に比して少数であることが多い。同様の多段階酸化反応は *Fusarium fujikuroi* における ent-kaurene から gibberellin A₁ の生合成でも報告されており、

遺伝子クラスター中に見られる 4 種の P450 が計 13 段階の酸化修飾を担っていると推定されている³ (Fig. 2-2)。また、*ent*-kaurenoic acid から gibberellin A₁₄, gibberellin A₄ への変換過程では B 環の縮小や 20 位の酸化的脱メチル化が起きていることから、酸化酵素は炭素骨格の改変においても重要な役割を果たしていることがわかる。以上のことから、酸化酵素は生物活性テルペノイド生合成において構造多様性を創出するための鍵酵素であるといえる。

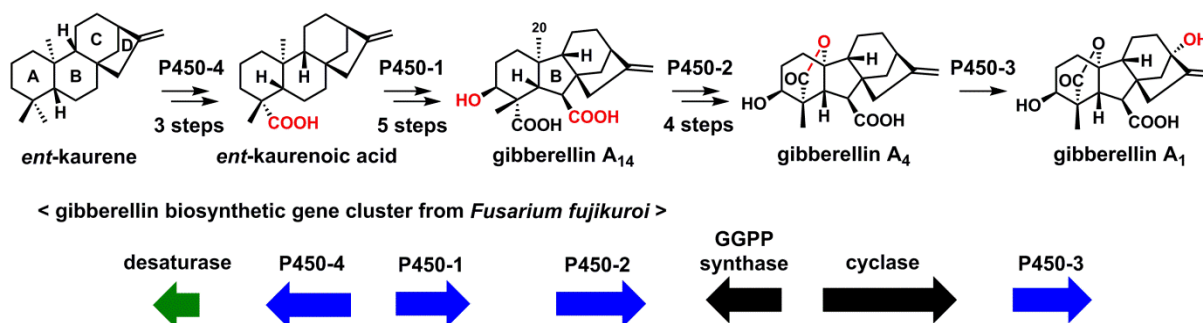


Fig. 2-2 *F. fujikuroi* における gibberellin 生合成経路

序章にて紹介した ophiobolin F 合成酵素 (AcOS)や、1 章で機能解析を行った 4 種の環化酵素遺伝子の周辺からも複数の修飾酵素遺伝子が見つかった。これらの環化酵素遺伝子と酸化酵素遺伝子を麹菌内で共発現させることにより、生物活性テルペノイドを取得できる可能性があると考えられた。本章では、遺伝子クラスターの機能解析により既知あるいは新規天然物の取得に成功した 3 つの例、terpestacin, betaestacin, ophiobolin の生合成について記載する。

2-2. 実験結果と考察-クレード A 由来環化体の酸化修飾

2-2-1. terpestacin 生合成遺伝子クラスターの機能解析

5-15 員環骨格の 10 位に水酸基をもつセスタテルペンアルコールである Bm3 は、既知天然物である terpestacin および類縁化合物と同じ 15-5 員環骨格を持つ。terpestacin は 1993 年に *Arthrinium* sp. から単離されたセスタテルペノイドであり、合胞体形成阻害活性や抗腫瘍活性を示すことが知られている^{4,5}。また、*Fusarium proliferatum*, *Alternaria alternata* からは 25 位の水酸基にアセチル基やグルコースが導入された fusaproliferin⁶や 25-glucosylterpestacin⁷が単離されている(Fig. 2-3)。その生合成については明らかにされていないが、Bm3 が生合成中間体であると仮定すると A 環と 25 位に対する酸化修飾が必要になる。実際に *BmTS3* (*tpcA*)の周辺には 3 種の P450、フラビン依存型酸化酵素などの酸化酵素遺伝子が存在していた(Fig. 2-4, *tpc* クラスター)。さらに、terpestacin および fusaproliferin の生産菌として知られる *Bipolaris sorokiniana*⁸, *Fusarium proliferatum*⁶ のゲノム上を探索したところ、*B. maydis* 由来の *tpc* クラスターと類似の遺伝子クラスターが見出された。その内 2 種の P450 (*tpcB*, *tpcC*)とフラビン依存型酸化酵素(*tpcD*)が全ての遺伝子クラスターに共通していたことから、これらが terpestacin の生合成に関与している可能性が高いと考えられた。そこで、*tpcA* と *tpcBCD* の共発現による異種生産を試みた。

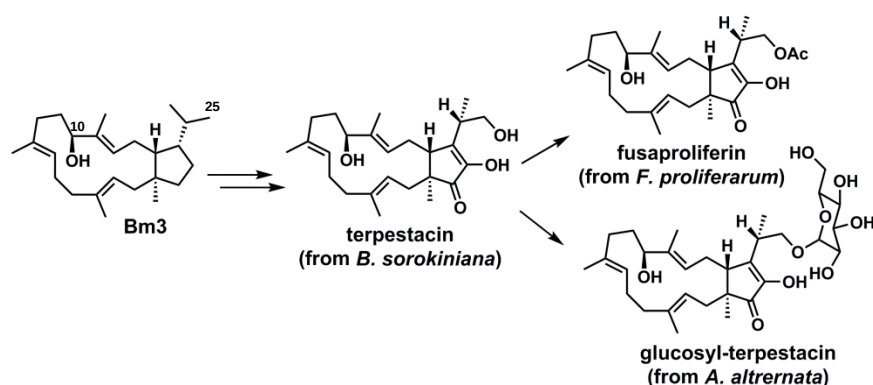
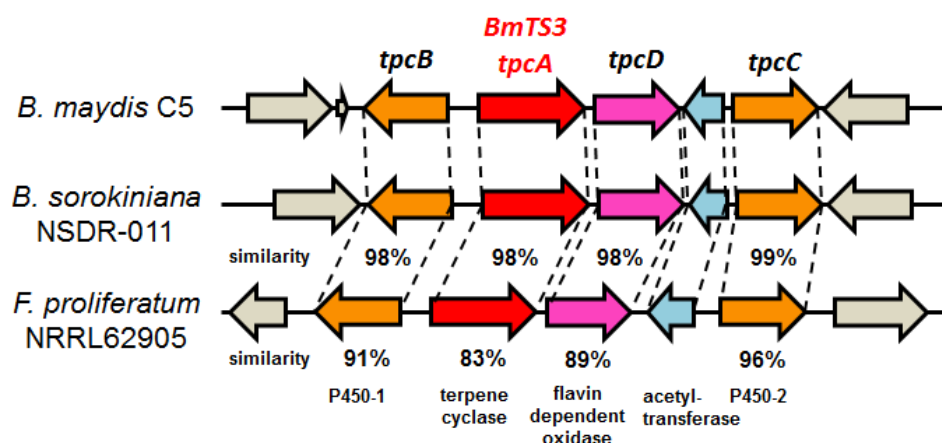


Fig. 2-3 terpestacin 類縁化合物



Gene	Amino acids /Base pairs	Protein homologue (Accession number)	Similarity/ Identity (%)	Pfam domain (number)
<i>tpcA</i>	704/2210	NfSS (XP_001258098), <i>Neosartorya fischeri</i>	70/42	Polyprenyl synthetase (PF00348)
<i>tpcB</i>	506/1845	benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450 (KXH27883), <i>Colletotrichum simmondsii</i>	91/76	Cytochrome P450 (PF00067)
<i>tpcC</i>	525/1685	Trichodiene oxygenase (OCT53733), <i>Cladophialophora carrionii</i>	75/50	Cytochrome P450 (PF00067)
<i>tpcD</i>	518/1713	Bifunctional solanapyrone synthase (OMP86940), <i>Diplodia seriata</i>	88/70	FAD binding_4 (PF01565)

Fig. 2-4 3種の糸状菌由来の *tpc* クラスター

B. maydis C5株のゲノム DNA から *tpcA*, *tpcB*, *tpcC*, *tpcD* をクローニングし、発現用プラスミド *tpcAB*-pUSA2, *tpcCD*-pUARA2 を構築した。これを用いて麹菌四重形質転換株 AO-*tpcABCD* を構築し、その代謝産物を解析した。LC-MS 分析の結果(Fig. 2-5)、2つの新たな化合物 **11**, **14** のピークが観測され、HR-MS によりそれぞれの分子式を **11**: C₂₅H₄₀O₃, **14**: C₂₅H₃₈O₄ と決定した。分子式からこれらはいずれも Bm3 の酸化生成物と推定され、特に **14** は予想生成物である terpestacin と同じ分子式を与えたことから、これらの単離および構造決定を試みた。AO-*tpcABCD* の大量培養により固体培地 1 kg あたり **11** を 1.8 mg, **14** を 11 mg の収量で単離し、NMR による構造解析を行った。その結果、**14** の ¹H, ¹³C-NMR スペクトルは terpestacin の文献値とよく一致しており、その旋光度([α]_D²⁵ -21 (c 0.1, MeOH))も文献値([α]_D²⁵ -18 (c 0.1, MeOH))⁹とよい一致を示したことから、これが(-)-terpestacin であることが確かめられた。これにより、2章で構造解析を行った Bm3 の絶対配置を 10*S*, 14*R*, 15*S*, 18*S* と決定した。また、**11** は Bm3 のイソプロピル基がカルボン酸に酸化された化合物であることがわかった。天然物ではイ

ソプロピル基はモノオールに酸化されていることから、これは **terpestacin** 生合成経路における分岐生成物と推定された。

続いて、**terpestacin** 生合成経路における各遺伝子の機能推定および中間体の同定を試みた。**Bm3** に対する一段階目の酸化反応には P450 である *tpcB*, *tpcC* のいずれかが関与すると予想されたことから、まずは前述のプラスミド *tpcAB*-pUSA2 を用いて二重形質転換体 AO-*tpcAB* を構築した。その代謝産物を LC-MS によって分析したところ (Fig. 2-5)、**11** に加え新たに生成物 **12** のピークが観測され、HR-MS によりその分子式を $C_{25}H_{42}O_2$ と決定した。**12** と **11** の生成比は培養期間が長くなるほど **11** へ偏る傾向が見られたことから、液体培地での短期間培養を試みた。これにより **12** を液体培地 1 L あたり 3.2 mg の収量で単離し、NMR による構造解析を行った。その結果、**12** は **Bm3** のイソプロピル基に水酸基が導入された酸化生成物 (preterpestacin II) であることがわかった。

12 から **14** を生合成するためには、16, 17 位に対する酸化修飾が必要である。そこで、*tpcC*-pUARA2 を調製し AO-*tpcAB* に対して導入することで三重形質転換体 AO-*tpcABC* を構築した。その代謝産物を LC-MS によって分析したところ (Fig. 2-5)、新たな生成物 **13** のピークが観測され、HR-MS により分子式を $C_{25}H_{42}O_4$ と決定した。これを固体培地 1 kg あたり 1.2 mg の収量で単離し、NMR による構造解析を行った。その結果、**13** は **12** の 16 位、17 位が 1,2-ジオールに酸化された化合物 (preterpestacin III) であることがわかった。以下に、各化合物の構造決定の詳細についてまとめた (Table 2-1, Fig. 2-6)。

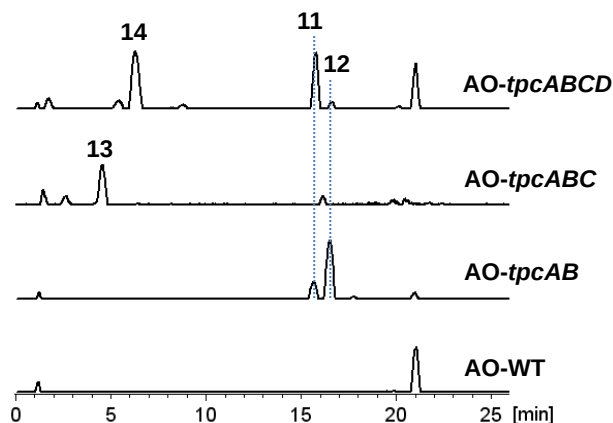


Fig. 2-5 麹菌形質転換体の代謝産物の LC-MS 分析

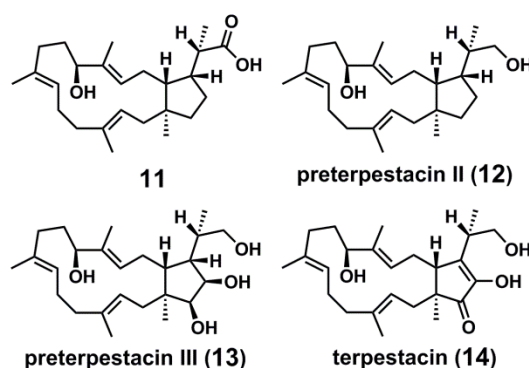


Fig. 2-6 **11-14** の分子構造

< **12** の構造解析 >

分子式 $C_{25}H_{42}O_2$ から酸素分子が **Bm3** よりも 1 つ多いことがわかり、不飽和度が 5 であることから、**Bm3** に水酸基が 1 つ導入された構造であると考えられる。また、 1H , ^{13}C -NMR においてほとんどのシグナルが **Bm3** のものとよく一致していることから、**Bm3** と同様の骨格構造をもつことがわかる。**Bm3** におけるメチル基の二重線プロトンシグナル (δ_H 0.95) が消失し、新たにオキシシメチンのプロトンシグナル (δ_H 3.22, 3.62) および炭素シグナル (δ_C 67.0) が観測されていることから、25 位が水酸化されていることがわかった。NOESY 解析により、 $\alpha H1\alpha$ -H23- $\alpha H16$, H18- $\beta H16$, H14-H12-H10- $\beta H1$ の間でそれぞれ相関が見られたことから、**Bm3** と同様の立体化

学であることが確認された(Fig. 2-7)。

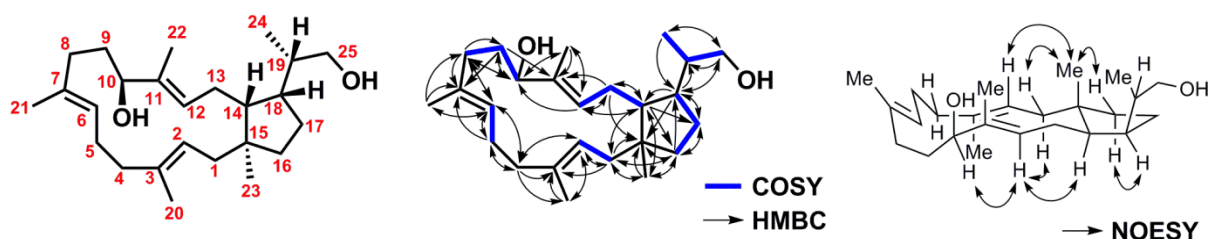


Fig. 2-7 12 の 2D-NMR

< 11 の構造解析 >

分子式 $C_{25}H_{40}O_3$ から、**12** よりもさらに酸化修飾が進んだ化合物であると推定された。 1H , ^{13}C -NMR から、Bm3 におけるメチル基のプロトンシグナル(δ_H 0.95)が消失し、新たにカルボニル炭素シグナル(δ_C 180.5)が観測されていることから、25 位がカルボン酸に酸化されていることがわかった(Fig. 2-8)。

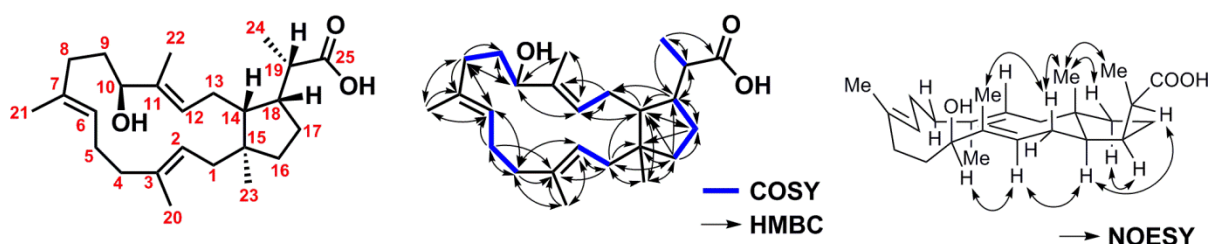


Fig. 2-8 11 の 2D-NMR

< 13 の構造解析 >

分子式 $C_{25}H_{42}O_4$ から、**12** よりもさらに酸化修飾が進んだ化合物であると推定された。 1H , ^{13}C -NMR について **12** のものと比較すると、新たに 2 つのオキシメチンのプロトンシグナル(δ_H 3.64, 3.99)および炭素シグナル(δ_C 80.7, 72.1)が観測されたことから、**12** に対して 2 つの水酸基が導入された化合物であると推定された。23 位・16 位間の HMBC 相関および 16 位・17 位間の COSY 相関から、16, 17 位が水酸化されていることがわかった。NOESY 解析により、H23-H16, H24-H17 の間でそれぞれ相関が見られたことから、16 位・17 位の水酸基がそれぞれ β 面に位置していると推定された(Fig. 2-9)。この 1,2-ジオールが syn 配置であることを確かめるため、**13** のアセトニド保護を試みた(Fig. 2-10)。**13** をアセトン中で酸処理することにより、環状アセタール構造を持つ **15** の生成が確認されたことから、NOESY 相関から推定された立体化学が正しいことが確認された。

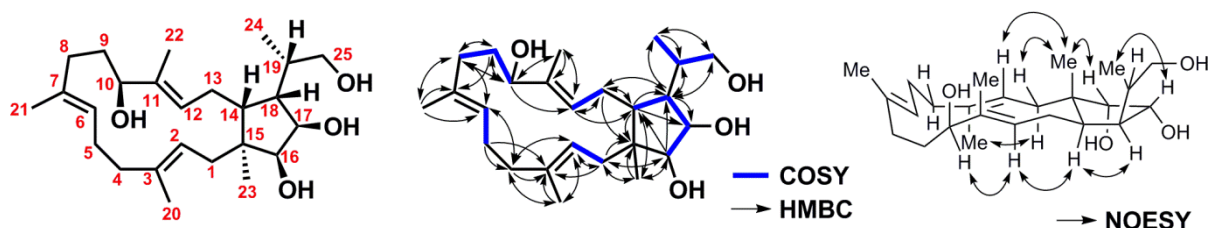


Fig. 2-9 13 の 2D-NMR

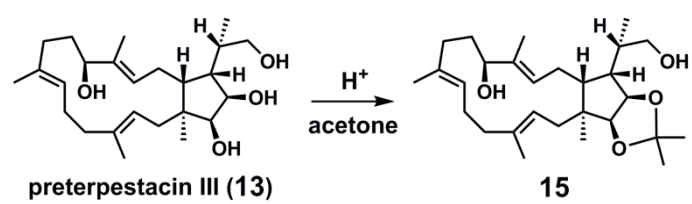


Fig. 2-10 13 のアセトニド保護

Table 2-1 terpestacin 類縁化合物の NMR データ

CDCl ₃	terpestacin		CDCl ₃	preterpestacin II		C ₆ D ₆		11	CDCl ₃	preterpestacin III	
	δ_C	δ_H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)		δ_C	δ_H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	δ_C	δ_H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)			δ_C	δ_H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)
1	39.5	1.68-1.80 (m)	1	42.6	1.85 (dd, 8.7, 13.5)	1	43.1	1.89 (m)	1	34.7	2.05 (m)
2	121.7	2.40 (dd, 10.4, 13.7)	2	125.2	2.08 (m)	2	125.1	2.21 (dd, 7.7, 13.4)	2	122.7	2.39 (dd, 8.3, 13.6)
3	138.3	5.25 (dd, 5.2, 10.1)	3	134.8	5.21 (m)	3	135.2	5.36 (t, 7.7)	3	136.0	5.28 (t, 7.7)
4	40.5	-	4	39.8	-	4	40.2	-	4	39.9	-
		1.90-2.04 (m)			2.05 (m)			2.10 (m)			2.11 (m)
		2.22-2.30 (m)									
5	24.0	2.22-2.30 (m)	5	23.9	2.10 (m)	5	24.1	2.13 (m)	5	24.0	2.11 (m)
6	124.5	5.14 (m)	6	124.8	5.14 (t, 6.2)	6	125.0	5.30 (brt, 5.6)	6	125.4	2.19 (m)
7	133.1	-	7	132.6	-	7	133.0	-	7	132.8	5.02 (br)
8	35.1	1.68-1.80 (m)	8	35.1	1.76 (m)	8	35.5	1.90 (m)	8	35.2	1.78 (m)
		2.09-2.12 (m)			1.99 (m)			2.06 (m)			2.04 (m)
9	30.0	1.68-1.80 (m)	9	29.8	1.62 (m)	9	30.5	1.71 (m)	9	29.7	1.61 (m)
					1.76 (m)			1.89 (m)			1.79 (m)
10	76.7	4.07 (dd, 4.0, 10.1)	10	77.0	3.92 (dd, 3.6, 10.2)	10	77.1	4.01 (dd, 3.2, 9.0)	10	77.2	3.94 (dd, 4.0, 9.9)
11	136.7	-	11	133.7	-	11	134.8	-	11	133.7	-
12	129.1	5.41 (m)	12	132.3	5.18 (m)	12	131.5	5.30 (brt, 5.6)	12	131.9	5.17 (t, 5.8)
13	29.0	1.90-2.04 (m)	13	23.1	1.92 (t, 5.0)	13	24.4	1.93 (m)	13	25.0	1.94 (m)
		2.45 (d, 17.4)						2.13 (m)			2.05 (m)
14	49.8	2.72 (dd, 2.1, 11.3)	14	45.8	1.76 (m)	14	47.0	2.12 (m)	14	45.5	2.06 (m)
15	49.1	-	15	46.2	-	15	46.2	-	15	46.9	-
16	208.0	-	16	41.2	1.38 (m)	16	41.7	1.36 (m)	16	80.7	3.64 (br)
					1.51 (m)			1.45 (m)			
17	146.8	-	17	28.0	1.23 (m)	17	27.6	1.02 (m)	17	72.1	3.99 (br)
					1.71 (m)			1.53 (m)			
18	149.0	-	18	46.5	1.73 (m)	18	47.2	2.33 (m)	18	49.2	2.31 (m)
19	37.3	2.68 (m)	19	36.7	1.64 (m)	19	41.4	2.39 (m)	19	33.8	1.89 (m)
20	15.5	1.64 (s, Me)	20	15.7	1.57 (s, Me)	20	15.8	1.64 (s, Me)	20	15.6	1.64 (s, Me)
21	15.8	1.65 (s, Me)	21	15.3	1.59 (s, Me)	21	15.6	1.58 (s, Me)	21	15.2	1.61 (s, Me)
22	10.7	1.58 (s, Me)	22	10.6	1.54 (s, Me)	22	10.9	1.64 (s, Me)	22	10.4	1.55 (s, Me)
23	16.4	1.01 (s, Me)	23	23.9	0.94 (s, Me)	23	24.2	1.00 (s, Me)	23	21.8	0.97 (s, Me)
24	14.6	1.30 (d, Me, 7.3)	24	16.5	0.98 (d, Me, 6.4)	24	17.7	1.12 (d, Me, 6.7)	24	14.4	1.14 (d, Me, 6.9)
25	66.3	3.83 (dd, 5.5, 10.4)	25	67.0	3.22 (dd, 8.2, 10.5)	25	180.5	-	25	68.8	3.55 (dd, 3.5, 11.1)
		3.90 (dd, 7.0, 10.4)			3.62 (dd, 3.6, 10.5)						3.63 (br)

2-2-2. terpestacin の推定生合成経路

2-2-1 で得られた生合成中間体および分岐生成物の化学構造から、terpestacin の生合成経路を次のように推定した(Fig. 2-11)。まず環化体 preterpestacin I (**Bm3**)から、P450 である TpcB によって 25 位に水酸基が導入されることで preterpestacin II (**12**)が生産される。基質である Bm3 の ¹H-NMR において 24, 25 位のメチル基のシグナルはそれぞれ異なる化学シフトを与えていることから(Table 2-1)、これらは化学的に非等価であることがわかる。これにより TpcB はプロキラルな置換基を認識し、酸化修飾の位置選択性を厳密に制御していると考えられる。同様の例は *Phomopsis amygdali* における fusicoccin J の 19 位に対する酸化修飾にも見られ¹⁰(Fig. 2-12)、その位置選択性は TpcB と共通していることから、類似した機能をもつ酸化酵素が異なる天然物を与える遺伝子クラスター間で存在していることがわかる。

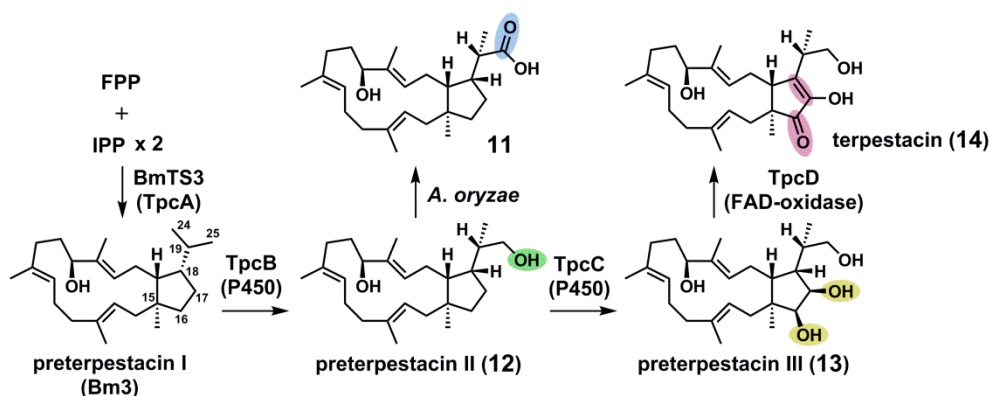


Fig. 2-11 terpestacin の推定生合成経路

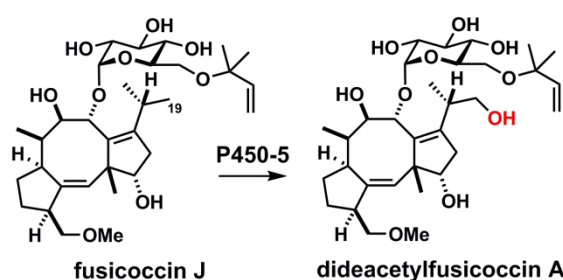


Fig. 2-12 *Phomopsis amygdali* における fusicoccin 生合成

続いて、2 つ目の P450 である TpcC によって **12** の 16-17 位が立体選択的に 1,2-ジオールへ酸化されることで preterpestacin III (**13**)が生産される。このとき導入される水酸基はどちらもβ面に位置していることから、TpcC の反応における立体選択性には 15, 18 位の置換基による立体障害が影響している可能性があると考えられる。また、**12** の 25 位がカルボン酸に酸化されることで生じる **11** も得られている。AO-*tpcAB* の解析において、培養期間が長くなるにつれて **12** が消費され **11** の生産量が増加する傾向が見られたことから、**11** は宿主由来の酸化酵素の働きによって生成した分岐生成物であると推定される。類似の例として、麴菌による solanapyrone の異種生産において生合成中間体 prosolanapyrone I が宿主によって分岐生成物へと変換されることが報告されている¹¹(Fig. 2-13)。この例においても **11** の酸化修飾と同様に、prosolanapyrone I を基質

とする Sol6 (P450)を追加導入することで次の生合成中間体 prosolanapyrone II が得られている。このことから、宿主による副反応は生合成経路における下流の酸化酵素を追加導入することで抑制することができると考えられる。

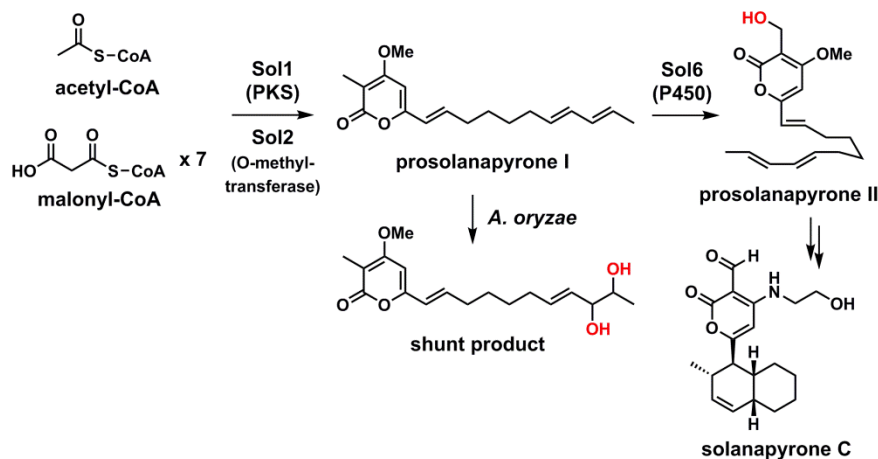


Fig. 2-13 麹菌による solanapyrone C の異種生産

最後に **13** の 16 位-17 位がフラビン依存型酸化酵素 TpcD によって α -ジケトンへと酸化され、17 位がエノール化することで最終産物 terpestacin (**14**)が生合成されることが考えられる。**12** から **13**, **14** への生合成機構は、chaetoglobosin 生合成に見られる後期修飾段階のそれと類似している¹²(Fig. 2-14)。この場合、生合成中間体である prochaetoglobosin I の 19 位-20 位が P450 によって 1,2-ジオールへと酸化され、さらにフラビン依存型酸化酵素(CHGG_01242-2)によって 20 位が酸化され α -ケトールを形成することで chetoglobosin A が生合成される。TpcD と CHGG_01242-2 はいずれも FAD binding 4 モチーフを持つ vanillyl alcohol oxidase (VAO)ファミリー¹³に属しており、同様の反応機構によって水酸基をケトンへと酸化していると考えられる。一方で、TpcD は 1,2-ジオールをジケトンへと酸化しているのに対し、CHGG_01242-2 は 20 位の水酸基のみを酸化していることから、両者は酸化の触媒回数が異なっていることがわかる。

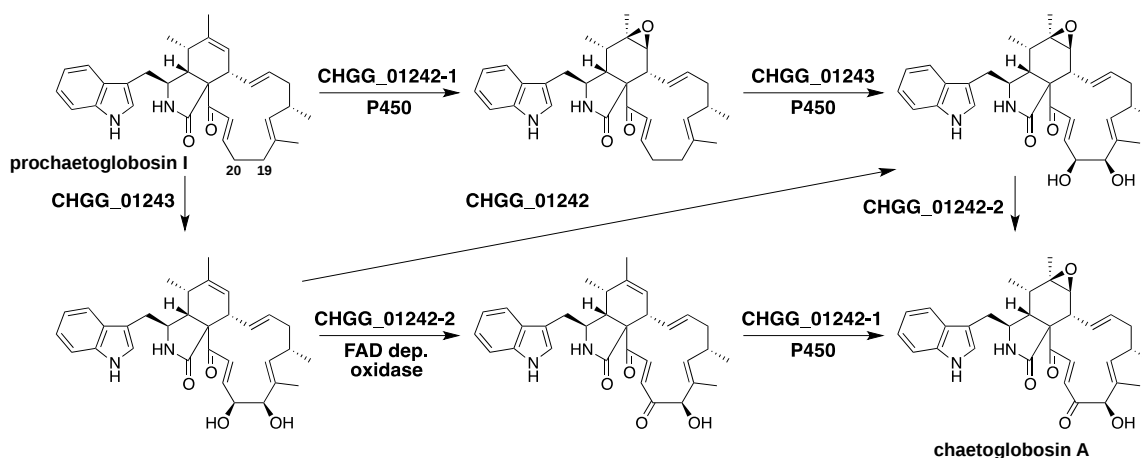


Fig. 2-14 chetoglobosin 生合成経路

2-2-3. betaestacin 生合成遺伝子クラスターの機能解析

Phoma betae PS-13 のゲノム上において、*PbTS* (*btcA*) の周辺には 2 種の P450 (*btcB*, *btcC*) および α -ケトグルタル酸依存型酸化酵素 (*btcD*) が存在していた (Fig. 2-15, *btc* クラスター)。これらを共発現させることにより、Pb1 が酸化修飾を受けて生じる新規天然物が得られると期待された。当研究室の高によってこれらの機能解析が行われたので、その結果を本項に記載する。

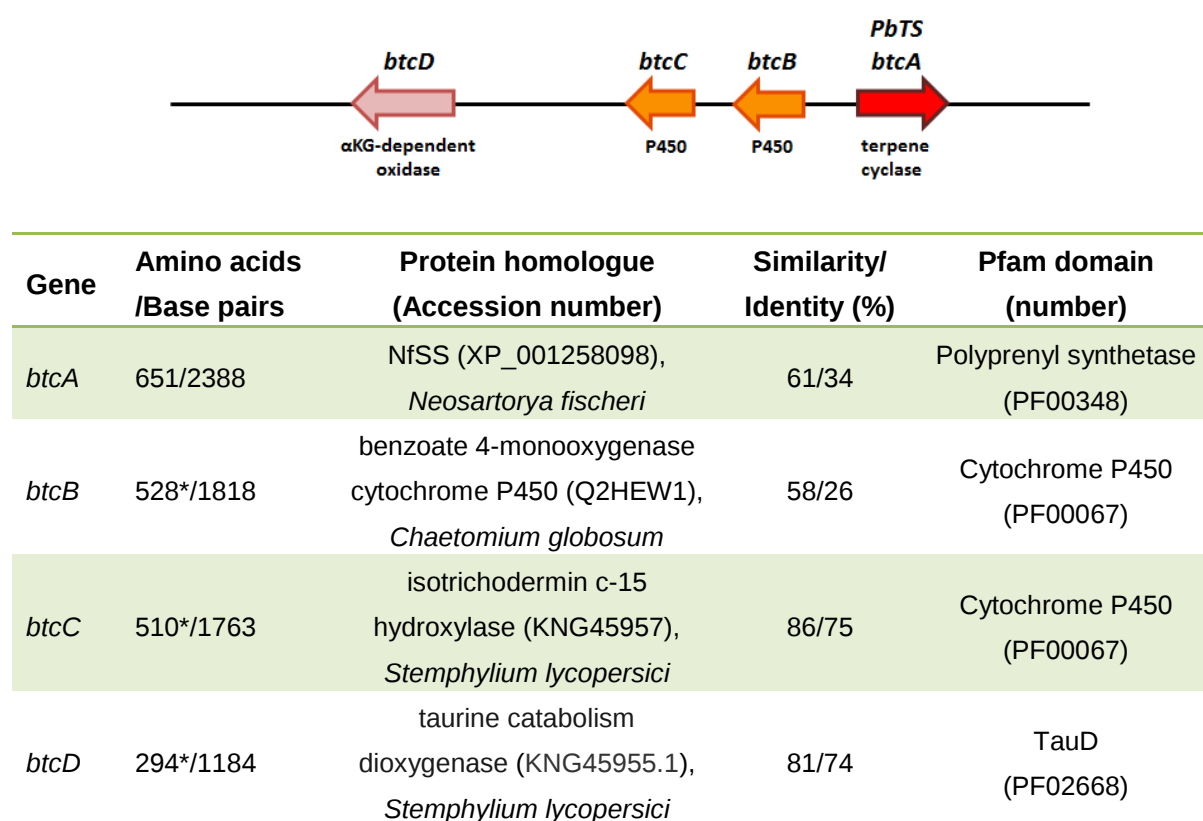


Fig. 2-15 *btc* クラスター

P. betae PS-13 のゲノム DNA から *btcB*, *btcC*, *btcD* をクローニングし、発現用プラスミド *btcB*-pUSA2, *btcBC*-pUSA2, *btcD*-pAdeA2 を調製した。これを用いて麹菌発現系 AO-*btcAB*, AO-*btcABC*, AO-*btcABCD* を構築し、代謝産物を解析した。LC-MS 分析の結果、AO-*btcAB* から新たな生成物のピークが観測され (Fig. 2-16)、HR-MS から分子式を $C_{25}H_{36}O_4$ と決定した。この化合物を米培地 1 kg あたり 116 mg の収量で単離し、NMR による構造解析を行った (Table 2-2)。 1H , ^{13}C -NMR において、Pb1 に見られる 24, 25 位のメチル基のプロトンシグナル (δ_H 0.88, 1.03) が消失し、新たに 2 つのカルボン酸の炭素シグナル (δ_C 174.0, 174.1) が観測されたことから、Pb1 の 24, 25 位がジカルボン酸に酸化された構造であることがわかった。NOESY 解析により、Pb1 と同様の立体化学を持つことが確認された。以上の結果から、*btcB* が Pb1 の酸化修飾を担っていることがわかり、この新規化合物を betaestacin II とした (Fig. 2-17)。AO-*btcABC*, AO-*btcABCD* の代謝産物を解析したところ、AO-*btcAB* と同様のプロファイルを与えたことから、*tpcC*, *tpcD* は Pb1 や betaestacin II の酸化修飾に関与しないことがわかった。

m/z 350-410

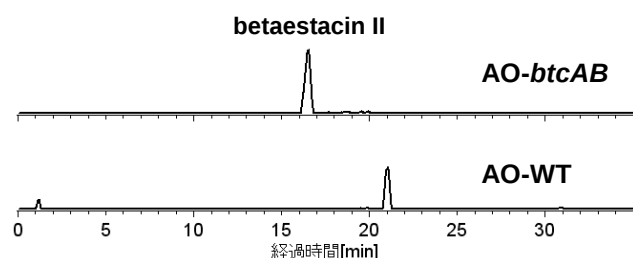


Fig. 2-16 AO-*btcAB*の代謝産物の LC-MS 分析

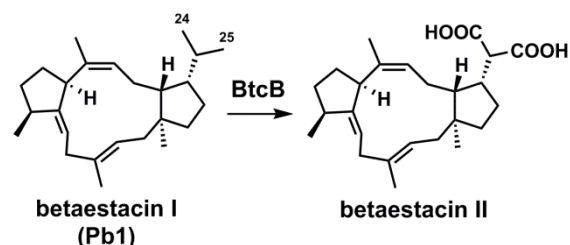


Fig. 2-17 betaestacin II の生合成

環化生成物のメチル基がカルボン酸に酸化される例は多く、糸状菌由来のセスタテルペンにもよく見られる (Fig. 2-18)。例えば、*Neosartorya fisheri*, *Emericella varicolor* からゲノムマイニングによって *sesterfisheric acid*¹⁴ や *stellatic acid*¹⁵, *quiannulatic acid*¹⁶ のカルボン酸形成に関わる P450 が同定されている。また、*Aspergillus terreus* や地衣類である *Lobaria retigera* からは、*sesterfisheric acid* や *betaestacin* と類似した骨格をもつ *aspterpenacid*¹⁷, *retigeranic acid*¹⁸ が単離されている。これらの化合物は 1 つのメチル基がモノカルボン酸に変換されたものであり、同定された P450 はいずれも単独で 3 段階の酸化反応を触媒している。これに対して Pb1 から *betaestacin II* への変換においては BtcB が単独で 6 段階もの酸化反応を触媒するジカルボン酸を形成している点が興味深い。

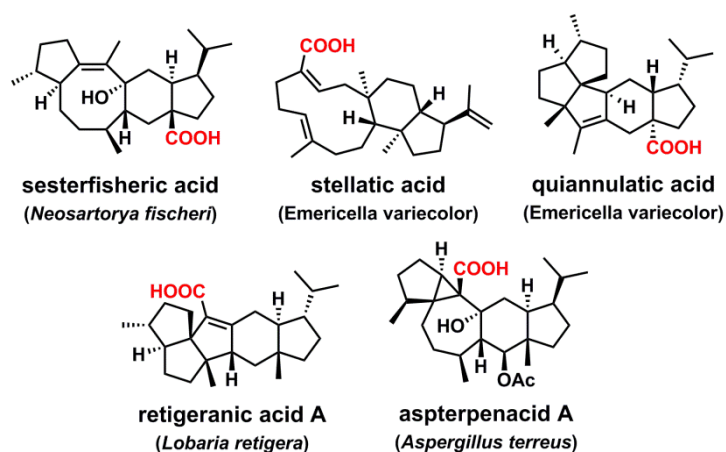


Fig. 2-18 セスタテルペン酸の例

Table 2-2 betaestain II の 1D-NMR

CDCI ₃	Betaestacin II	
	δ_C	δ_H (multiplicity, J in Hz)
1	43.9	1.85 (d, 14.4) 2.10 (m)
2	125.6	5.11 (d, 10.2)
3	134.3	-
4	37.2	2.43 (d, 14.4) 2.87 (dd, 10.8, 13.2)
5	122.6	4.80 (d, 9.0)
6	139.9	-
7	32.4	2.71 (t, 7.8)
8	33.6	1.47 (m) 1.90 (t, 9.0)
9	27.2	1.57 (m)
10	50.5	3.15 (m)
11	142.1	-
12	126.1	5.38 (d, 10.8)
13	25.5	1.59 (m) 2.15 (m)
14	48.2	1.76 (m)
15	25.1	-
16	41.7	1.48 (m)
17	28.3	1.61 (m)
18	43.2	2.95 (m)
19	52.8	3.52 (d, 10.2)
20	18.8	1.71 (s)
21	22.6	1.00 (d, 9.0)
22	20.4	1.53 (s)
23	25.0	0.99 (s)
24	174.1	-
25	174.0	-

二機能性環化酵素の探索を行う過程で、*Colletotrichum orbiculare* からも *btcA* のホモログ(*btcA_{Co}*と表記する)が見出されており、機能解析の結果 betaestacin I を与えることが確認された。さらにその周辺には *P. betae* 由来のクラスター中の遺伝子(*btcX_{Pb}*)と相同性を示す *btcB_{Co}*, *btcC_{Co}*, *btcD_{Co}*が存在していた(Fig.2-19)。当研究室の高によってこれら酸化酵素遺伝子の機能解析が行われ、betaestacin II とは異なる酸化様式をもつ 6 種の新規化合物が取得された。その生合成経路において BtcB_{Co}は betaestacin I の 25 位を酸化することで betaestacin III, IV を与え、BtcC_{Co}は betaestacin IV の 2-3 位, 5 位, 7 位, 10 位, 21 位を酸化することで betaestacin Va, Vb, Vc, VI を与えることがわかった(Fig. 2-19)。興味深いことに、*btcB_{Co}*, *btcB_{Pb}*はともに betaestacin I のイソプロピル基を酸化するものの、その基質特異性と触媒回数が異なっている。また、*btcC_{Pb}*は生成物を与えなかったのに対し、*btcC_{Co}*は B, C 環の酸化修飾によって 4 種の生成物を与えている。このことから、類似した遺伝子クラスターから異なる構造をもつ酸化生成物が得られる場合があることが示された。これは、生産菌と同じ既知天然物を与えた *tpc* クラスターの例とは対照的な結果である。

この結果は、類似クラスター中の各遺伝子の相同性の違いが反映されていると考えられる。Fig 2-4 に示した 3 つの *tpc* クラスター中に存在する各遺伝子は、いずれも 83-99%という極めて高い相同性を示した。一方、2 つの *btc* クラスター中に存在する遺伝子の相同性はそれぞれ 40%以下であった。また、糸状菌の gibberellin 生合成において、*Gibberella fujikuroi* および *Phaeosphaeria* sp. 由来の環化酵素 Gcps/ks, Pcps/ks は 45%の相同性を示し、ともに *ent*-kaurene を与えることが知られている¹⁹。このことから、ホモログどうしが同一の機能を持つかどうか予測する上で、およそ 40%という相同性がひとつの判断基準となる可能性があると考えられる。

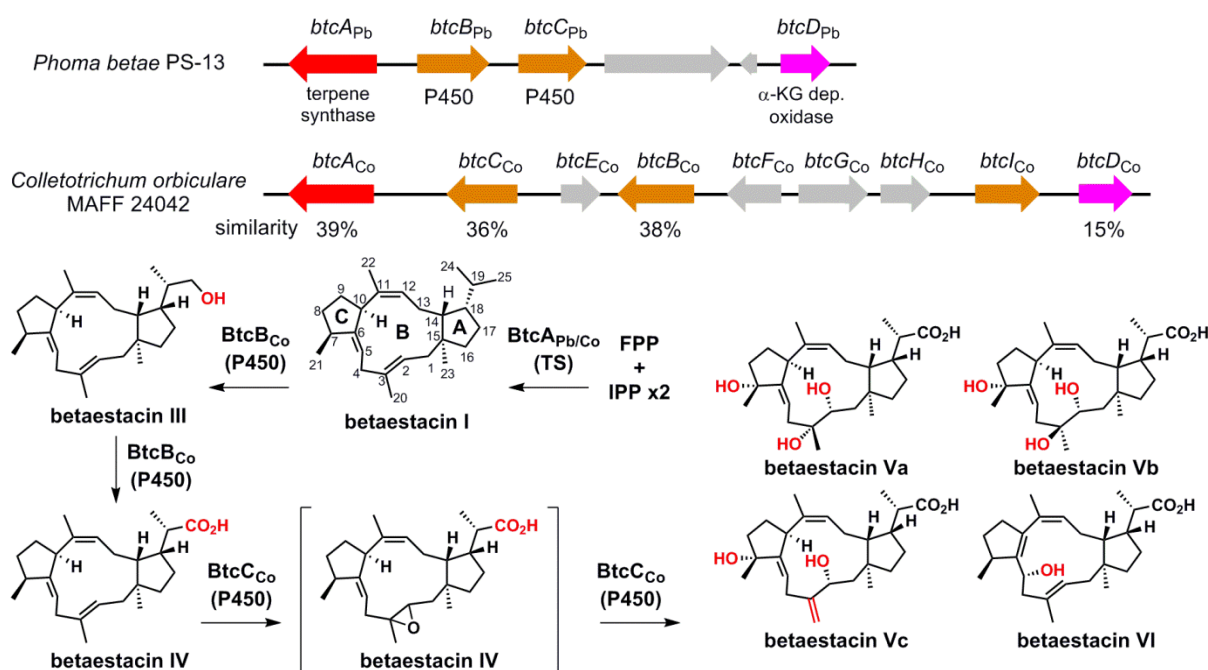


Fig. 2-19 *btcCo* クラスターにおける betaestacin 生合成

2-3 実験結果と考察・ophiobolin 類縁化合物の生合成研究

2-3-1. ophiobolin 類縁化合物

特徴的な 5-8-5 縮環骨格をもつ ophiobolin 類縁化合物は糸状菌の生産する代表的なセステルペノイドであり、主に *Bipolaris oryzae*, *Aspergillus ustus* などの植物感染性糸状菌から単離されている。現在までに ophiobolin 類縁化合物は異性体も含めれば 20 種類以上が報告されており、多様な生物活性を示すことが知られている²⁰(Fig. 2-20)。例えば ophiobolin A は抗腫瘍活性を示す他、糸状菌や *Bacillus* 属菌、マラリア原虫など幅広い生物種に対して毒性を示す。ophiobolin B はマウスに対する毒性(LD₅₀ 4.4 mg/kg)も確かめられており、ophiobolin C や ophiobolin K などは殺線虫活性を示すことが知られている。これらの化学構造および生物活性のバリエーションは主に酸化度の違いによって生じている。

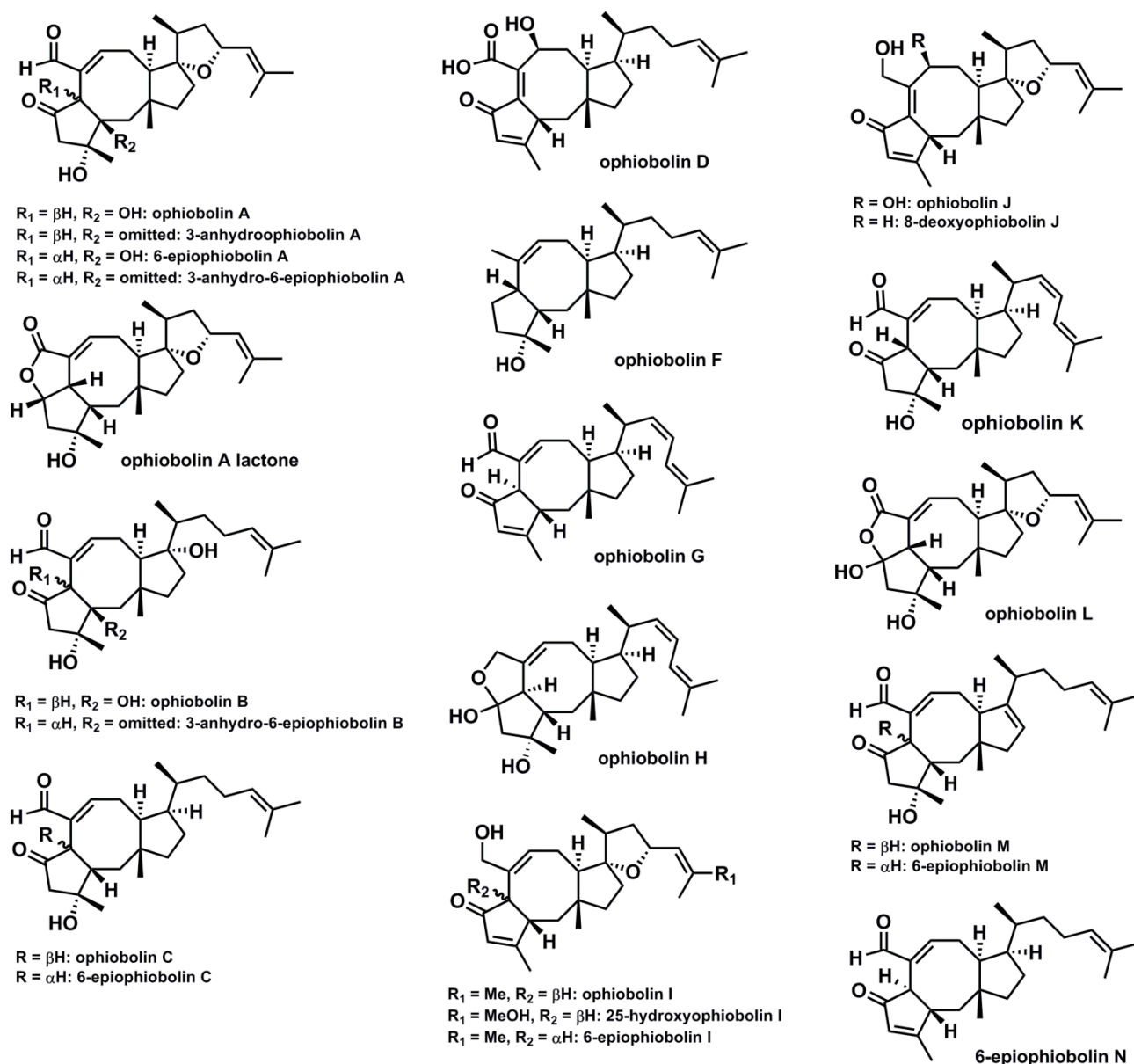


Fig. 2-20 ophiobolin 類縁化合物の化学構造

これらの生合成に着目すると、最も酸化度の低い ophiobolin F が一連の類縁化合物の共通前駆体であると考えられる。例えば、抗腫瘍活性を示す ophiobolin A は、ophiobolin F が計 6 段階の酸化修飾を受けることで ophiobolin C, B を経て生合成されると推定される (Fig. 2-21)。 *Aspergillus clavatus* のゲノム上においてテルペン環化酵素遺伝子 *AcOS (obIA_{Ac})*²¹ の周辺遺伝子を探索したところ、2 種の酸化酵素遺伝子 (P450: *oblB_{Ac}*, フラビン依存型酸化酵素: *oblC_{Ac}*) およびトランスポーター (*oblD_{Ac}*) が存在していることがわかった (Fig. 2-22, *oblAc* クラスター)。これらの酸化酵素は、類縁体の中で ophiobolin F の次に酸化度の低い ophiobolin C の生合成に関与している可能性があると考えられた。そこで本章では、これら酸化酵素遺伝子を麹菌内で *obIA_{Ac}* と共発現させることで機能解析を行い、ophiobolin 類縁化合物の生合成経路解明を試みた。

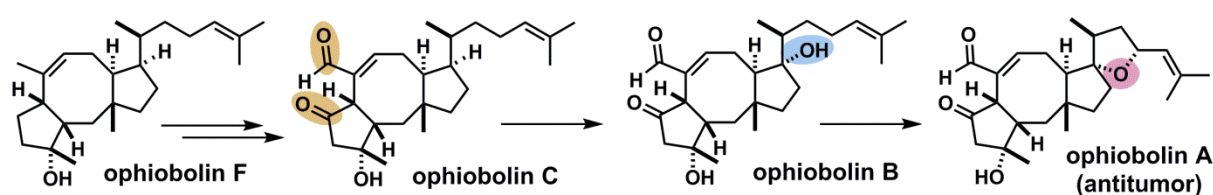


Fig. 2-21 ophiobolin 類縁化合物の予想生合成経路

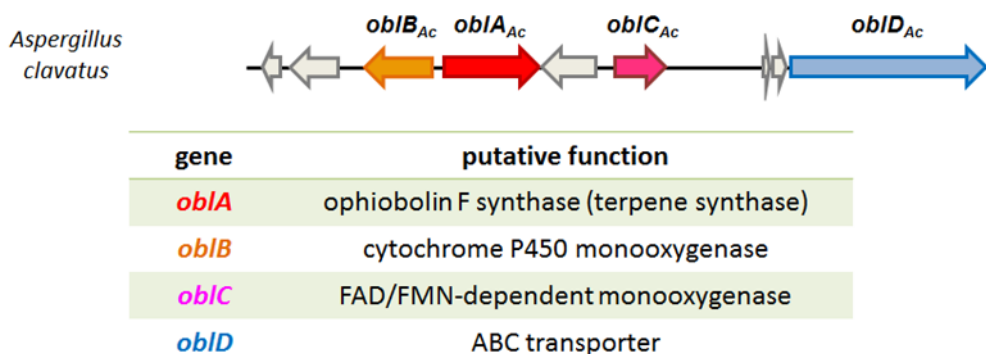


Fig. 2-22 *A. clavatus* 由来の ophiobolin 生合成遺伝子クラスター (*oblAc* クラスター)

2-3-2. *Aspergillus clavatus* 由来修飾酵素遺伝子の機能解析

まず、**ophiobolin F** から初発の酸化修飾に関わるのは sp^3 炭素に対する酸化修飾が可能な P450 であると考えられたため、*oblB_{Ac}* について機能解析を行った。*A. clavatus* のゲノム DNA から *oblB_{Ac}* をクローニングし、pUSA2 と連結することで発現用プラスミドを構築した。これを麹菌 **ophiobolin F** 生産株 AO-*oblA_{Ac}* に対して導入することで、共発現株 AO-*oblA_{Ac}B_{Ac}* を構築した。この株を固体培地で培養した後、代謝産物の抽出および解析を行った。

粗抽出物から TLC による **ophiobolin F** の酸化生成物の検出を行った。*A. oryzae* NSAR1 野生株(AO-WT)の代謝産物と比較したところ、AO-*oblA_{Ac}B_{Ac}* からは **ophiobolin F** の他に新たなスポットが 4 つ確認された。これらはいずれも **ophiobolin F** よりも高極性側に見られ、バニリンリン酸塩によって **ophiobolin F** とよく似た紫色の発色を示した(Fig. 2-23)。この特徴からこれらは *oblB_{Ac}* による **ophiobolin F** の酸化生成物であることが期待されたため、単離精製を試みた。粗抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC によって精製し、目的の化合物 **1**, **2**, **3**, **4** をそれぞれ米培地 1 kg あたり 100 mg, 1 mg, 2 mg, 40 mg の収量で得た。

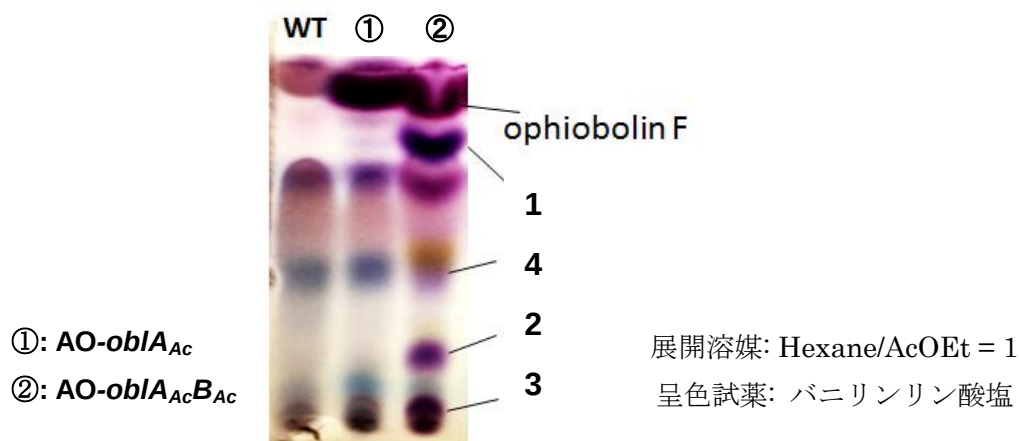


Fig. 2-23 TLC による酸化生成物の検出

これら 4 種の化合物について構造決定を試みた。**1**~**4** の LC-MS (ESI+) 分析の結果、 m/z 355, 391, 389, 357 の分子イオンピークがそれぞれ観測され(Fig. 2-24)、HR-MS 分析によりそれぞれの分子式を **1**: $C_{25}H_{40}O_2$, **2**: $C_{25}H_{42}O_3$, **3**: $C_{25}H_{42}O_4$, **4**: $C_{25}H_{42}O_2$ と決定した。続いて、NMR によってさらに詳細な構造解析を行った(Table 2-3, Fig. 2-25)。

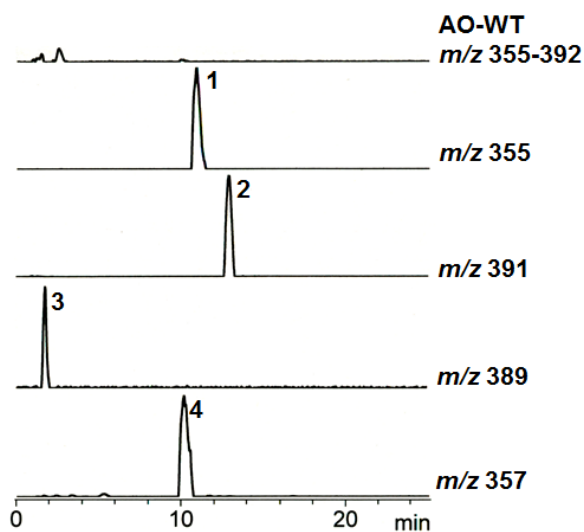


Fig. 2-24 AO-*oblA*_{Ac}*B*_{Ac} から単離された ophiobolin 関連化合物 **1**, **2**, **3**, **4** の LC-MS 解析

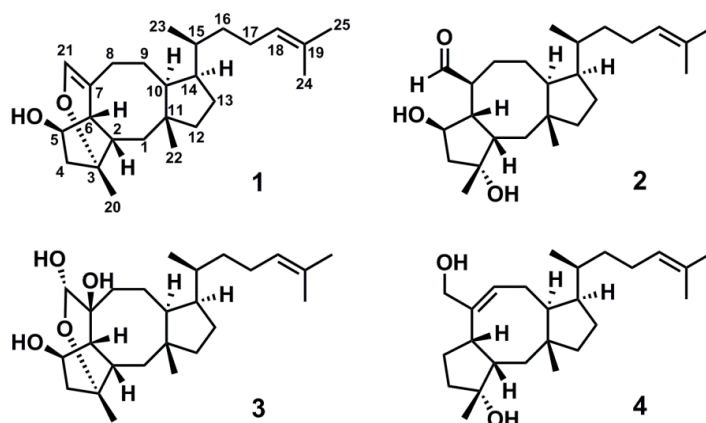
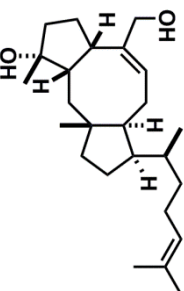
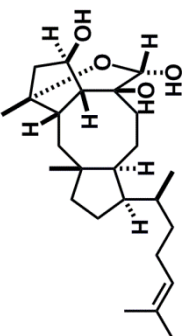
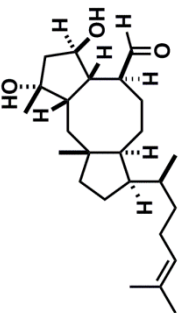
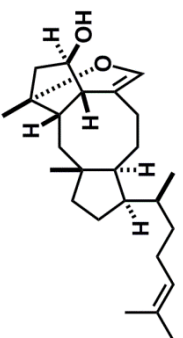
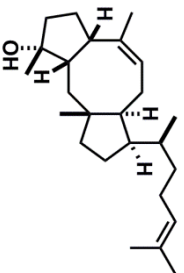


Fig. 2-25 ophiobolin F の酸化生成物 **1**, **2**, **3**, **4** の化学構造

Table 2-3. NMR spectral data of oxidation products of ophiobolin F

	ophiobolin F (in C ₆ D ₆)		1 (in CDCl ₃)		2 (in CDCl ₃)		3 (in CDCl ₃)		4 (in CDCl ₃)	
	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)
1	25.70	1.94 (m)	38.20	1.17 (m)	38.45	1.10 (m)	35.21	1.49 (m)	36.83	1.29 (m)
2	54.19	2.00 (m)		1.63 (m)		1.72 (d, 14.6)		1.76 (m)		1.57 (m)
3	80.20	1.62 (m)		2.07 (m)		2.12 (m)		2.05 (m)		1.90 (m)
4	41.90	1.68 (m)		1.61 (m)		1.58 (m)		1.59 (m)		1.93 (m)
5	23.83	1.96 (m)		2.49 (dd, 14.9, 7.2)		1.97 (dd, 13.0, 7.3)		2.37 (dd, 14.9, 7.3)		
		1.43 (m)		4.21 (dd, 7.2, 1.9)		4.10 (q, 6.9)		4.65 (m)		25.47
		1.54 (m)								1.61 (m)
6	42.52	3.15 (t, 8.3)		2.33 (d, 3.9)		2.10 (m)		2.46 (d, 4.0)		40.46
7	136.62					2.66 (dd, 8.7)				138.36
8	129.15	5.64 (t, 8.3)		1.63 (m)		1.48 (m)		1.69 (m)		136.08
				2.22 (m)		1.66 (m)		1.95 (m)		
9	23.70	2.13 (m)		1.54 (m)		1.19 (m)		1.54 (m)		23.35
				1.70 (m)				1.83 (m)		1.43 (m)
10	55.85	1.68 (m)		1.46 (m)		1.63		1.61 (m)		54.76
11	43.92					1.29 (m)		1.34 (m)		43.84
12	43.66	1.34 (m)		1.34 (m)		1.35 (m)		2.14 (m)		42.97
		1.44 (m)				1.43 (m)		1.52 (m)		23.20
13	36.81	1.32 (m)		1.31 (m)		1.43 (m)		1.62 (m)		
		1.44 (m)						2.18 (m)		45.39
14	45.97	2.30 (m)		2.28 (m)		2.33 (m)		2.18 (m)		33.02
15	33.37	1.68 (m)		1.59 (m)		1.48 (m)		1.60 (m)		37.27
16	37.77	1.27 (m)		1.12 (m)		1.08 (m)		1.13 (m)		
		1.40 (m)		1.20 (m)		1.18 (m)		1.34 (m)		25.73
17	26.73	1.95 (m)		1.95 (m)		1.91 (m)		1.91 (m)		1.81 (m)
						1.98 (m)				1.99 (m)
18	125.56	5.28 (t, 6.9)		5.10 (t, 7.0)		5.03 (t, 6.0)		5.10 (t, 6.7)		124.91
19	130.93					131.20		124.97		131.14
20	29.00	1.05 (Me, s)		1.26 (Me, s)		1.30 (Me, s)		1.23 (Me, s)		27.92
21	21.95	2.03 (Me, s)		5.93 (s)		9.66 (s)		4.59 (s)		66.66
										18.21
22	19.06	0.85 (Me, s)		0.91 (Me, s)		0.72 (Me, s)		0.94 (Me, s)		16.87
23	17.18	0.83 (Me, d, 6.9)		0.75 (Me, d, 6.7)		0.69 (Me, d, 6.8)		0.80 (Me, d, 6.8)		17.66
24	17.76	1.62 (Me, s)		1.60 (Me, s)		1.53 (Me, s)		1.60 (Me, s)		26.20
25	26.10	1.71 (Me, s)		1.68 (Me, s)		1.65 (Me, s)		1.69 (Me, s)		



< 酸化生成物 **1** の構造解析 >

$^1\text{H-NMR}$ において、ophiobolin 骨格に特徴的なメチル基のシグナル($\text{H}20$: 1.26 ppm, $\text{H}22$: 0.91 ppm, $\text{H}23$: 0.75 ppm, $\text{H}24$: 1.60 ppm, $\text{H}25$: 1.68 ppm)が見られることから、この化合物は ophiobolin F から変換されたものと考えられる。ophiobolin F が不飽和度 5 であるのに対し **1** は不飽和度 6 であることから、二重結合あるいは環構造が新たに 1 つ形成されていると考えられる。**1** の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルを ophiobolin F と比較すると、 $\text{H}21$, $\text{H}8$ のシグナルが消失し、新たに δ_{H} 4.21, δ_{H} 5.93 のシグナルが観測された。 δ_{H} 4.21 はオキシメチンプロトンに特徴的なシグナルであり、これが $\text{H}4$ と COSY 相関を与えたことから、5 位に水酸基が導入されていることがわかった。一方、後者はビニルプロトンであり $\text{C}3$ との HMBC 相関が観測されたことから、7-8 位の二重結合が 7-21 位へ異性化しエノールエーテル構造を介して新たな環を形成していることがわかった。また、 $^{13}\text{C-NMR}$ の結果より、エノールエーテル構造に特徴的なシグナル (δ_{C} 111.38, 137.99)が見られたことから (Fig. 2-26)²²、エノールエーテル構造の存在が支持された。NOESY 解析により、 $\text{H}5$ - $\text{H}8(\beta)$ 間の相関から 5 位の立体化学を決定し、その他の立体化学に関しては ophiobolin F と同様であると決定された (Fig. 2-27)。

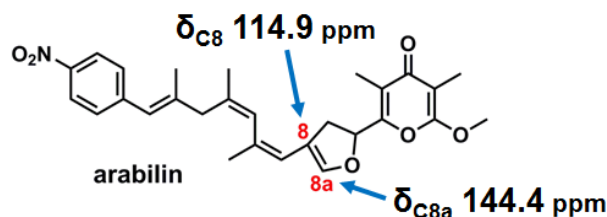


Fig. 2-26 エノールエーテル構造に特徴的な化学シフト値の例

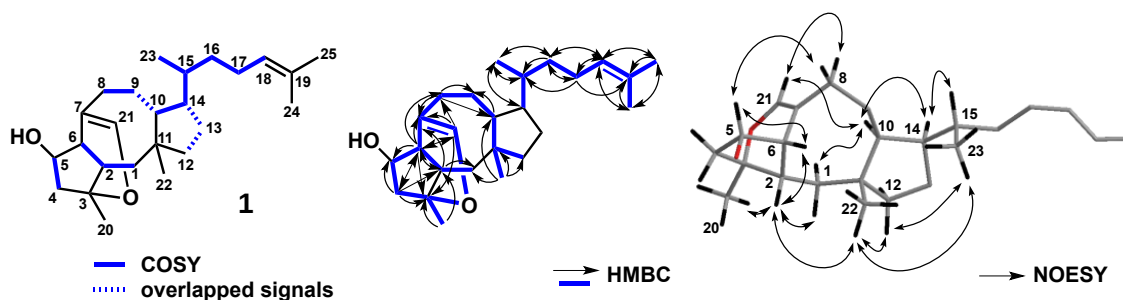


Fig. 2-27 **1** の 2D-NMR 相関

< 酸化生成物 **2** の構造解析 >

$^{13}\text{C-NMR}$ においてオレフィン炭素のシグナルが 2 つ観測され、不飽和度が 5 であることから ophiobolin F の二重結合が 1 つ還元されていると推定された。 $^1\text{H-NMR}$ において ophiobolin F における 8H のビニルプロトンシグナルが消失していることから、7-8 位の二重結合が還元されていることがわかった。また、 $\text{H}21$ のシグナルが消失し、アルデヒドのプロトンシグナル(δ_{H} 9.66)が新たに見られることから 21 位のメチル基がアルデヒドに変換されていることがわかった。さらに、オキシメチンプロトンのシグナル(δ_{H} 4.10)と $\text{H}4$ との間で COSY 相関が観測されたことから、**1**

と同様に 5 位に水酸基が導入されていることがわかった。NOESY 解析により、H7-H10 間の相関から 7 位の立体化学はアルデヒドがβ配置であると決定し、H5-H4(α)間の相関から 5 位の立体化学は水酸基がβ配置であると決定した(Fig. 2-28)。

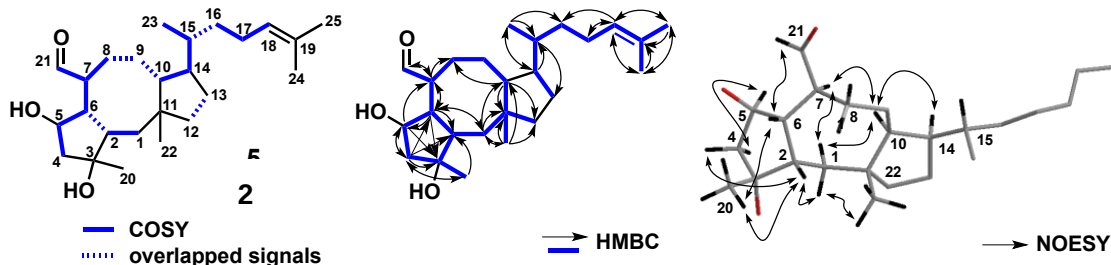


Fig. 2-28 2 の 2D-NMR 相関

< 酸化生成物 3 の構造解析 >

^{13}C -NMR においてオレフィン炭素のシグナルが 2 つ観測され、不飽和度が 5 であることから、ophiobolin F の二重結合が 1 つ還元され新たに 1 つ環構造が形成されていると推定された。また、 ^1H -NMR においてオキシメチンプロトンのシグナル(δ_{H} 4.59, 4.65)が H4、H6 と COSY 相関を与えていることから **1** と同様に 5 位が水酸化されていることがわかった。これらの特徴と分子式から、**3** は **1** がさらに酸化修飾を受けた化合物であることが予想された。**1** における 7-21 位のエノールエーテルの炭素シグナルが消失し、新たに一重線のオキシメチンプロトンシグナル(δ_{H} 4.59)および三級炭素シグナル(δ_{C} 97.39)、四級炭素シグナル(δ_{C} 72.61)が現れていることから、**3** は **1** の 7 位, 21 位が 1,2-ジオールへと酸化された化合物であると推定された(Fig. 2-29)。これを確かめるため、1,2-ジオールの酸化的開裂反応を試みた。**3** に対して NaIO_4 を作用させたところ、期待通り 1,2-ジオールが開裂してケトンおよびホルミルエステルへと変換された化合物 **5** が得られた(Fig. 2-30)。21 位と 4 位の水素の NOESY 相関から 21 位の立体化学を決定し、その他の立体化学は **1** と同様であると決定された。

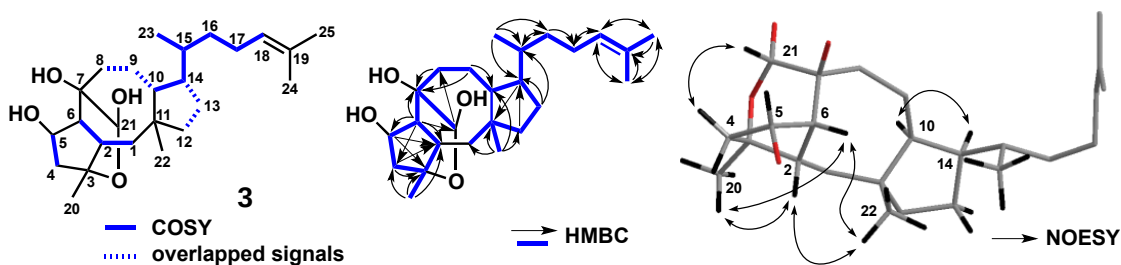


Fig. 2-29 3 の 2D-NMR 相関

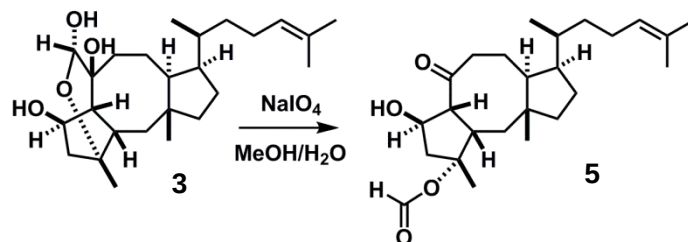


Fig. 2-30 3 の酸化的開裂反応

< 酸化生成物 **4** の構造解析 >

$^1\text{H-NMR}$ において、**ophiobolin F** における H21 のシグナルが消失し、新たにオキシメチンプロトンシグナル(δ_{H} 3.90, 4.30)が現れている。分子量と NMR の両方において、**ophiobolin F** に対して水酸基が一つ導入されたことが示されたことから、**4** は **ophiobolin F** の 21 位が水酸化された構造であると決定された。NOESY 相関から、立体化学はすべて **ophiobolin F** と同様であることが確かめられた(Fig. 2-31)。

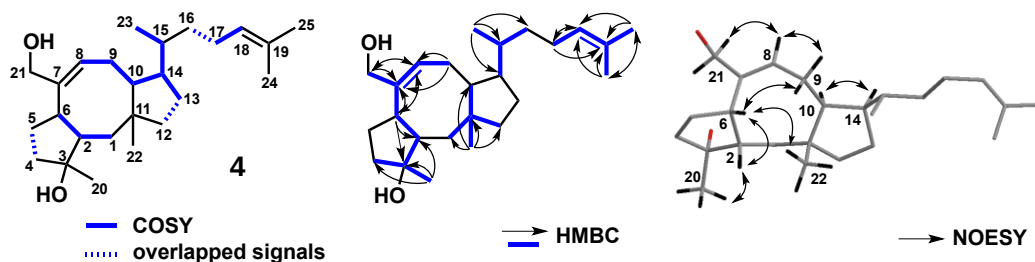


Fig. 2-31 **4** の 2D-NMR 相関

以上の結果から、 $\text{AO} \cdot \text{obl}_{\text{Ac}} \text{B}_{\text{Ac}}$ から得られた 4 種の化合物は **ophiobolin F** が 1~4 段階の酸化修飾を受けることで生成した新規化合物であった。また、既知天然物と同様の位置(5 位, 21 位)が酸化されているものの、当初期待していた酸化生成物である **ophiobolin C** の生産は確認されなかった。このことから、**ophiobolin** 非生産菌である *A. clavatus* 由来の酸化酵素遺伝子は、本来の機能が若干改変されていると考えられた。そこで次項では、**ophiobolin** 生産菌由来の遺伝子クラスターについて機能解析することで既知天然物が得られるかどうか検証した。

2-3-3. *Bipolaris maydis*, *Emericella varicolor* 由来修飾酵素遺伝子の機能解析

ophiobolin A, K の生産菌として知られる *Bipolaris maydis*²³ および *Emericella varicolor*²⁴ (岩手医大 藤井勲教授よりゲノム情報を頂いた)ゲノム上を探索したところ、 obl_{Ac} クラスターと類似した遺伝子クラスターが見出された(Fig. 2-32)。以後、これらの菌株から得られた遺伝子クラスターをそれぞれ obl_{Bm} クラスター、 obl_{Ev} クラスターとし、各クラスター中の遺伝子を oblX_{Bm} , oblX_{Ev} と表記する。 obl_{Ac} クラスターも含めた 3 つのクラスターを比較すると、*oblA*, *oblB*, *oblD* の 3 遺伝子がすべてに共通しており、いずれも互いに 50%以上という高い相同性を示していたことから、同様の機能を持つ遺伝子であると推定される。さらに、 obl_{Ac} , obl_{Bm} クラスターでは *oblC* も共通しているのに対し、 obl_{Ev} クラスターには *oblC* の代わりにもうひとつの P450 である *oblE* が存在していた。

以上のことから、**ophiobolin** 類縁化合物の生合成経路について次のように推定した(Fig. 2-33)。まず **ophiobolin A, K** の構造を比較すると、5 位のケトンと 21 位のアルデヒドが共通していることから、**ophiobolin A, K** は **ophiobolin F** から **ophiobolin C** 経て生合成されと考えられる。この酸化修飾に関わるのは、すべてのクラスターに共通して存在する P450 である *oblB* が最も有力な候補である。次に側鎖の官能基に着目すると、**ophiobolin A** はエーテル環、**ophiobolin K** は共役ジエンをもつことから、酸化酵素の違いによってこれらの官能基が作り分けられていると考え

られる。ophiobolin A の生合成では、*obl*_{Ac}, *obl*_{Bm} クラスターにある *oblB* あるいはその他の P450 によって ophiobolin C の 14 位が水酸化されることで ophiobolin B が生合成され、最後に *oblC* によってエーテル環が形成されると予想される。一方 ophiobolin K の生合成では、*obl*_{Ev} クラスターにある *oblE* によって ophiobolin C の側鎖に二重結合が導入されることで ophiobolin K が生合成されると考えられる。*oblE* の相同性解析の結果もこの予想を支持しており、*oblE*_{Ev} は ergosterol の生合成においてテルペン側鎖に対する二重結合の導入に関わる P450 である *ERG5*²⁵ と高い相同性(93%)を示した。この推定生合成経路をもとに、まず *oblB*_{Bm}, *oblE*_{Ev} の機能解析によって既知類縁体 ophiobolin C の取得を試みた。

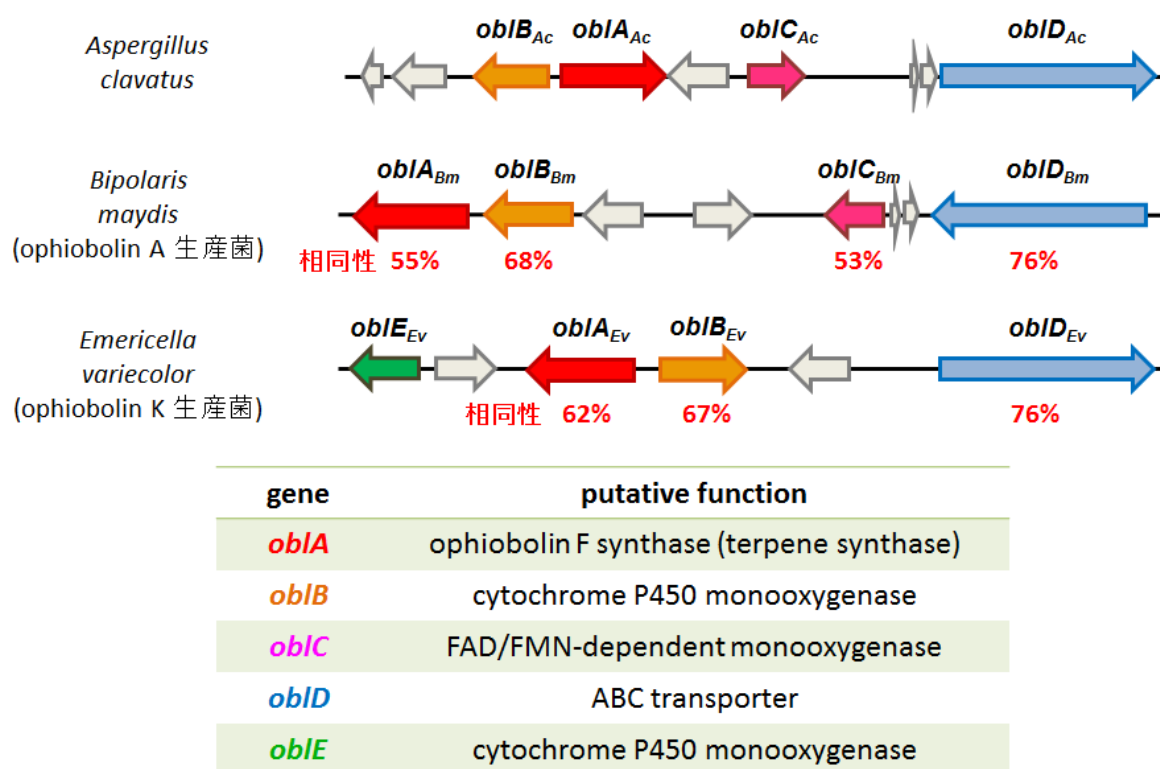


Fig. 2-32 3種の推定 ophiobolin 生合成遺伝子クラスター

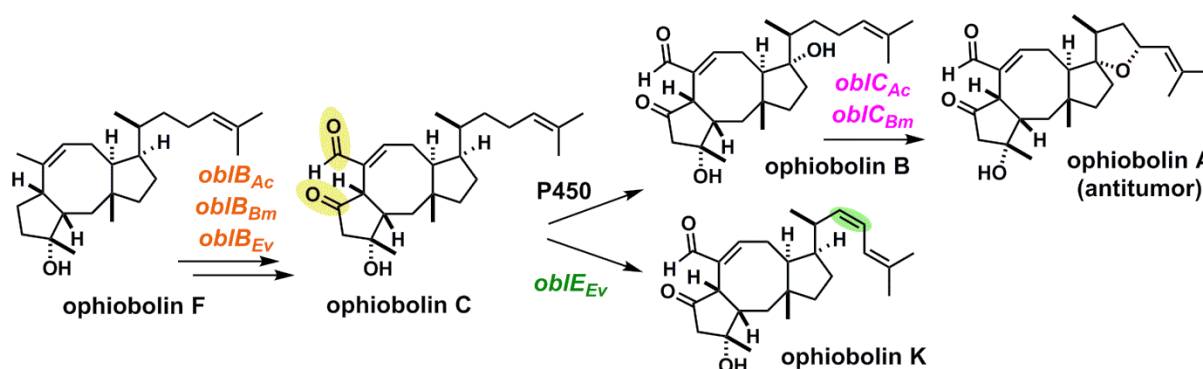
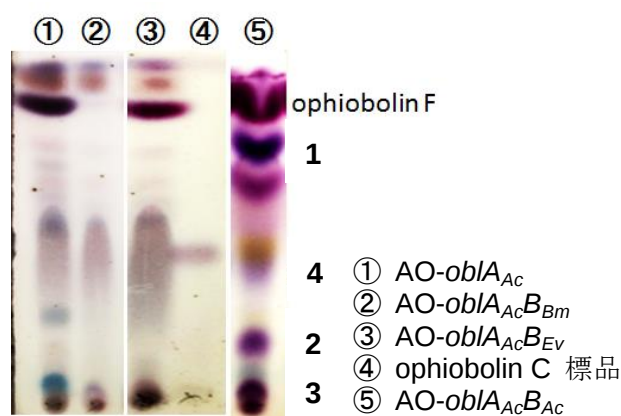


Fig. 2-33 ophiobolin 類縁化合物の予想生合成経路

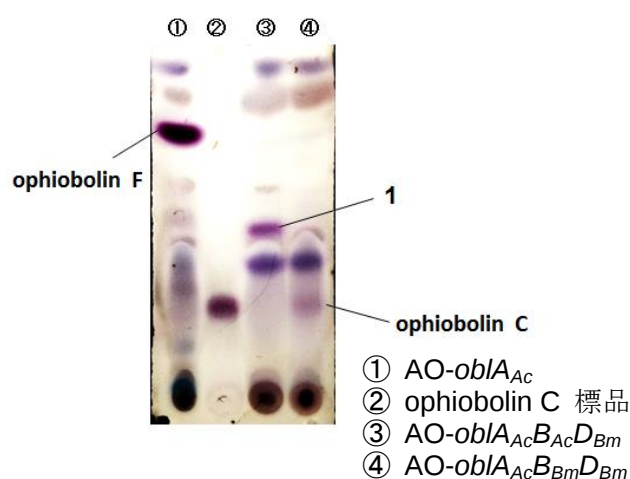
*oblB_{Ac}*の機能解析と同様、*oblB_{Bm}*-pUSA2 および *oblB_{Ev}*-pUSA2 を調製し、*oblA_{Ac}*との共発現株 AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}*, AO-*oblA_{Ac}B_{Ev}*を構築した。これらをそれぞれ米培地で培養し、代謝産物を解析したところ、TLC および LC-MS 分析のいずれにおいても新たな生成物は確認されなかった(Fig. 2-34)。しかしながら、TLC において基質である *ophiobolin F* の消費は確認されたことから、酸化生成物が生じた後にそれが分解されていることが示唆された。特に、予想生成物である *ophiobolin C* が宿主に対して毒性を示すことで分解されている可能性が考えられたため、Ac, Bm, Ev クラスターすべてに共通して保存されているトランスポーター(*oblD*)に着目した。これを *oblA*, *B* と共発現させることにより、生成物が分解される前に菌体外へと排出させることができるのではないかと考えた。*B. maydis* のゲノム DNA から *oblD_{Bm}*をクローニングし、*oblB_{Bm}D_{Bm}*-pUSA2 および *oblB_{Ev}D_{Bm}*-pUSA2 を調製した。これを用いて麹菌 3 重形質転換体 AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}D_{Bm}*, AO-*oblA_{Ac}B_{Ev}D_{Bm}*を構築し、それぞれの米培養によって得られた代謝産物を解析した。その結果、TLC 上で新たな生成物のスポットが観測され、LC-MS 分析によって新たに 3 つの生成物のピークが観測された(Fig. 2-35, 2-36)。この内 1 つは *ophiobolin C* の標品と分子量(MW 386)・溶出時間が一致しており、その他 2 つは *ophiobolin C* と同じ分子量およびその脱水体に相当する分子量(MW 368)を与えたことから、いずれも *ophiobolin F* の酸化生成物であると予想された。これらをシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび逆相 HPLC によって精製し、NMR による構造決定を行った。その結果、これら 3 つの化合物の ¹H-NMR スペクトルはそれぞれ既知天然物である *ophiobolin C*, 6-*epiophiobolin C*, 6-*epiophiobolin N* の文献値^{26,27}と一致した(Fig. 2-37)(収量はそれぞれ米培地 1kg あたり 1 mg, 4 mg, 1mg)。このことから、*ophiobolin* 生産菌由来の *oblB_{Bm}*, *oblB_{Ev}*は、*oblB_{Ac}*とは異なり当初の予想生成物である *ophiobolin C* を生産する機能があることが示された。また、その生産にはトランスポーターである *oblD_{Bm}*が必要であることがわかった。



展開溶媒: Hexane/AcOEt = 1

呈色試薬: バニリンリン酸塩

Fig. 2-34 AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}/Ev*代謝産物の TLC



展開溶媒: Hexane/AcOEt = 1

呈色試薬: バニリンリン酸塩

Fig. 2-35 AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}D_{Bm}*代謝産物の TLC 解析

m/z 369-388

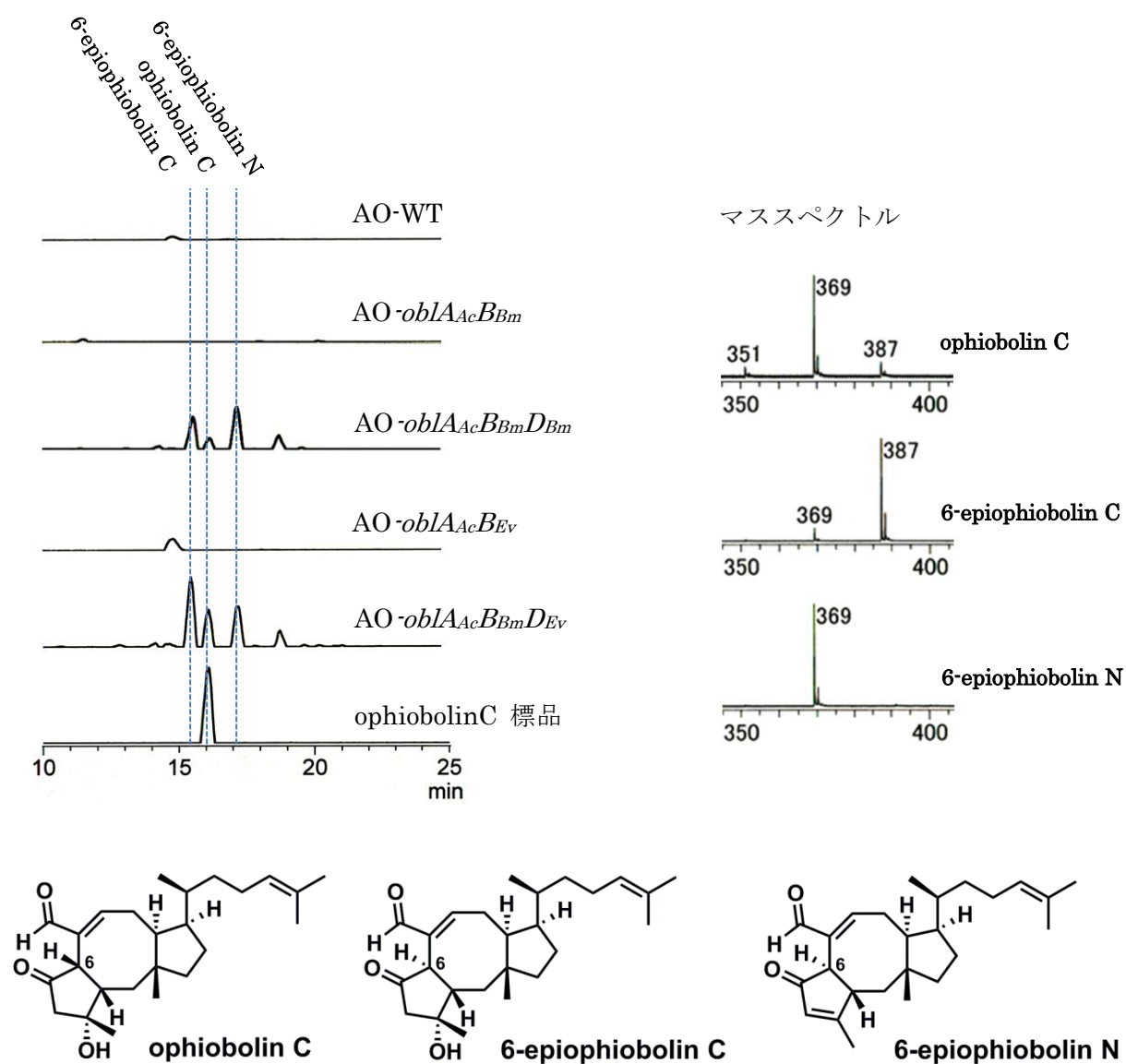
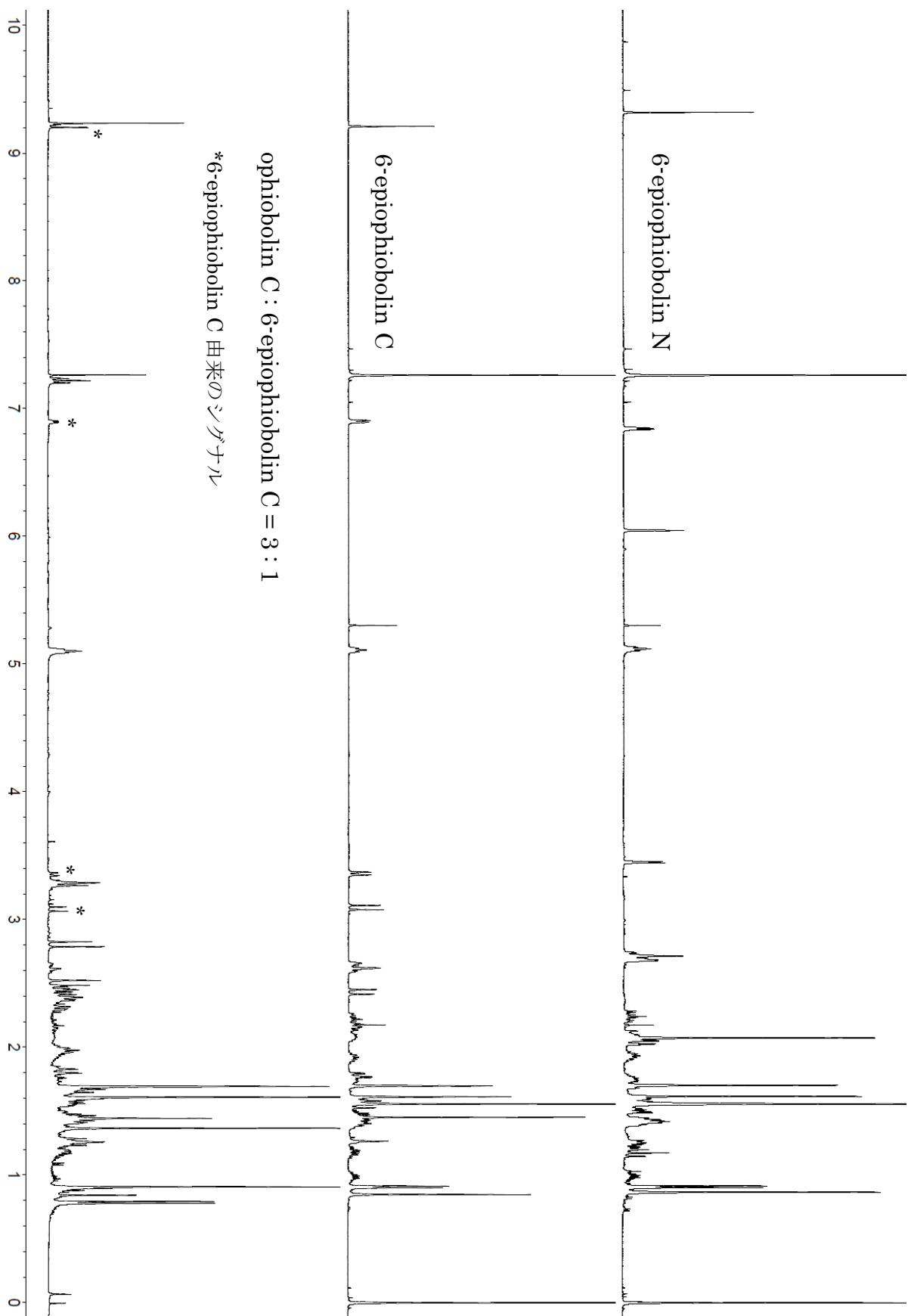


Fig.2-36 *AO-oblA_{AcB}M/EvD_BM* 代謝産物の LC-MS 分析

Fig. 2-37 ophiobolin C, 6-epiophiobolin C, 6-epiophiobolin N の $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)



ここで得られた 6-epiophiobolin C, 6-epiophiobolin N は、ophiobolin C から 6 位の異性化および脱水反応によって生じたものと考えられる。そこで、ophiobolin C を pH 5 の酸性バッファー中でインキュベートしたところ、継時的に ophiobolin C が減少し 6-epiophiobolin C, 6-epiophiobolin N が生成する様子が LC-MS によって観測された(Fig. 2-38)。これにより、ophiobolin C は酸性条件下において非酵素的にエピ化・脱水が進行することがわかった。

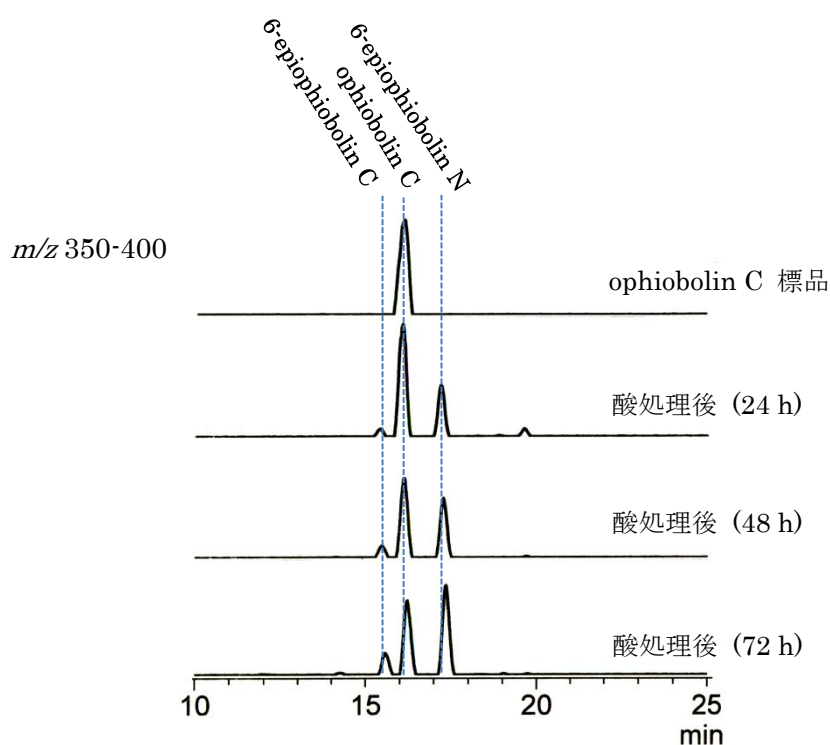


Fig. 2-38 ophiobolin C 酸処理生成物の LC-MS 分析

oblB_{Bm}, *oblB_{Ev}* の機能解析により ophiobolin C の生産に成功したため、続いて Ac, Bm クラスター中のもうひとつの酸化酵素遺伝子(FMO)である *oblC* の機能解析により、さらに酸化が進行した天然物 ophiobolin B や ophiobolin A の生産を試みた。発現用プラスミド *oblC_{Ac}*-pAdeA2, *oblC_{Bm}*-pAdeA2 を調製し、これらを麹菌 ophiobolin C 生産株に対して導入することで AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}C_{Ac}D_{Bm}*, AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}C_{Bm}D_{Bm}* を構築した。これらの形質転換株を米培地で培養し代謝産物の解析を行ったところ、LC-MS 分析によって AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}C_{Ac}D_{Bm}* から新たな酸化生成物 **6** (MW 400, C₂₅H₃₇O₄) が確認された(Fig. 2-39)。これを単離し(収量: 0.8 mg/米 1 kg)、NMR による構造解析を行った(Fig. 2-40, Table. 2-4)。

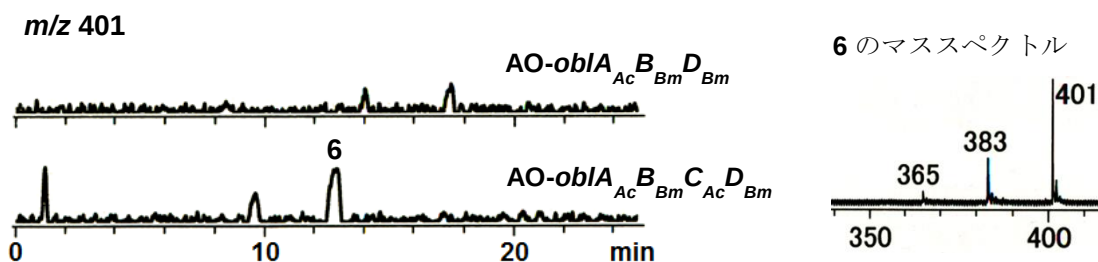


Fig. 2-39 AO-obIAAcBBmCBBmD代謝産物の LC-MS 分析

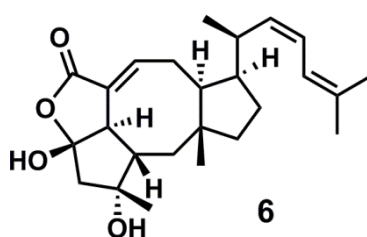


Fig. 2-40 6 の分子構造

6 の NMR データを ophiobolin C のものと比較すると、 ^1H -NMR において新たに δ_{H} 6.06, 6.00 のシグナルが観測されており、これは既知天然物 6-epiophiobolin K²⁸の側鎖に見られる共役ジエンのプロトンシグナルとよく一致している (Table 2-4)。また ^{13}C -NMR において、エステル (δ_{C} 174.0) とアセタール (δ_{H} 114.7) の炭素に相当するシグナルが観測されており、これは既知天然物 ophiobolin L²⁹に見られる部分構造とよく一致している (Table 2-4)。COSY, HMBC 解析から平面構造を決定し、6 位と 10 位の NOESY 相関から 6 位の水素は α 面に位置していることがわかった (Fig. 2-41)。以上の結果から、obI_{CAc}の機能解析に成功し、ophiobolin C がさらに酸化修飾を受けることで生成したと思われる新規化合物 6 を取得した。ophiobolin 生産菌由来の obI_{CBm}, obI_{CEv}については、同様に機能解析を試みたものの 6 および新たな酸化生成物は確認されなかった。また、この実験において、AO-obIAAcBBmCBBmD, AO-obIAAcBBmCBBmD から当初の予想生成物である ophiobolin B, ophiobolin A の生産は確認されなかった。

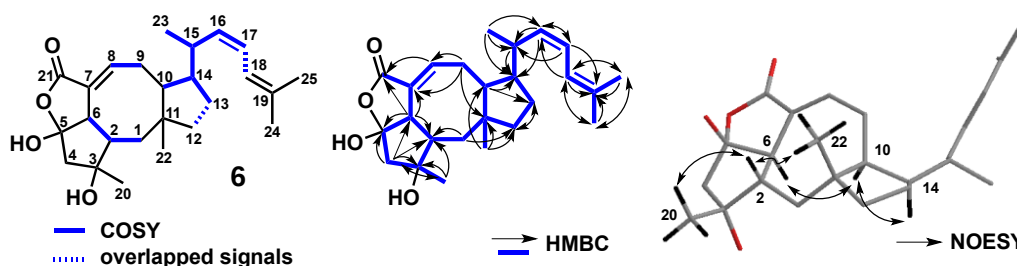
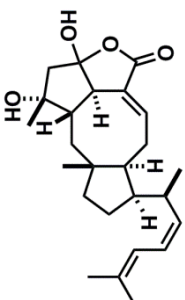
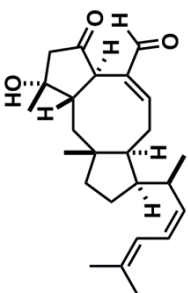
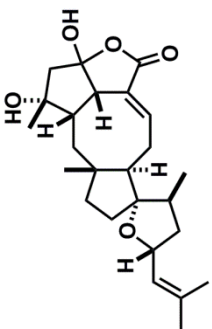


Fig. 2-41 6 の 2D-NMR 相関

Table 2-4. NMR spectral data of **6** (CDCl₃)

6

ophiobolin L			6-epiophiobolin K		8	
	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)
1	35.1		41.29	1.55 (m)	30.70	1.17 (m)
2	50.9		49.60	1.75 (m)	55.65	1.65 (m)
3	79.9		76.72	2.16 (dd, 10.5, 4.2)	83.17	1.70 (m)
4	51.3		54.94	2.42 (dd, 16.8, 1.5)	56.52	2.15 (m)
5	113.3		217.27	3.09 (d, 16.8)	114.69	2.28 (m)
6	50.5	3.24 (brd, 9.3)	48.82	3.30 (brd, 10.8)	55.61	3.30 (d, 9.7)
7	131.2		141.31		128.85	
8	141.1	6.93 (m)	160.78	6.87 (dd, 6.9, 2.7)	147.91	6.92 (brs)
9	23.4		30.85	2.84 (ddd, 20, 4, 2)	32.30	2.00 (m)
10	60.9		43.74	2.22 (ddd, 20, 14, 2)	45.03	2.54 (m)
11	42.4		44.70	2.54 (ddd, 14.7, 10, 4)	46.73	2.32 (m)
12	41.3		27.71	1.65 (m)	47.39	1.47 (m)
13	42.8		45.25	1.20 (m)	44.32	1.49 (m)
14	95.2		54.06	1.45 (m)	54.69	1.67 (m)
15	36.6		32.58	1.87 (m)	35.75	1.83 (m)
16	30.2		135.59	2.53 (m)	138.29	2.47 (m)
17	70.9	4.40 (ddd, 9.0, 7.0, 7.0)	129.97	5.12 (t, 9.9)	126.74	5.11 (t, 9.6)
18	126.0		119.97	6.07 (dt, 9.8, 0.9)	122.94	6.06 (t, 11.2)
19	135.3	5.12 (brd, 8.9)	136.42	6.00 (md, 9.8, 1.2)	138.98	6.00 (d, 11.7)
20	25.7		25.86	1.45 (Me, s)	27.54	1.27 (Me, s)
21	171.0	1.21 (Me, s)	194.30	9.17 (s)	173.95	
22	17.4	0.81 (Me, s)	23.32	0.85 (Me, s)	26.38	0.76 (Me, s)
23	17.8	1.03 (Me, d, 6.9)	21.31	0.98 (Me, d, 6.6)	24.12	0.96 (Me, d, 6.7)
24	18.2	1.65 (Me, s)	18.22	1.77 (Me, brs)	21.00	1.72 (Me, s)
25	25.8	1.70 (Me, s)	26.56	1.83 (Me, brs)	29.32	1.81 (Me, s)



2-3-4. OblB の推定反応機構

1) OblB_{Ac} の推定反応機構

今回得られた酸化生成物 **1~4** の構造から、これらはいずれも **ophiobolin C** と同様に 5 位や 21 位が酸化されており、**1, 2, 3** については 2 段階以上の酸化が進行していることがわかる。その酸化様式や収量から **1~4** の生合成機構について次のように考察した(Fig. 2-42)。

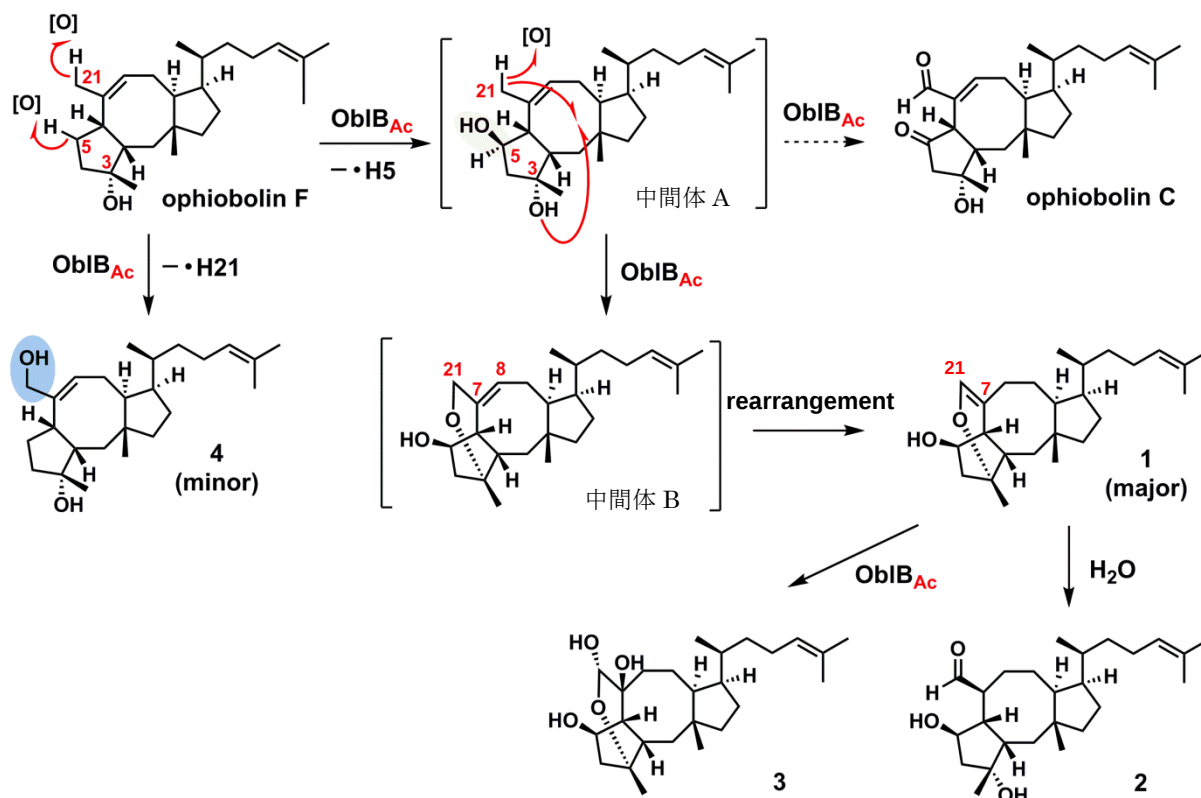


Fig. 2-42 OblB_{Ac} の推定反応機構

まず、**ophiobolin F** に対する 1 段階目の酸化は、5 位か 21 位のいずれかで進行する。21 位の酸化が初めに進行した場合、アリルアルコールを形成することで **4** を与える。一方、5 位の酸化が先に進行した場合、β面に水酸基が導入され中間体 A が生成する。続いて、21 位で酸化が進行する際に生成したラジカル種が 3 位の水酸基と反応することでエーテル環を形成する(中間体 B)。次いで 7-8 位の二重結合が 7-21 位へ異性化することでエノールエーテルを形成し、主生成物である **1** が生じる。**1** はさらに加水分解によって開環し、**2** へと変換される。また、**OblB_{Ac}** によって **1** の 7 位、21 位が 1,2-ジオールへと酸化されることで **3** が生成する。4 種の化合物の内、**1** の生産量が最も多かったことから、1 段階目の酸化が起こる際の位置選択性は 21 位よりも 5 位の方が優先されると考えられる。

この推定生合成経路に関して、当初の予想では **OblB_{Ac}** によって 21 位はアルデヒドに酸化されることで **ophiobolin C** へと導かれると考えられた。しかし実際には、興味深いことに 3-21 位間で既知類縁体には見られないエーテル環を形成している。**ophiobolin F** の X 線結晶構造解析を見直したところ、21 位の炭素と 3 位の水酸基の距離はおよそ 3.3 Å であり、十分に結合を形成し得

るほど空間的に近接していることがわかった(Fig. 2-43)。このことから、OblB_{Ac}は21位の水素ラジカルを引き抜いた後、21位へ水酸基を導入する代わりに、近傍にある3位の水酸基から水素ラジカルを引き抜いてしまうことでこの想定外の反応を起こしていると考えられる(Fig. 2-44, Path Ac)。

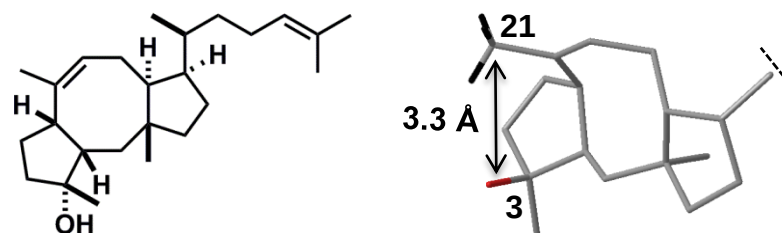
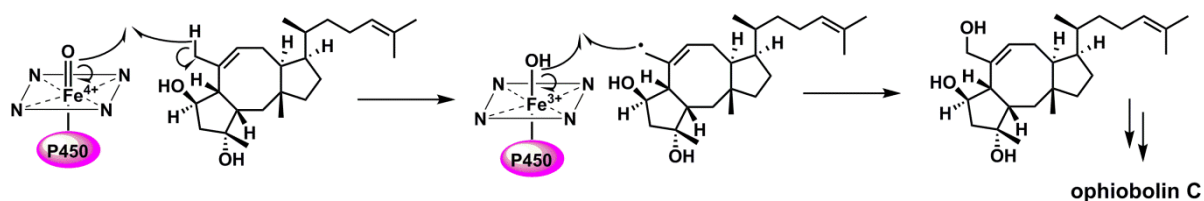


Fig. 2-43 ophiobolin F の X 線結晶構造解析

予想された反応 (Path Bm/Ev)



実際に起きた反応 (Path Ac)

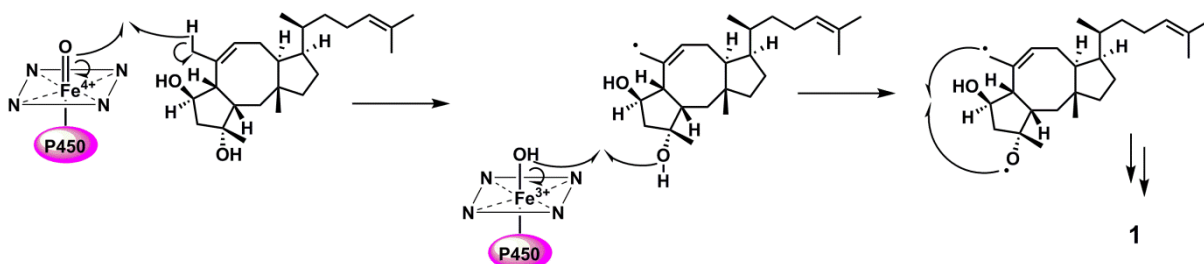


Fig. 2-44 OblB_{Ac}による **1** の生合成機構

1 が生成する過程で、エーテル環が形成された後に二重結合が異性化している点も非常に興味深い。そこで、二重結合が異性化する前後について最安定構造の分子力学計算(ChemBio3D Ultra)を行ったところ、二重結合の異性化後の方が異性化前に比べて約 5 kcal/mol 安定であることがわかった(Fig. 2-45)。このことから **1** のエノールエーテル構造は、酵素的に合成される可能性とともに、自発的な二重結合の異性化によって形成されている可能性もあると考えられる。

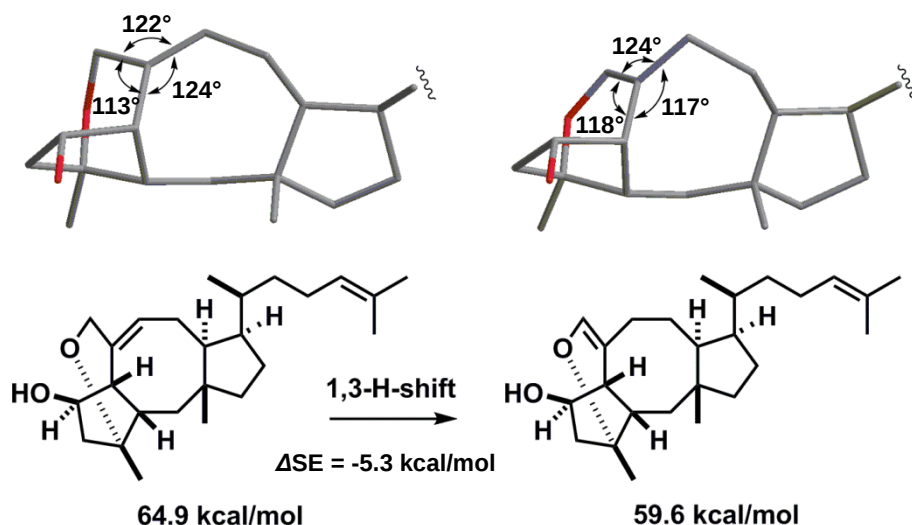


Fig. 2-45 二重結合の異性化による **1** の構造安定化

2) OblB_{Bm}, OblB_{Ev} の推定反応機構

OblB_{Bm}, OblB_{Ev} の機能解析によって *ophiobolin C* およびその異性体を得られたことから、これらの生合成機構を次のように推定した(Fig. 2-46)。*ophiobolin F* に対する 1~2 段階目の酸化修飾における位置選択性が OblB_{Ac} の場合と同様であると考えた場合、まず 5 位、21 位の順に水酸基が導入されてトリオール中間体 **7** を与える。さらにこのトリオールが段階的に酸化されることで *ophiobolin C* が生合成される。その後 6 位のエピマー化および 3 位の脱水によって 6-*epiophiobolin C*, 6-*epiophiobolin N* が順次生成する。これについては、酸性条件下で *ophiobolin C* の立体異性化、脱水が非酵素的に進行することを今回実験的に示した。米培地での培養条件下では pH が 4 程度になっていることから³⁰、培養中あるいは精製過程で同様の反応が進行したと考えられる。6 位の異性化、3 位の脱水は他の *ophiobolin* 類縁化合物においても確認されており(Fig. 2-20)、類似の機構で進行していると予想される。また、分子モデル計算においても 6 位が異性化した構造の方がエネルギー的に約 8 kcal/mol 安定であることが示され、この反応が容易に進行することが支持された(Fig. 2-47)。

OblB_{Bm/Ev} による *ophiobolin F* から *ophiobolin C* への変換には 5 位と 21 位に対して計 4 段階の酸化修飾が必要であるが、中間体 **7** から *ophiobolin C* への酸化における順序に関する実験的な知見は得られていない。しかしながら、*Bipolaris oryzae* から単離されている *ophiobolin J* および *ophiobolin A lactone* の分子構造から(Fig. 2-20)¹、この酸化反応には 2 通りの経路が推定される(Fig. 2-46)。すなわち、*ophiobolin J* は 21 位にアリルアルコールをもつことから、**7** の 5 位がケトンへ酸化されることで生じる予想中間体 **9** を経由して生合成されていると考えられる。一方、*ophiobolin A lactone* のラクトン環構造は、予想中間体 **8** における 5 位の水酸基が 21 位のアルデヒドへ求核攻撃した後、21 位がさらに酸化されることで形成されると推定される。このように、**7** の 5 位と 21 位に対する酸化順序の寛容性が多様な類縁体の作り分けに深く関係している可能性がある。実際、OblB_{Bm/Ev} と高い相同性を示した OblB_{Ac} が複数の酸化生成物を与えたことからこの可能性は支持される。このような P450 による多段階酸化修飾のより詳細な反応機構解析を

行うためには、酵母を宿主とした異種発現系による解析を試みるか、あるいはマイクロソーム画分を調製し *in vitro* 解析を行う必要がある。

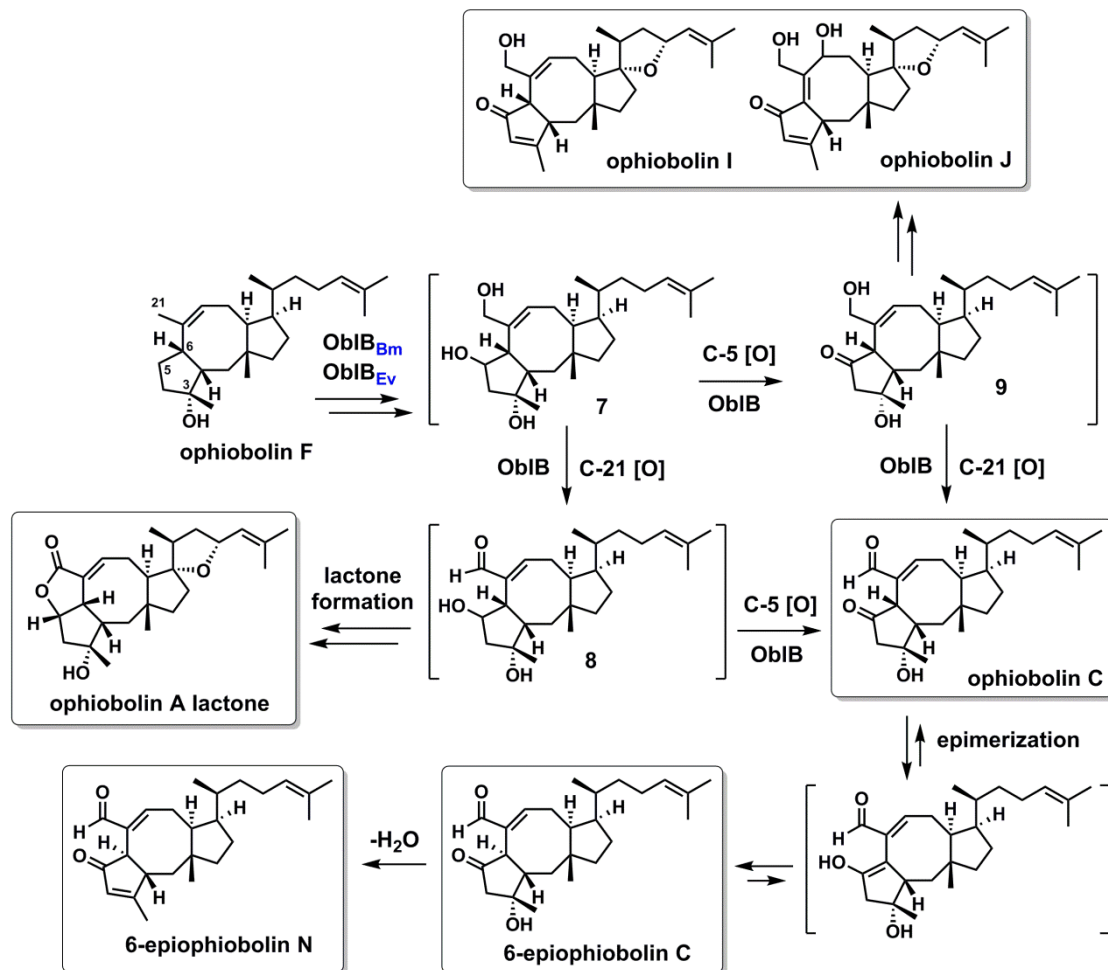


Fig. 2-46 OblB_{Bm}/Ev の推定反応機構

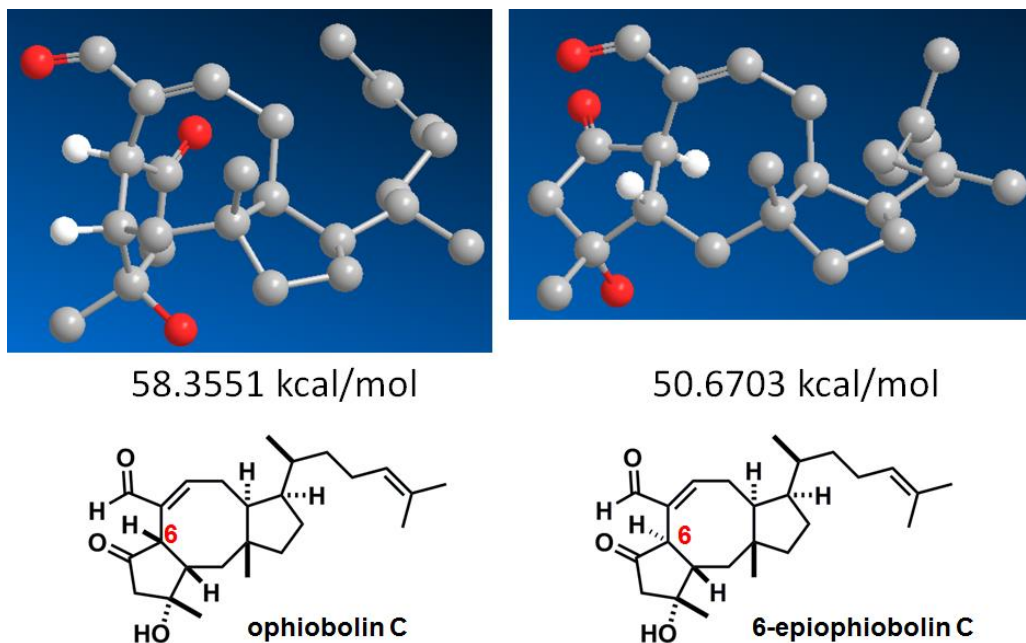


Fig. 2-47 ophiobolin C, 6-epiophiobolin C の分子力学計算

3) OblB_{Ac} と OblB_{Bm}, OblB_{Ev} のアミノ酸配列比較

以上の考察から、OblB_{Ac} は ophiobolin F に対して単独で多段階の酸化修飾を行う機能を持っているものの、それによって生じるのは ophiobolin C 生合成経路から外れた分岐生成物であるといえる。これに対し、OblB_{Ac} と 67-68% の相同性を示す OblB_{Bm}, OblB_{Ev} が ophiobolin C を与えたことから、類似したクラスター中に存在するホモログが異なる生成物を与える場合があることが示された。類似の例は *Penicillium brasilianum* における preaustinoid A1 の酸化修飾にも見られ、 α -ケトグルタル酸依存型酸化酵素である AusE と PrhA は 92% の相同性を示すにも関わらず、それぞれ異なる生成物を与えることが知られている³¹。こうした機能的な違いが何に起因するのか調べるために、OblB_{Ac}, OblB_{Bm}, OblB_{Ev} のアミノ酸配列の比較を行った(Fig. 2-48)。このアライメントにおいて OblB_{Ac} のみが他の 2 つとは異なっているアミノ酸残基を調べたところ、K123, R175, A432, E447, A470 などが該当したものの、それ以外のアミノ酸残基はほとんどが高く保存されていることがわかった。このことから、OblB_{Ac} は活性部位のごくわずかな違いによって異なる生成物を与えており、単一の生成物を与える P450 の機能改変によって多様な生成物が得られる可能性があることを示唆している。

```

          10      20      30      40      50      60
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  -----MEASLH-FPIDASLRAAVAVISAGAFYLLNLVIYRL
oblBBm  -----MSSIQLQKYLDLLPENAILNAGIAIAGLSAAYAIGLVIYRL
oblBEv  MEAYFPQTTRDALAGLLPSQMSGRFPPEMPAYLTQDVLLRAAGAVGAIYAIYISGLVIYRL
          :      :      :      :      :      :
          70      80      90      100     110     120
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  FLSPLAKFPGPKLAAVTSWYELYDVLVHKGKYLFEIEKMHDKYGPPIVRINPFELSIRDSE
oblBBm  YLSPISKFPKPKIAAATFWYELYDVIHKGQYFHKIEEMHEKYGPPIVRINPHELSIRDSD
oblBEv  FLSPLAKFPGPKIAAMTSYELYDVIHKGKYLFEIEKMHDKYGPPIVRINPFELSIRDSE
          :***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
          130     140     150     160     170     180
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  YYDELYVAGSVRPTDRYEAFFVEGIVDTEGSHIATIEHDLHRKRRKPLDPYFSRLGVSRL
oblBBm  YYDELYVSGSVRPSDRYEGFVNGVVDTEGSHLATVAHELHRKRRKPLDPYFSRAGVNRLE
oblBEv  YYDELYVMGNIRKTRDYEAFFVEGVVDTEGSHLATISHDLHRKRRKPLDPYFSRQGITRLE
          ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          190     200     210     220     230     240
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  PMLGELTEKLIIVNRFESFIRGKVVRLDHAFTAYSGDVINRLCMDDPPDVLVDDPEFSPW
oblBBm  PMVADLTEELVVKRFEFFIGKVVRLDHAFTAYSGDIISALCIDEPF-HFTSTPDFTPS
oblBEv  PMVAELTEKLVNRLSEYIGKVVRLDHAFTAYSGDVINRICVNRPSSEVYVEDDFAPW
          ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          250     260     270     280     290     300
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  WYNMFHNGIATLPLEFMGLPWLIHVRLIPVSILAKLDPGTQTFNKFMMCDHLRVAKRE
oblBBm  WFDLFHSGVVTLPLEFMGLPWLIHLIRLIPESILAVIDPGAQNWNTFRMCMYDSIKDTKRE
oblBEv  WDFMFLGAVSLPLEFMGPWLIRLIRFMPASLASYLNTSMGFSKFKLMCDEQLNEAKRE
          ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          310     320     330     340     350     360
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  KAAQGSKDTSMMDA--RPTIFRHLNLSDLFPSELTDLLSKEAQVLIGTGTITTAGSLCF
oblBBm  KGAQPTKDTSLG---RPTLFRHLVNSDLPASELSDERLLREAQVLIGSGTMTTAGTMCF
oblBEv  KALKSKSQNSNQPTPGRRLTLFRHLVDSDLPAELSDTRLSREAQVLIGSGTMTTAGTMGF
          * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          370     380     390     400     410     420
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  ICYHIVVNPAIKKRLQEDLKLIMANYPAKKPTWAELETATYLOAVIKEGLRLSFGTMHRR
oblBBm  LVYYIKSNPEIHRRLTEELKPIMEGYPHKKPSWAEIEKAEYLOAVLKEGLRLSFGTIHRR
oblBEv  LCYYIMINPKIRARLSEELGSVMAEYPAKKPSLAELERLPYLOAVIKEGLRLSYGTMHRR
          : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          430     440     450     460     470     480
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  TRVSPKQPLQFRQWTIPAGVPVGMSAYTARDPSVFPRPDEFLPERWLSNVTPEMSRNYV
oblBBm  PRVSPNQPLQFKEWVIPAGVPVGMSAYTQTDPKIFPNPHEFNPDRLSNVTPEMKKNYV
oblBEv  ARVSPSQPLLQFKEWVIPGTPVGMSAYTQIRDEKTFPRPMEFLPERWLGEITPEMYRNYI
          ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :
          490     500     510     520     530     540
          |      |      |      |      |      |
oblBAC  PFSRGSRRCLGMNLAACINHVIAITLFRPGGPDFKLYETSEKDVKPAHDLVLPPLSLESK
oblBBm  PFSKGSRRHCLGMNLAACILNYIIATMFRPGAVDFDLFETTELVDVKPTHDMVPLPSLKS
oblBEv  PFSKGSRRHCLGMNLAACILNFILAAMFRPGAAPFELYGTDES DVRPVHDLIVPMRDLDSL
          ***** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

oblBAC  GFRVIFR
oblBBm  GFKVKFN
oblBEv  GVRVVYN
          * * *

```

Fig. 2-48 OblB のアミノ酸配列比較

2-3-5. OblC_{Ac} (フラビン依存型酸化酵素)による **6** の推定生合成機構

OblC は Pfam によるモチーフ検索の結果 NAD_binding_8 モチーフを持つことがわかり、cyclopiazonic acid 生合成経路中の FAD 依存型アミノキシダーゼである CpaO などと相同性を示した。AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}C_{Ac}D_{Bm}* から得られた酸化生成物 **6** は、6 位の水素が α 配置であることから 6-epiophiobolin C を経由して生成していると考えられる (Fig. 2-49)。6-epiophiobolin C の 5 位がアセタールへと変換された後、一方の水酸基が 21 位のアルデヒドへと求核攻撃し、さらに 21 位が酸化されることでラクトン環が形成され中間体 **10** が生成する。続いて側鎖の 16-17 位が OblC_{Ac} によって酸化されジエンを形成することで **6** が生合成されると推定される。当初の推定では OblC は ophiobolin A に見られる側鎖のエーテル環形成に関与すると思われていたが、実際に確認された機能は ophiobolin K に見られる共役ジエンの形成であった。これはエーテル環形成に必要な 14 位の水酸基が基質にはないことが原因と考えられる。ophiobolin B が基質である場合、17 位のアリル位水素が OblC によって引き抜かれ、そこへ 14 位の水酸基が求核攻撃することでエーテル環を形成することができる。OblB_{Ac} の反応では酵素自体の機能的問題によって予想外の生成物が得られていたのに対し、OblC_{Ac} の反応では基質が異なるために予想外の反応が起きているように思われる。ophiobolin C から ophiobolin B への変換に関わるのは OblB あるいはクラスター外に存在する別の P450 と考えられるものの、OblB 発現株から ophiobolin B の生産は確認されておらず、候補遺伝子の発見には至っていない。OblC が実際に ophiobolin A の生合成に関わるかどうかについては、OblC 発現株を用いた微生物変換、組換え酵素による *in vitro* 解析、生産菌の遺伝子破壊等によって確認することができると考えている。

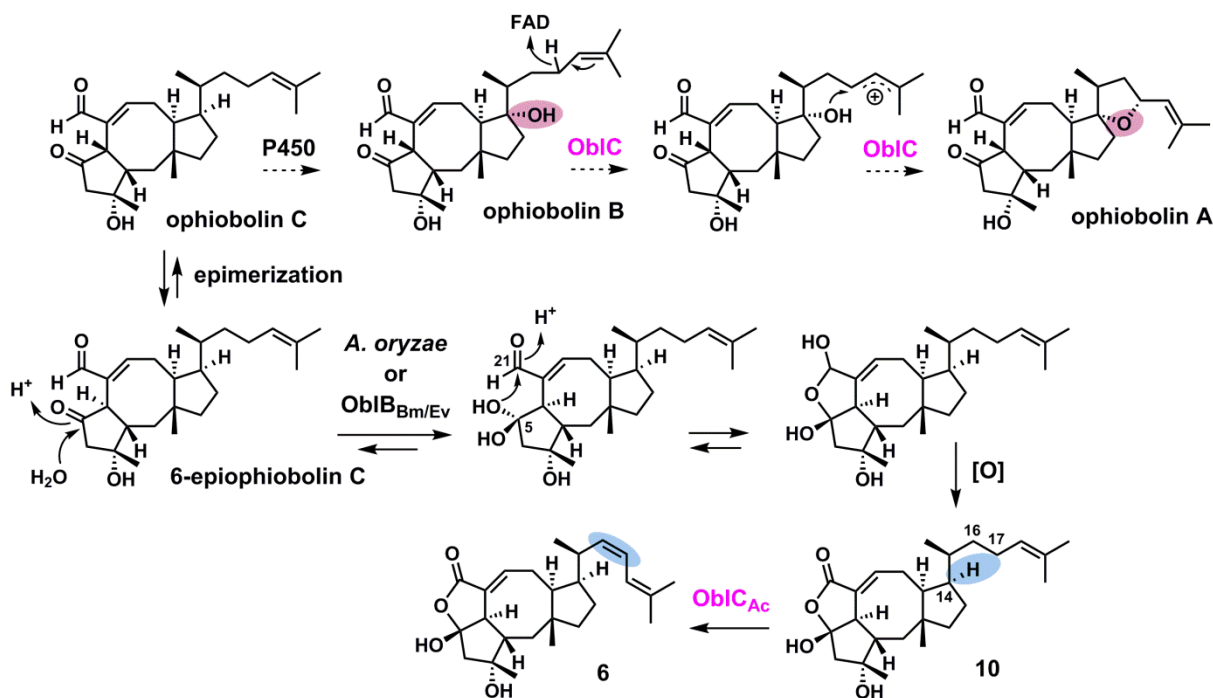


Fig. 2-49 OblC の推定反応機構

2-3-6. ObID (トランスポーター)についての考察

oblB_{Bm} と *oblB_{Ev}* の機能解析を行った際、AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}*, AO-*oblA_{Ac}B_{Bm}* からは ophiobolin C は生産されず、トランスポーターである ObID を共発現させた場合のみ生産が確認された。これは宿主に対する生成物の毒性が原因であり、その毒性を回避するために宿主が何等かの機構によって生成物を分解してしまっていると考えられる。ophiobolin 類縁化合物は真核細胞に対して毒性を示すことから³²、ophiobolin C が麴菌に対して毒性を示したとしても驚くべきことではない。実際、麴菌野生株に対して ophiobolin C を投与したところ、麴菌の生育が阻害されるとともに ophiobolin C が消費される様子が観察された(Fig. 2-50)。また、*B. maydis* を液体培地で培養し ophiobolin A の抽出を試みたところ、培養濾液から ophiobolin A が多く抽出されたことから、生産菌において ophiobolin 類縁化合物はトランスポーターによって菌体外へ排出されていることが支持された(Fig. 2-51)。

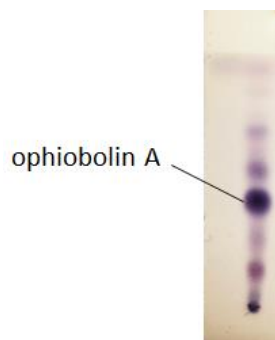
我々が宿主として用いている麴菌は、現在までに我々を含むいくつかの研究グループによってその汎用性が示されており、aphidicolin や solanapyrone, paxilline などの毒性化合物の異種生産にも適用されている^{33, 34, 35, 36, 37, 38}(Fig. 2-52)。この汎用性の一因となっているのは、麴菌の持つ多数のトランスポーターである。トランスポーターは様々な分子を細胞内外へ輸送する機能をもつタンパク質であり、特に ABC トランスポーターは微生物の薬剤耐性において重要な役割を果たしている³⁹。麴菌は他の糸状菌や真菌と比較すると多くのトランスポーターを有しており、ABC トランスポーターに関しても近縁種である *A. nidulans* よりも 6 つ多く持っていることがわかる(Fig. 2-53)⁴⁰。この豊富なトランスポーターの働きによって、毒性化合物を異種生産させてもそれを菌体外へ放出させることができたため、麴菌は宿主として高い汎用性を示したものと考えられる。しかし今回の場合、ophiobolin C は麴菌の持つトランスポーターの基質受容性から外れたことが異種生産に失敗した原因であると考えられ、これは麴菌異種発現系の汎用性が適用されない初の報告例であった。以上から、毒性化合物の異種生産において、クラスター中に存在するトランスポーターが必須となる場合があるという新たな知見が得られた。



A. oryzae NSAR1 WT + ophiobolin F (50 µg) *A. oryzae* NSAR1 WT + ophiobolin C (50 µg)

培養 3 日後

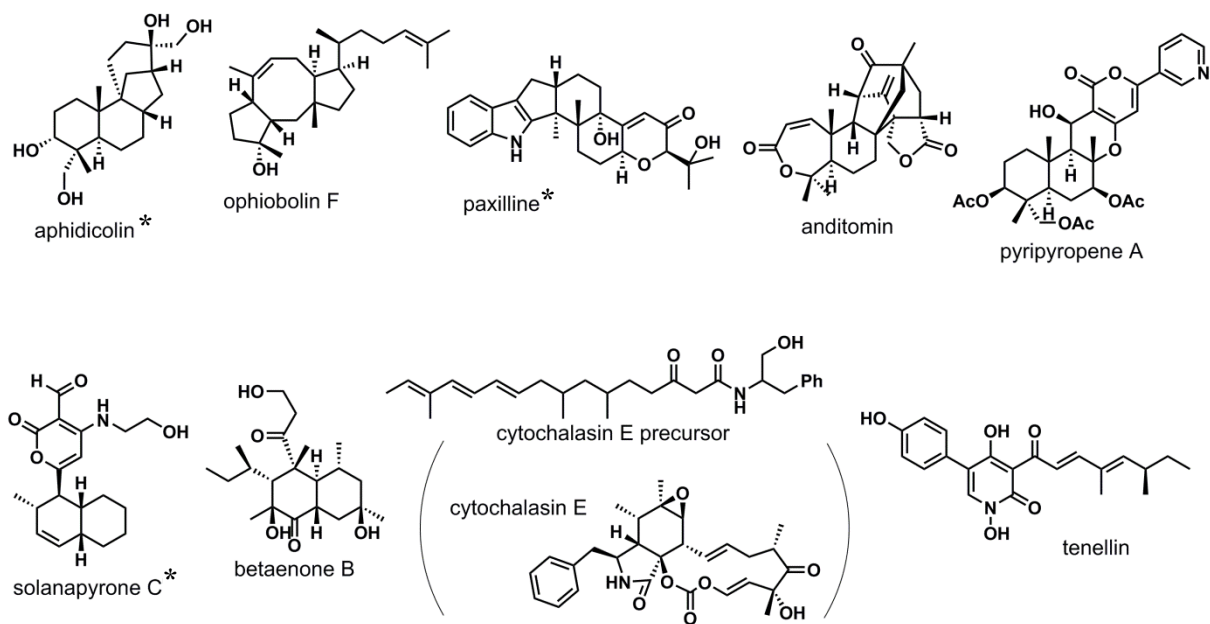
Fig. 2-50 麴菌に対する ophiobolin C 投与実験



展開溶媒: Hexane/AcOEt = 1

呈色試薬: バニリンリン酸塩

Fig. 2-51 液体培地から ophiobolin A の抽出



* 真核細胞に対する毒性が確認されているもの

Fig. 2-52 麹菌による異種生産の適用例

	<i>A. oryzae</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>A. fumigatus</i>	<i>N. crassa</i>
Total Transporter Proteins	610	474	548	339
ATP-Dependent	61	54	74	55
ABC family	52	46	37	34
P-ATPase family	2	2	26	19
Ion Channels	18	26	22	10
Annexin family	3	14	3	0
Secondary Transporter	529	389	444	270
AAAP family	5	8	17	4
APC family	75	39	47	15
DMT family	5	5	13	6
MC family	18	12	26	33
MFS family	365	278	251	142
Unclassified	1	4	7	3

Fig. 2-53 糸状菌の持つトランスポーターの数

2-4. 2章のまとめ

テルペノイド生合成機構のうち、1章では炭素骨格の構築段階に焦点を当て、4種の新たな環化酵素遺伝子を見出した。それらの周辺には複数の酸化酵素遺伝子が存在していたことから、本章ではその機能解析により生物活性天然物の生合成を試みた。その結果、Bm3, Pb1の酸化修飾により既知天然物(-)-terpestacin および新規天然物 betaestacin の酵素的合成に成功した。また、*A. clavatus* および ophiobolin 生産菌のゲノム上から見出された ophiobolin 類縁化合物の生合成遺伝子クラスターの機能解析を試みた。その結果、*A. clavatus* 由来の *oblB_{Ac}* (P450) は4種の新規生成物を与えたのに対し、ophiobolin 生産菌由来の *oblB_{Bm}*, *oblB_{Ev}* は既知天然物 ophiobolin C を与えることがわかった。

以上のことから、本章では環化酵素遺伝子と酸化酵素遺伝子との共発現による天然物のゲノムマイニングについて3通りの例を示した。①既知天然物の取得例 (terpestacin, ophiobolin C)、②新規天然物の取得例 (betaestacin II)、③類似遺伝子クラスターからの想定外な新規天然物の取得例 (betasestacin III, IV, **1, 2, 3, 4**)である。①の例では最終産物や中間体の構造が予想でき、遺伝子機能との対応付けも容易である。一方、②の例については、現状では酵素のアミノ酸配列から生成物の構造を予想することができず、実際に機能する酸化酵素遺伝子の数や働く順序も一つ一つ検証していく必要がある。③の例では、酸化酵素の働く順序は類似したクラスターどうしで共通である可能性が高いものの、各ホモログどうしの生成物が異なる上に最終産物へ至るまでに必要な酸化酵素の数も異なる場合がある。従って、ゲノムマイニングによる天然物生産を行う上では、以下のような手順に沿って実験を行うことが重要であると考えられる。まず、バイオインフォマティクスにより標的遺伝子のホモログを探索し、類似の遺伝子クラスターが複数の菌株に保存されているかどうか確認する。類似のクラスターが見出された場合、それらを比較することで天然物の生合成に関与する候補遺伝子を絞り込むことができる。候補遺伝子すべてを共発現させることによりその遺伝子クラスターにおける最終産物を取得し、続いて個々の修飾遺伝子について機能解析を行なうことで生合成中間体の同定を試みる。さらに類似遺伝子クラスターについても同様に機能解析を行うことで、酸化様式の異なる複数の新規天然物を取得できる可能性がある。

酸化酵素の相同性と機能との相関については、本章 2-2 と 2-3 において対照的な知見が得られた。tpc クラスターは生産菌と同一の既知天然物を与えたのに対し、2つの btc クラスターは異なる天然物を与えたことから、同じ機能をもつホモログ間に見られる相同性としてはおよそ 40%が目安になると考えた。しかしながら、obl クラスターの機能解析においておよそ 70%の相同性を示す *OblB_{Ac}*, *OblB_{Bm/Ev}* が異なる生成物を与えたことから、これらの酸化酵素はごくわずかなアミノ酸残基の違いによって生成物を作り分けている場合があることが示された。今後こうした相関についてより詳細な知見が得られれば、アミノ酸配列に基づく酸化生成物の構造予測や酸化酵素の人為的機能改変に繋がる可能性があるのではないかと考えられる。

前述の通り、テルペノイド生合成遺伝子クラスターの中には複数の糸状菌の間で保存されているものがあることが近年わかってきた。ophiobolin や terpestacin, betaestacin の生合成遺伝子クラスターは *B. maydis*, *E. varicolor*, *P. betae*, *C. orbiculare* など複数の糸状菌に保存されており、これらの菌株の多くは複数のテルペン環化酵素遺伝子を有している。このことから、糸状菌は外来のテルペノイド生合成遺伝子を積極的に取り込み、それを生存競争の中で活用しているのではな

いかと考えられ、その生物学的意義については今後の研究が待たれるところである。

最後に、本研究の中では機能解析が行われなかった BmTS1, BmTS2 の周辺遺伝子についても紹介する。*Bipolaris maydis* C5 のゲノム上において、BmTS1 の周辺には P450 および α -ケトグルタル酸依存型酸化酵素が存在していた(Fig. 2-54, Bm1 クラスター)。また、BmTS2 の周辺からは 2 種の P450 と SDR、フラビン依存型酸化酵素が見出された(Fig. 2-54, Bm2 クラスター)。今後、これらの共発現により Bm1, Bm2 が酸化修飾を受けた新規天然物が取得されることが期待される。さらに、クレード A から得られた環化体のように構造の類似した化合物どうしでは、環化酵素遺伝子と酸化酵素遺伝子の組み合わせを入れ替えることでさらに多様な非天然型生成物を取得できる可能性もあるのではないかと考えている。

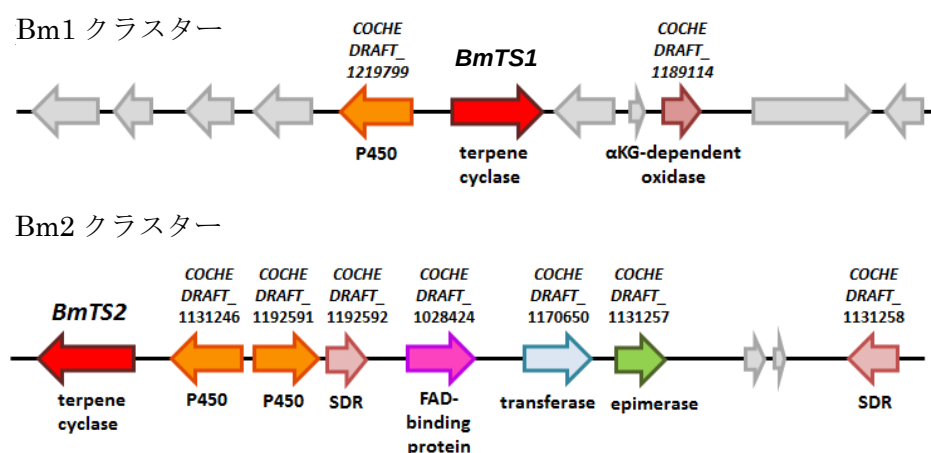


Fig. 2-54 機能解析済み環化酵素 BmTS1, BmTS2 を含む生合成遺伝子クラスター

参考文献

- ¹ Mitsuguchi, H.; Seshime, Y.; Fujii, I.; Shibuya, M.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6402-6411.
- ² Lodeiro, S.; Xiong, Q.; Wilson, W.K.; Ivanova, Y.; Smith, M. L.; S. May, G. S.; Matsuda, S. P. T. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1241-1244.
- ³ Tudzynski, B. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2005**, *66*, 597-611.
- ⁴ Oka, M.; Imura, S.; Tenmyo, O.; Sawada, Y.; Sugawara, M.; Ohkusa, N.; Yamamoto, H.; Kawano, K.; Huf, S.; Fukagawa, Y.; Oki, T. *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 367-373.
- ⁵ Jung, H. J.; Shim, J. S.; Lee, J.; Song, Y. M.; Park, K. C.; Choi, S. H.; Kim, N. D.; Yoon, J. H.; Mungai, P. T.; Schumacker, P. T.; Kwon, H. J. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 11584-11595.
- ⁶ Randazzo, G.; Fogliano, V.; Ritienia, A.; Mannina, L.; Rossin, E.; Scarallo, A.; Segred, A. L. *Tetrahedron*, **1993**, *49*, 10883-10896.
- ⁷ Guo, D.; Zhao, M.; Xiao, S.; Xia, B.; Wan, B.; Gu, Y.; Ding, L.; Zhou, Y. *Phytochem. Lett.* **2015**, *14*, 260-264.
- ⁸ Nihashi, Y.; Lim, C.; Tanaka, C.; Miyagawa, H.; Ueno, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2002**, *66*, 685-688.
- ⁹ J. Chan, T. F. Jamison, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10682-10691.
- ¹⁰ Noike, M.; Ono, Y.; Araki, Y.; Tanio, R.; Higuchi, Y.; Nitta, H.; Hamano, Y.; Toyomasu, T.; Sassa, T.; Kato, N.; Dairi, T. *PLoS ONE*. **2012**, *7*, E42090-E42090.
- ¹¹ Fujii, R.; Ugai, T.; Ichinose, H.; Hatakeyama, M.; Kosaki, T.; Gomi, K.; Fujii, I.; Minami, A.; Oikawa, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 426-431.
- ¹² Ishiuchi, K.; Nakazawa, T.; Yagishita, F.; Mino, T.; Noguchi, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. J. *Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 7371-7377.
- ¹³ Leferink, N. G. H.; Heuts, D. P. H. M.; Fraaije, M. W.; Berkel, W. J. H. *Arch. Biochem. Biophys.* **2008**, *474*, 292-301.
- ¹⁴ Ye, Y.; Minami, A.; Mandi, A.; Liu, L.; Taniguchi, T.; Kuzuyama, T.; Monde, K.; Gomi, K.; Oikawa, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, *137*, 11846-11853.
- ¹⁵ Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Lee, S.; Hoshino, M.; Mori, T.; Okada, M.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Fujita, M.; Abe, I. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 5785-5788.
- ¹⁶ Okada, M.; Matsuda, Y.; Mitsunashi, T.; Hoshino, S.; Mori, T.; Nakagawa, K.; Quan, Z.; Qin, B.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Kawaide, H.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 10011-10018.
- ¹⁷ Liu, Z.; Chen, Y.; Chen, S.; Liu, Y.; Lu, Y.; Chen, D.; Lin, Y.; Huang, X.; She, Z. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 1406-1409.
- ¹⁸ Kaneda, M.; Takahashi, R.; Iitaka, Y.; Shibata, S. *Tetrahedron Lett.* **1972**, *13*, 4609-4611.
- ¹⁹ Toyomasu, T.; Kawaide, H.; Ishizuaki, A.; Shinoda, S.; Otsuka, M.; Mitsunashi, W.; Sassa, T. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 660-664.
- ²⁰ Au, T. K.; Chick, W. S. H.; Leung, P.C. *Life Sciences*, **2000**, *67*, 733.
- ²¹ Chiba, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 594-597.
- ²² Kawamura, T.; Fujimaki, T.; Hamanaka, N.; Torii, K.; Kobayashi, H.; Takahashi, Y.; Igarashi, M.; Kinoshita, N.; Nishimura, Y.; Etsu Tashiro, E.; Imoto, M. *J. Antibiot.* **2010**, *63*, 601-605.
- ²³ Hamann, M. T. *et al. J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 895.
- ²⁴ Arai, M.; Niikawa, H.; Kobayashi, M. *J. Nat. Med.* **2013**, *67*, 271.
- ²⁵ Skaggs, B. A.; Alexander, J. F.; Pierson, C. A.; Schweitzer, K. S.; Chun, K. T.; Koegel, C.; Barbuch, R.; Bard, M. *et al. Gene.* **1996**, *169*, 105-109.
- ²⁶ Nozoe, S.; Hirai, K.; Tsuda, K. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *20*, 2211-2216.
- ²⁷ Wei, H.; Itoh, T.; Kinoshita, M.; Nakai, Y.; Kurotaki, M.; Kobayashi, M. *Tetrahedron*. **2004**, *60*, 6015-6019.
- ²⁸ Singh, S. B.; Smith, J. L.; Sabnis, G. S.; Dombrowski, A. W.; Schaeffer, J. M.; Goetz, M. A.; Bills, G. F. *Tetrahedron*, **1991**, *47*, 6931-6938.
- ²⁹ Li, E.; Clark, A. M.; Rotella, D. P.; Hufford, C. D. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 74-81.
- ³⁰ Rundberget, T.; Skaar, I.; O'Brien, O.; Flåøyen, A. *Mycopathologia*. **2004**, *157*, 349-357.
- ³¹ Matsuda, Y.; Iwabuchi, T.; Fujimoto, T.; Awakawa, T.; Yu Nakashima, Y.; Mori, T.; Zhang, H.; Hayashi, F.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12671-12677.
- ³² Li, E.; Clark, A. M.; Rotella, D. P.; Hufford, C. D. *J. Nat. Prod.* **1995**, *58*, 74.

-
- ³³ 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.
- ³⁴ Matsuda Y.; Wakimoto, T.; Mori, T.; Awakawa, T.; Abe, I. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 15326-15336.
- ³⁵ Itoh, T.; Tokunaga, K.; Matsuda, Y.; Fujii, I.; Abe, I.; Ebizuka, Y.; Kushiro, T. *Nat. Chem.* **2010**, *2*, 858-864.
- ³⁶ Ugai, T.; Minami, A.; Fujii, R.; Tanaka, M.; Oguri, H.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1878-1881.
- ³⁷ Fujii, R.; Minami, A.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2999-3002.
- ³⁸ Heneghan, M. N.; Yakasai, A. A.; Halo, L. M.; Song, Z.; Bailey, A. M.; Simpson, T. J.; Cox, R.J.; Lazarus, C. M. *ChemBioChem.* **2010**, *11*, 1508-1512.
- ³⁹ Linton, K. J. *Physiology*, **2007**, *22*, 122.
- ⁴⁰ Machida, M.; Asai, K.; Sano, M.; Tanaka, T.; Kumagai, T.; Terai, G.; Kusumoto, K.; Arima, T.; Akita, O.; Kashiwagi, Y.; Abe, K.; Gomi, K.; Horiuchi, H.; Kitamoto, K.; Kobayashi, T.; Takeuchi, M.; Denning, D. W.; Galagan, J. E.; Nierman, W. C.; Yu, J.; Archer, D. B.; Bennett, J. W.; Bhatnagar, D.; Cleveland, T. E.; Fedorova, N. D.; Gotoh, O.; Horikawa, H.; Hosoyama, A.; Ichinomiya, M.; Igarashi, R.; Iwashita, K.; Juvvadi, P. R.; Kato, M.; Kato, Y.; Kin, T.; Kokubun, A.; Maeda, H.; Maeyama, N.; Maruyama, J.; Nagasaki, H.; Nakajima, T.; Oda, K.; Okada, K.; Paulsen, I.; Sakamoto, K.; Sawano, T.; Takahashi, M.; Takase, K.; Terabayashi, Y.; Wortman, J. R.; Yamada, O.; Yamagata, Y.; Anazawa, H.; Hata, Y.; Koide, Y.; Komori, T.; Koyama, Y.; Minetoki, T.; Suharnan, S.; Tanaka, A.; Isono, K.; Kuhara, S.; Ogasawara, N.; Kikuchi, H. *Nature.* **2005**, *438*, 1157-1161.

第3章 実験部

3-1. General

All reagents commercially supplied were used as received. Column chromatography was carried out on 60N silica gel (Kanto Chemicals). Optical rotations were recorded on JASCO P-2200 digital polarimeter. ^1H - and ^{13}C -NMR spectra were recorded on Bruker DRX-500 or Bruker AMX-500 spectrometer (500 MHz for ^1H -NMR and 125 MHz for ^{13}C -NMR). NMR spectra were recorded in CDCl_3 (99.8 atom% enriched, Kanto) and C_6D_6 (99.5 atom% enriched, Kanto). ^1H chemical shifts were reported in δ value based on residual chloroform (7.26 ppm) and benzene (7.15 ppm) as a reference. ^{13}C chemical shifts were reported in δ value based on chloroform (77.1 ppm) and benzene (128.0 ppm) as a reference. Data are reported as follows: chemical shift, multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet, br = broad), coupling constant (Hz), and integration. GC-MS analyses were conducted with MS-2010 (Shimadzu). Mass spectra were obtained with a JEOL JMS-T100GCV (EI mode) or a JEOL JMS-T100LP (ESI mode).

Oligonucleotides for polymerase chain reactions (PCRs) were purchased from Hokkaido System Science Co., Ltd. PCRs were performed with a BioRad S1000 thermal cycler. Cell disruption was dealt with an ultrasonic disrupter UR-200P (TOMY SEIKO, Tokyo, Japan). Analysis of the samples during protein purification was performed using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, and the proteins were visualized by using coomassie brilliant blue staining. Protein concentration was determined by the Bradford method with bovine serum albumin as a standard.

3-2. Strains and culture condition

Escherichia coli HST08 and *E. coli* DH5 α was used for cloning and following standard recombinant DNA techniques. *E. coli* BL21-Gold(DE3) was used for protein expression. A fungal host strain used in this study was *Aspergillus oryzae* NSAR1, a quadruple auxotrophic mutant (*niaD* $^-$, *sC* $^-$, Δ *argB*, *adeA* $^-$), for fungal expression.

E. coli was cultivated in Luria-Bertani (LB) medium. *A. oryzae* NSAR1 was cultivated in DPY medium (20 g/L of dextrin 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 (100 g porished rice, 0.1 g/kg of adenine), CD medium (3.5% Czapek Dox, 4.65% NaCl, 1.5% agar, and appropriate nutrients). 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.

3-3. Preparation of genomic DNA (gDNA) and complementary DNA (cDNA)

Genomic DNA of *Aspergillus clavatus* NRRL 1, *Bipolaris maydis* C5, *Emmericella varicolor* GF10, and *Phoma betae* PS-13 was extracted according to the following method; the mycelia of fungus was collected by filtration, washed with water, and dried using paper towel. 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 12,000 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 12,000 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 CH₃COONa solution and genomic DNA was recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min. The pellet was then washed with 70% ethanol solution and dried for 15 min. Finally, the isolated DNA was resuspended in TE buffer (10 mM of Tris-HCl (pH 8.0) and 1mM of EDTA) and stored at -20°C for further use.

For extraction of total RNA, *A. oryzae* transformants were cultivated in MPY medium for 3 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 13,000 rpm for 5 min. To the supernatant was then added chloroform. After being vortexed for 2 sec, the mixture was centrifuged at 13,000 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 CH₃COONa solution and total RNA was recovered by centrifugation at 13,000 rpm for 15 min. The pellet was then washed with 70% ethanol solution and dried for 5 min. The total RNA was resuspended in RNase free water. Finally, cDNAs were prepared with PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit (TaKaRa) using 5 µg of total RNA as a template according to the manufacture's protocol.

3-4. Cloning and plasmids construction

3-4-1. Construction of *A. oryzae* expression plasmids harboring *obl* genes

The *oblB_{Ac}*, *oblB_{Bm}*, *oblB_{Ev}*, *oblC_{Ac}*, *oblC_{Bm}*, *oblD_{Bm}*, and *oblE_{Ev}* were amplified from genomic DNA of *Aspergillus clavatus* NRRL1, *B. maydis* C5, or *E. varicolor* GF10 with primer set as shown in Supplemental Table S1. PCR reactions were performed with the KOD-Plus-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site (site 1 and/or site 2) of pUARA2 or pUSA2 using In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories) to construct expression plasmids.

Table 3-1. Oligonucleotides used for construction of *A. oryzae* expression plasmids harboring *obl* genes.

Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size Vector
<i>oblB_{Ac}</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGGAGGCCAGCTTG	1849 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGTTAACGAAAAATAAC	pUSA2
<i>oblB_{Bm}</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGTCTTCTATACAG	1927 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGCTAGTTGAACTTGAC	pUSA2
<i>oblB_{Ev}</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGGAGGCCTACTTC	2007 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGTCAGTTATAAACAAC	pUSA2
<i>oblC_{Ac}</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGCATCTCTCCTTT	1449 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGTCACAACCCCTCAAT	pAdeA2
<i>oblD_{Bm}</i>	<i>KpnI</i>	F: CGGAATTCGAGCTCGATGAGTTTGGGACCC	4578 bp
		R: ACTACAGATCCCCGGCTAAAATGCAGCTCT	pUSA2

3-4-2. Construction of *A. oryzae* expression plasmids harboring biosynthetic genes of sesterterpenoids

The *BmTS1*, *BmTS2*, *BmTS3* (*tpcA*), *BmTS4*, *PbTS* (*btcA*), *tpcB*, *tpcC*, *tpcD*, *btcB*, *btcC*, and *btcD* were amplified from genomic DNA of *B. maydis* C5 or *P. betae* PS-13 with primer set as shown in Supplemental Table S2. PCR reactions were performed with the KOD-Plus-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site (site 1 and/or site 2) of pUARA2, pUSA2, pAdeA2, or pTAex3 using In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories) to construct expression plasmids.

Table 3-2. Oligonucleotides used for construction of *A. oryzae* expression plasmids harboring biosynthetic genes of sesterterpenoids

Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size Vector
<i>BmTS1</i>	<i>KpnI</i>	F: CGGAATTCGAGCTCGATGGAGGCAATTTTC	2134 bp
		R: ACTACAGATCCCCGGCTATTGAGTGAGACT	pUARA2
<i>BmTS2</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGTACTTACTCCAA	2413 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGCTACCAATCGCCACT	pUARA2
<i>BmTS3</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGGAGCAGCTTTCA	2210 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGTCATTTGCTAGTACT	pUSA2
<i>BmTS4</i>	<i>KpnI</i>	F: CGGAATTCGAGCTCGATGTCAACTTATATC	2404 bp
		R: ACTACAGATCCCCGGTCATACCTCCAATCT	pUSA2
<i>PbTS</i>	<i>KpnI</i>	F: AATTCGAGCTCGGTACATGGCAAACCTCC AGTCACC	1956 bp
		R: TACTACAGATCCCCGGTCATTGGTTCAAGC TAAGCGTC	pTAex3
<i>tpcB</i>	<i>KpnI</i>	F: CGGAATTCGAGCTCGATGGCAGTGATTTCT	1845 bp
		R: ACTACAGATCCCCGGCTATTGAAACCTTTT	pUSA2
<i>tpcC</i>	<i>KpnI</i>	F: GAATTCGAGCTCGATGGCAATATTGAGC	1686 bp
		R: ACTACAGATCCCCGGCTAAGAAACCTTTAC	pUARA2
<i>tpcD</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGCAGCTACTAGGA	1713 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGTTAATTGATCTTGT	pUARA2
<i>btcB</i>	<i>KpnI</i>	F: CGGAATTCGAGCTCGATGGATGCAATGAACGGGT	1818 bp
		R: ACTACAGATCCCCGGCTAGCTCTCCCGCTTCTG	pUSA2
<i>btcC</i>	<i>NheI</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGATGTCATTTCCAGGGGTGA	1763 bp
		R: TAGTGCGGCCGCTAGCTACGCTCCAGGAGAAGC	pUSA2

3-4-3. Construction of *E. coli* expression plasmids harboring spliced *BmTS* genes

The spliced *BmTS1*, *BmTS2*, and *BmTS3* were amplified using cDNA with primer set as shown in Supplemental Table S3. PCR reactions were performed with the KOD-Plus-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into *NdeI* site of pColdI using In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories) to construct expression plasmids.

Table 3-3. Oligonucleotides used for construction of *E. coli* expression plasmids harboring spliced *BmTS* genes.

Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size Vector
<i>BmTS1</i> (exon)	<i>NdeI</i>	F: ATCGAAGGTAGGCATATGGAGGCAATTTT	2028 bp
		R: ACCGAGCTCCATATGCTATTGAGTGAGACT	pColdI
<i>BmTS2</i> (exon)	<i>NdeI</i>	F: ATCGAAGGTAGGCATATGTACTTACTCCAA	2241 bp
		R: ACCGAGCTCCATATGCTACCAATCGCCACT	pColdI
<i>BmTS3</i> (exon)	<i>NdeI</i>	F: ATCGAAGGTAGGCATATGGAGCAGCTTTCA	2115 bp
		R: ACCGAGCTCCATATGTCATTTGCTAGTACT	pColdI

3-4-4. Construction of *E. coli* expression plasmids harboring mutated *NfSS* genes

Mutations were introduced into a previously constructed pMalc4E-*NfSS* by PCR using respective primers as described in the Table S4 according to the manufacture's protocol of PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (Takara). These plasmids were separately introduced into *E. coli* BL21-Gold(DE3) for overexpression.

Table 3-4. Oligonucleotides used for construction of *E. coli* expression plasmids harboring mutated *NfSS* genes.

Insert	Sequence 5'-3'
<i>NfSS</i> (W318A)	F: CACTTT <u>GCC</u> GCCAGCTGCTCTCCCCGT
	R: GCTGGC <u>GGC</u> AAAGTGAGTACCAGCCAC
<i>NfSS</i> (F196A)	F: AGGGCAG <u>GCT</u> TGGCCGATGGTGGAGTTT
	R: CGGCCA <u>AGC</u> TGCCCTGATGCCGAAATC
<i>NfSS</i> (F191A)	F: GATGAT <u>GCA</u> GGCATCAGGGCATTCTGG
	R: GATGCC <u>TGC</u> ATCATCCCTTCTGTAGGC
<i>NfSS</i> (W164A)	F: AAAGGAG <u>GC</u> ATTGTCCGTTGCAGGAGGG
	R: GGACA <u>ATG</u> CTCCTTTGTTATACATGTC
<i>NfSS</i> (I60F)	F: GCACTTT <u>TTC</u> TCCATCAGTGAGCTCGGG
	R: GATGGAG <u>GAA</u> AAGTGCAAGTGCTCTCTC
<i>NfSS</i> (I60N)	F: GCACTT <u>AAT</u> TCCATCAGTGAGCTCGGG
	R: GATGGA <u>ATT</u> AAGTGCAAGTGCTCTCTC
<i>NfSS</i> (I60S)	F: GCACTT <u>AGT</u> TCCATCAGTGAGCTCGGG
	R: GATGGA <u>ACT</u> AAGTGCAAGTGCTCTCTC
<i>NfSS</i> (L68W)	F: GGGAAC <u>TGG</u> GGTGCTTTTGCCTACCCC
	R: AGCACCC <u>CCA</u> GTTCCTCCGAGCTCACTGAT
<i>NfSS</i> (T88G)	F: TACTTG <u>GGA</u> GATCTAGGGATTCTGCAT
	R: TAGATC <u>TCC</u> CAAGTAGGTCACAATCGC
<i>NfSS</i> (I92F)	F: CTAGGG <u>TTC</u> CTGCATGACGATGGGTAC
	R: ATGCAG <u>GAA</u> CCCTAGATCGGTCAAGTA
<i>NfSS</i> (G169E)	F: GTTGCAG <u>GAA</u> GGGGAGGGCAAGGTGCCT
	R: CTCCCC <u>TTC</u> TGCAACGGACAACCATCC
<i>NfSS</i> (D190N)	F: AGGGATA <u>AAT</u> TTTCGGCATCAGGGCATTC
	R: GCCGAA <u>ATT</u> ATCCCTTCTGTAGGCTTG

3-5. 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 NaH₂PO₄, pH 6.0) with gentle shaking at 30 °C for 2 h. Protoplasts were filtered through Miracloth (Calbiochem) and centrifuged at 2,000 rpm for 5 min. Then, protoplasts were washed with 0.8 M NaCl solution and adjusted to 2.0-2.5 x 10⁸ cells/mL by adding solution 2 (0.8 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5) and solution 3 (40% PEG4000, 50 mM CaCl₂, 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 7 days.

3-6. Isolation and analysis of the metabolites

3-6-1. Isolation and analysis of ophiobolins

Isolation of metabolites. Mycelia of *A. oryzae* transformants were inoculated into a solid medium containing polished rice (100 g) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30 °C for 10 days. After extraction with CHCl₃, the extract was concentrated in vacuo to afford crude extracts. The crude extracts were purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt=10) followed by HPLC equipped with respective columns at the conditions summarized in Table S5 to afford oxidative products.

1; Isolation yield: 10 mg from 100 g of rice medium. [α]_D²⁵ +112° (*c* 0.20, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₃₉O [M+H-H₂O]⁺: 355.3001, found: 355.2955. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-1.

2; Isolation yield: 0.2 mg from 100 g of rice medium. [α]_D²⁵ +16° (*c* 0.20, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₁O₂ [M+H-H₂O]⁺: 373.3107, found: 373.3096. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-1.

3; Isolation yield: 4 mg from 100 g of rice medium. [α]_D²⁵ +57° (*c* 0.27, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₁O₃ [M+H-H₂O]⁺: 389.3056, found: 389.3044. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-1.

4; Isolation yield: 0.1 mg from 100 g of rice medium. [α]_D²⁵ +3° (*c* 0.047, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₁O [M+H-H₂O]⁺: 357.3157, found: 357.3169. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-1.

6; Isolation yield: 0.8 mg from 1 kg of rice medium. [α]_D²⁵ +163° (*c* 0.20, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₃₇O₄ [M+H]⁺: 401.2692, found: 401.2692. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized

in Table 1-2.

ophiobolin C; Isolation yield: 0.1 mg from 100 g of rice medium. ESI-HR-MS: calcd. for $C_{25}H_{39}O_3$ $[M+H]^+$: 387.2899, found: 387.2922. All respects including 1H NMR, ^{13}C NMR, and optical rotation are in good agreement with the literature data^{1,2}.

6-epiophiobolin C; Isolation yield: 0.4 mg from 100 g of rice medium. ESI-HR-MS: calcd. for $C_{25}H_{39}O_3$ $[M+H]^+$: 387.2899, found: 387.2946. All respects including 1H NMR, ^{13}C NMR, and optical rotation are in good agreement with the literature data^{1,2}.

6-epiophiobolin N; Isolation yield: 1 mg from 1 kg of rice medium. ESI-HR-MS: calcd. for $C_{25}H_{37}O_2$ $[M+H]^+$: 369.2794, found: 369.2805. All respects including 1H NMR, ^{13}C NMR, and optical rotation are in good agreement with the literature data².

Analysis of the metabolites. The crude extract was analyzed by LC-MS with a ZORBAX XDB-C18 column (50 mm x 2.1 mm) at the following condition;

1-4, 6; Solvent: A/B = 20/80→0/100, 0-10 min; A/B = 0/100, 0-20 min; A/B = 0/100→20/80, 20-21 min; A/B = 20/80, 21-25 min (A: $H_2O+0.1\%$ HCOOH, B: $CH_3CN+0.1\%$ HCOOH) at a flow rate of 0.2 mL/min with 210 nm detection.

ophiobolin C, 6-epiophiobolin C, 6-epiophiobolin N; Solvent: A/B = 50/50→0/100, 0-15 min; A/B = 0/100, 15-25 min; A/B = 0/100→50/50, 25-26 min; A/B = 50/50, 26-35 min (A: $H_2O+0.1\%$ HCOOH, B: $CH_3CN+0.1\%$ HCOOH) at a flow rate of 0.2 mL/min with 210 nm detection.

Table 3-5. HPLC conditions for purification of ophiobolins.

Compound	Column	Flow rate (mL/min)	detect (nm)	solvent
5	Wakopak navi $\phi 4.6$ mm x 250 mm	1	210	100% MeCN
6	Wakopak ODS $\phi 10$ mm x 250 mm	3	210	100% MeCN
7	Wakopak ODS $\phi 10$ mm x 250 mm	3	210	95% MeCN
8	Wakopak ODS $\phi 10$ mm x 250 mm	3	210	95% MeCN
11	Wakopak navi $\phi 4.6$ mm x 250 mm	1	235	80% MeCN
2a	Wakopak navi $\phi 4.6$ mm x 250 mm	1	235	100% MeCN
2b	Wakopak navi $\phi 4.6$ mm x 250 mm	1	235	100% MeCN
10	Wakopak navi $\phi 4.6$ mm x 250 mm	1	235	100% MeCN
9	Wakopak navi $\phi 4.6$ mm x 250 mm	1	210	100% MeCN

3-6-2. Isolation and analysis of Bm1, Bm3, and Pb1 from AO-transformants

Extraction of metabolites. Mycelia of AO-*BmTS1234* or AO-*PbTS* was inoculated into a solid medium containing polished rice (100 g) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flask. Each culture was incubated at 30°C for 10 days. After extraction with $CHCl_3$, the extract was concentrated in vacuo to afford crude extracts.

Analysis of the metabolites. After partial purification of the crude extracts, the metabolites were analyzed by GC-MS equipped with a DB-1ms capillary column (0.32 mm x 30 m, 0.25 μ m film thickness; J&W Scientific) at the following conditions; the sample was injected into the column at 100°C in the splitless mode. After a 3 min isothermal hold at 100°C, the column temperature was increased at 14°C min⁻¹ to 268°C, with a 4 min isothermal hold at 268°C. The flow rate of helium carrier gas was 0.66 mL min⁻¹.

Bm1; The crude extracts of AO-*BmTS1234* were partially purified with silica gel column chromatography (hexane). Further purification with HPLC equipped with Wakopak® Navi C18-5 (ϕ 10 x 250 mm) at the conditions (λ = 210 nm, 100% acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min) gave **Bm1** (40.0 mg from 1 kg of rice medium). $[\alpha]_D^{25}$ -56° (*c* 1.0, CHCl₃); EI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₀ [M]⁺: 340.3130, found: 340.3122. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-2.

Bm3; The crude extracts of AO-*BmTS1234* were purified with silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 20 to 10) followed by HPLC to give **Bm3** (2.5 mg from 1 kg of rice medium). $[\alpha]_D^{25}$ -34° (*c* 1.0, CHCl₃); EI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₂O [M]⁺: 358.3236, found: 358.3232. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-2.

Pb1; The crude extracts of AO-*PbTS* were purified with silica gel column chromatography (hexane) followed by HPLC to give **Pb1** (14 mg from 1 kg of rice medium). $[\alpha]_D^{25}$ +12° (*c* 1.0, CHCl₃); EI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₀ [M]⁺: 340.3130, found: 340.3122. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-2.

3-6-3. Isolation and analysis of Bm1, Bm2, and Bm3 from *E. coli* transformants

Extraction of metabolites. EC-*BmTS1*, EC-*BmTS2*, or EC-*BmTS3* were grown at 37°C at an OD₆₀₀ of ~ 0.6 in a 500 mL flask. After the culture was cooled at 4°C, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (0.1 mM) was added to it. After incubation at 16°C for 18 h, the cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm and were then soaked with acetone. After filtration, the filtrate was concentrated in vacuo and the residues were extracted with EtOAc, and the combined organic layers were concentrated in vacuo to afford crude extracts.

Analysis of metabolites from *E. coli* transformants. The crude metabolites were analyzed by GC-MS according to the procedures described in 4-6-2.

Bm2 (isomeric mixture); The crude extracts of EC-*BmTS2* were partially purified with silica gel column chromatography (hexane). Further purification with HPLC equipped with Wakopak® Navi C18-5 (ϕ 10 x 250 mm) at the following conditions (λ = 210 nm, 100% acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min) gave **Bm2** (1.2 mg from 9.6 L of LB medium). $[\alpha]_D^{25}$ +18° (*c* 0.50,

CHCl₃). ¹H-NMR for **Bm2A** (500 MHz, CDCl₃) δ 2.48 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 1.97-2.22 (m, 6H), 1.45-1.89 (m, 14H), 1.40 (m, 1H), 1.09-1.17 (m, 2H), 1.07 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.93 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 0.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.84 (s, 3H). ¹³C-NMR for **Bm2A** (125 MHz, CDCl₃) δ 139.1, 134.4, 133.6, 129.2, 49.9, 46.9, 46.9, 46.7, 46.6, 42.1, 40.9, 39.1, 32.5, 31.5, 31.3, 31.2, 29.3, 28.8, 24.3, 22.3, 21.2, 18.7, 18.4, 17.2, 15.2. ¹H-NMR for **Bm2B** (500 MHz, CDCl₃) δ 3.27 (m, 1H), 2.79 (d, *J* = 16.8, 1H), 1.80 (s, 3H), 1.01 (3H), 0.96 (3H), 0.86 (3H), 0.80 (s, 3H), 0.74 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H) (Most signals were overlapped with those of **Bm2A**). ¹³C-NMR for **Bm2B** (125 MHz, CDCl₃) δ 139.5, 132.3, 130.4, 126.5, 52.3, 46.7, 41.0, 40.6, 40.3, 39.7, 35.0, 34.0, 31.0, 30.1, 30.0, 28.8, 28.7, 24.5, 24.4, 22.1, 21.8, 19.2, 18.2, 15.1 (One carbon signal was not observed possibly due to broadening or overlapping with those of **Bm2A**). EI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₀ [M]⁺: 340.3130, found: 340.3121.

3-6-4. Isolation and analysis of metabolites from EC-*Nf*SS (mutants)

The EC-*Nf*SS (mutans) were grown at 37°C at an OD₆₀₀ of ~0.6 in 500 mL flask. After cooling at 4°C, isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (0.1 mM) was added to the culture. After incubation at 16°C for 17 h, the cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm and were then soaked with acetone. After filtration, the filtrate was concentrated in vacuo and the residues were extracted with EtOAc, and the combined organic layers were concentrated in vacuo to afford crude extracts.

Analysis of metabolites from *E. coli* transformants. The crude metabolites were analyzed by GC-MS according to the procedures described in 4-6-2.

NFM-1: The crude extracts of EC-*F191A* were partially purified with silica gel column chromatography (hexane). Further purification with HPLC equipped with Wakopak[®] Navi C18-5 (φ10 x 250 mm) at the following conditions (λ = 210 nm, 100% acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min) gave **NFM-1** (2.1 mg from 11.2 L of LB medium). [α]_D²⁵ +78° (*c* 0.75, CHCl₃); EI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₀ [M]⁺: 340.3130, found: 340.3123. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-3.

NFM-2: The crude extracts of EC-*F191A* were partially purified with silica gel column chromatography (hexane). Further purification with HPLC equipped with Wakopak[®] Navi C18-5 (φ10 x 250 mm) at the following conditions (λ = 210 nm, 100% acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min) gave **NFM-2** (0.5 mg from 11.2 L of LB medium). [α]_D²⁵ +9° (*c* 0.33, CHCl₃); EI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₀ [M]⁺: 340.3130, found: 340.3122. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-3.

3-6-5. Isolation and analysis of terpestacins and betaestacins

Mycelia of transformant, AO-*tpcAB*, AO-*tpcABC*, AO-*tpcABCD*, or AO-*btcAB* was inoculated into a solid medium containing polished rice (100 g) and adenine (10 mg) or MPY medium in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30°C for 10 days. After extraction with CHCl₃, the

extract was concentrated in vacuo to afford crude extracts.

Analysis of the metabolites. The crude extract was analyzed by LC-MS with a ZORBAX XDB-C18 column (50 mm x 2.1 mm) at the following condition; Solvent: A/B = 50/50→0/100, 0-15 min; A/B = 0/100, 15-25 min; A/B = 0/100→50/50, 25-26 min; A/B = 50/50, 26-35 min (A: H₂O+0.1% HCOOH, B: CH₃CN+0.1% HCOOH) at a flow rate of 0.2 mL/min with 210 nm detection.

Preterpestacin II isolated from AO-*tpcAB* The crude extracts were purified with silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5 to 1). Purification of partially purified metabolites with HPLC equipped with Wakopak® Navi C18-5 (φ10 x 250 mm) at the conditions (100% acetonitrile at a flow rate of 5.0 mL/min) gave **preterpestacin II** (3.2 mg from 1 L of MPY medium). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -24° (*c* 1.0, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₁O [M-H₂O+H]⁺: 357.3157, found: 357.3188. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 2-1.

Compound 11 isolated from AO-*tpcABCD* The crude extracts were purified with silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 1). Purification of partially purified metabolites with HPLC equipped with Wakopak® Navi C18-5 (φ10 x 250 mm) at the conditions (100% acetonitrile at a flow rate of 5.0 mL/min) gave **11** (1.8 mg from 1 kg of rice medium). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -13° (*c* 0.42, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₃₉O₂ [M-H₂O+H]⁺: 371.2950, found: 371.2989. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 2-1.

Preterpestacin III isolated from AO-*tpcABC* The crude extracts were purified with silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5 to 1). Purification of partially purified metabolites with HPLC equipped with Wakopak® Navi C18-5 (φ10 x 250 mm) at the conditions (100% acetonitrile at a flow rate of 5.0 mL/min) gave **preterpestacin III** (1.2 mg from 1 kg of rice medium). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -15° (*c* 1.0, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₁O₃ [M-H₂O+H]⁺: 389.3056, found: 389.3013. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 2-1.

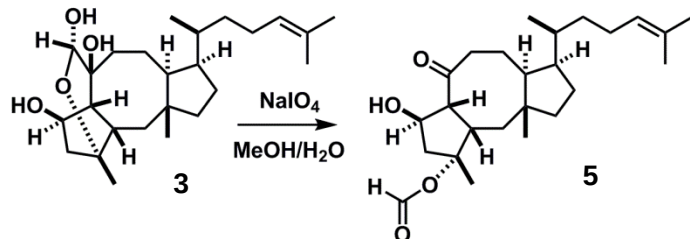
Terpestacin isolated from AO-*tpcABCD* The crude extracts were purified with silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 5 to 1). Purification of partially purified metabolites with HPLC equipped with Wakopak® Navi C18-5 (φ10 x 250 mm) at the conditions (100% acetonitrile at a flow rate of 5.0 mL/min) gave **terpestacin** (11 mg from 1 kg of rice medium). $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -21° (*c* 0.1, MeOH); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₃₉O₄ [M+H]⁺: 403.2848, found: 403.2829. ¹H NMR and ¹³C NMR data (shown in the appendix) are in good agreement with the reported data.³

Betaestacin II isolated from AO-*btcAB* Purification of crude extracts with HPLC equipped with Wakopak® Navi C18-5 (φ10 x 250 mm) at the conditions (30% acetonitrile with 0.1% TFA for 5 min, a linear gradient from 30% to 100% acetonitrile with 0.1% TFA for 10 min and 100% acetonitrile with 0.1% TFA for 10 min at a flow rate of 1.0 mL/min) gave **betaestacin II** (3.5 mg from 30 g of rice medium). $[\alpha]_{\text{D}}^{31}$ +58.3° (*c* 1.0, MeOH); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₃₉O₂ [M-H]⁻: 399.2541, found: 399.2504. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 2-2.

3-7. Chemical conversion of metabolites

3-7-1. Chemical conversion of ophiobolines

Oxidative cleavage of **3**.



To a solution of **3** (5.0 mg, 12.9 μmol) in MeOH (1.0 mL) and H₂O (0.25 mL) was added sodium periodate (25.0 mg, 0.12 mmol), and the mixture was stirred at r.t. for 1 day. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate and the combined organic extracts were washed with sat. NaHCO₃, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated in vacuo. The crude was purified by silica gel column chromatography (hexane/AcOEt = 3) followed by HPLC equipped with Wakopak Navi at the conditions summarized in Table S2 to give **5** (1.1 mg, 2.7 μmol , 21%).

5; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +2^\circ$ (*c* 0.50, CHCl₃); ESI-HR-MS: calcd. for C₂₄H₃₇O [M+H-HCOOH-H₂O]⁺: 341.2844, found: 341.2826. ¹H NMR δ 7.91 (s, 1H), 5.03 (t, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.63 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 9.4 Hz, 6.7 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 14.1 Hz, 7.9 Hz, 1H), 2.63 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.25 (m, 1H), 2.16 (m, 1H), 1.91 (m, 2H), 1.83 (m, 1H), 1.79 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.62 (s, 3H), 1.58 (s, 3H), 1.55 (m, 1H), 1.53 (s, 3H), 1.46 (m, 1H), 1.40-1.41 (m, 2H), 1.28-1.32 (m, 2H), 1.18-1.22 (m, 2H), 1.05 (m, 1H), 0.99 (m, 1H), 0.81 (s, 3H), 0.71 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H); ¹³C NMR δ 214.55, 131.28, 124.69, 160.18, 88.94, 71.31, 60.19, 49.21, 48.53, 46.57, 44.91, 44.77, 43.69, 43.24, 39.64, 37.42, 32.16, 26.14, 25.71, 24.23, 23.45, 21.11, 18.93, 17.63, 16.73.

Acid treatment of ophiobolin C. To a solution of ophiobolin C (100 μg) in MeOH (10 μL) was added to 100 mM phosphate buffer (5 mL, pH 5.0), and the mixture was stirred at 30 °C for 1-3 days. After dilution of the mixture with methanol (5 mL), the solution (20 μL) was directly analyzed by LC-MS at the following condition; solvent: A/B = 50/50 $\rightarrow$ 0/100, 0-15 min; A/B = 0/100, 15-25 min; A/B = 0/100 $\rightarrow$ 50/50, 25-26 min; A/B = 50/50, 26-35 min (A: H₂O+0.1% HCOOH, B: CH₃CN+0.1% HCOOH) at a flow rate of 0.2 mL/min with 210 nm detection.

3-7-2. Chemical conversion of sesterterpenes

Ozonolysis of Bm1, Bm3, and Pb1. Ozone was bubbled through a solution of substrate (**Bm1**; 60 mg, 0.18 mmol) in methanol/CH₂Cl₂ = 1/2 (10 mL) at -78 °C for 30 min. The reaction mixture was then flushed with N₂ for 10 minutes to remove the residual ozone and the solution was treated with NaBH₄ (0.20 g, 5.3 mmol). After an hour, the reaction was quenched with water (10 mL). The residue was extracted with CH₂Cl₂, and the organic phase was washed with saturated aq. NaCl, dried over Na₂SO₄ and concentrated in vacuo. The crude extracts were purified by silica gel column chromatography (hexane/EtOAc = 3). Further purification with HPLC (Wakopak® Navi C18-5 (4.6 x 250 mm), 100 % acetonitrile) gave ozonolysis products (**Bm1-R**; 2.5 mg, 12 μmol , 7 %, **Bm1-L** (1.3 mg, 7.6 μmol , 4 %, epimeric mixture) as colorless oils. Ozonolysis of **Pb1** and **Bm3** was employed in a similar manner: **Pb1** (34 mg, 0.10 mmol) gave **Pb1-R**

(11 mg, 51 μ mol, 51 %) and **Pb1-L** (less than 3 mg, more than 4 diastereomeric mixture) as colorless oils. **Bm3** (4.3 mg, 12 μ mol) gave **Bm3-R**; 1.5 mg, 7.0 μ mol, 58 %) as colorless oils.

Bm1-R: colorless oil, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +3$ (*c* 0.50, CHCl_3); ESI-HR-MS: calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 201.1855, found: 201.1890. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.79 (dd, $J = 10.9$ Hz, 3.3 Hz, 1H), 3.76 (m, 1H), 3.69 (m, 1H), 3.65 (dd, $J = 10.9$ Hz, 7.9 Hz, 1H), 1.88 (dt, $J = 7.5$ Hz, 3.2 Hz, 1H), 1.68-1.79 (m, 4H), 1.48-1.57 (m, 3H), 1.24 (m, 1H), 1.13 (s, 3H), 0.94 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 61.1, 60.3, 50.2, 49.7, 46.3, 43.2, 40.3, 29.2, 28.4, 22.9, 22.7, 22.4.

Bm1-L (epimeric mixture); colorless oil, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +18$ (*c* 1.0, CHCl_3); ESI-HR-MS: calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 173.1542, found: 173.1569. **Bm1-LA** (major isomer); ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.93 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.24-1.51 (m, 6H), 1.20 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 77.9, 68.6, 51.6, 37.9, 34.3, 33.3, 30.7, 24.3, 23.6, 15.7. **Bm1-LB** (minor isomer); ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.93 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 2.21 (m, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.67 (m, 1H), 1.24-1.51 (m, 6H), 1.20 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J = 7.2$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 77.9, 68.2, 51.1, 37.6, 34.3, 33.3, 30.8, 24.3, 23.7, 15.7.

Pb1-R: colorless oil, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -11$ (*c* 1.0, CHCl_3); ESI-HR-MS: calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 215.2011, found: 215.2057. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.64-3.73 (m, 3H), 3.57 (ddd, $J = 10.3$ Hz, 8.4 Hz, 6.6 Hz, 1H), 1.69-1.81 (m, 3H), 1.50-1.62 (m, 4H), 1.36-1.48 (m, 3H), 1.23 (m, 1H), 0.98 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 63.5, 60.2, 50.2, 45.1, 44.1, 44.0, 37.8, 29.5, 28.4, 27.2, 23.2, 22.3, 22.0.

Bm3-R: colorless oil, $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -12$ (*c* 0.15, CHCl_3); ESI-HR-MS: calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{27}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 215.2011, found: 215.1995. ^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 3.65-3.74 (m, 3H), 3.58 (ddd, $J = 10.3$ Hz, 8.4 Hz, 6.6 Hz, 1H), 1.71-1.80 (m, 3H), 1.51-1.63 (m, 4H), 1.37-1.47 (m, 3H), 1.23 (m, 1H), 0.99 (s, 3H), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 63.6, 60.3, 50.2, 45.2, 44.1, 44.1, 37.7, 29.5, 28.4, 27.3, 23.2, 22.3, 22.0.

Acid treatment of sesterfisherol. To a solution of sesterfisherol (18 mg, 0.050 mmol) in acetone (4.0 mL) was added *p*-TsOH (0.10 g, 0.53 mmol) at room temperature, and the mixture was stirred for 10 min. After addition of sat. NaHCO_3 , the mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were concentrated in vacuo. The crude extracts were purified by silica gel column chromatography (hexane) to give **Bm2** (3.9 mg, 0.011 mmol, 22%).

Bm2 (isomeric mixture) synthesized from sesterfisherol; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +29^\circ$ (*c* 0.50, CHCl_3); EI-HR-MS: calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{40}$ $[\text{M}]^+$: 340.3130, found: 340.3122. The NMR data are in good agreement with the above data.

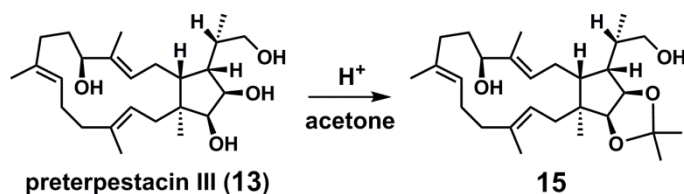
Epoxidation of Bm2. To a solution of **Bm2** isomeric mixture (2.0 mg, 5.9 μ mol) in CH_2Cl_2 (1.0 mL) was added *m*CPBA (5 mg, 29.0 μ mol) at 0°C , and the reaction mixture was stirred for 10 min. After addition of

sat. Na₂SO₃, the reaction mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were concentrated in vacuo. The crude extracts were purified by silica gel column chromatography (hexane). Further purification with HPLC (Wakopak® Navi C18-5 (φ10 x 250 mm), 100% acetonitrile) gave **epoxy-Bm2** (0.6 mg, 1.69 μmol, 29%).

epoxy-Bm2; [α]_D²⁵ +26° (*c* 0.50, CHCl₃); EI-HR-MS: calcd. for C₂₅H₄₀O [M]⁺: 356.3079, found: 356.3065. ¹H NMR and ¹³C NMR data are summarized in Table 1-2.

3-7-3. Chemical conversion of preterpestacin III

Derivatization of preterpestacin III



To a solution of preterpestacin III (1.2 mg, 3.0 μmol) in acetone (1.0 mL) was added *p*-TsOH (0.5 mg) in 0°C and the reaction mixture was stirred for 50 min. After addition of sat. NaHCO₃, the reaction mixture was extracted with EtOAc. The organic layers were concentrated in vacuo. The crude extracts were purified with HPLC (Wakopak® Navi C18-5 (φ4.6 x 250 mm), 100% acetonitrile at a flow rate of 1.0 mL/min) to give acetonide derivative **15** (0.70 mg, 1.6 μmol, 53%). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.23 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.17 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H), 5.12 (brt, *J* = 6.1 Hz, 1H), 4.34 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.30 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.93 (dd, *J* = 3.8 Hz, 10.3 Hz, 1H), 3.59 (dd, *J* = 3.8 Hz, 10.6 Hz, 1H), 3.33 (dd, *J* = 7.8 Hz, 10.6 Hz, 1H), 2.00-2.23 (m, 10H), 1.91 (dd, *J* = 8.8 Hz, 17.0 Hz, 1H), 1.79-1.83 (m, 2H), 1.65 (m, 1H), 1.63 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.57 (s, 3H), 1.50 (s, 3H), 1.32 (s, 3H), 1.14 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.11 (s, 3H).

15; ESI-HR-MS: calcd. for C₂₈H₄₅O₃ [M·H₂O+H]⁺: 429.3369, found: 429.3394. ¹H NMR data is shown in the appendix.

Reference

- ¹ Nozoe, S.; Hirai, K.; Tsuda, K. *Tetrahedron Lett.* **1966**, *20*, 2211-2216.
- ² Wei, H.; Itoh, T.; Kinoshita, M.; Nakai, Y.; Kurotaki, M.; Kobayashi, M. *Tetrahedron*. **2004**, *60*, 6015-6019.
- ³ J. Chan, T. F. Jamison, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10682-10691.

4 章 総括

自然界において、植物や微生物はポリケタイドやアルカロイド、テルペノイドなど多種多様な二次代謝産物を生産している。特に医薬品として用いられるような高付加価値な天然物の量的供給において、合成生物学的手法を用いた合成法は有効であると考えられる。近年、DNA シーケンス解析技術の向上や汎用宿主の開発などを背景として、バイオインフォマティクスに基づく天然物生合成遺伝子の同定や生物活性天然物の酵素合成が可能になってきている。機能未知の二次代謝産物生合成遺伝子を探索し、それを強制発現させることにより物質生産を行う手法はゲノムマイニングと呼ばれ、新規天然物の取得において重要な手法である。

テルペンは植物や微生物の生産する主要な二次代謝産物のひとつであり、その生合成機構は骨格構築と酸化修飾の二段階に大別される。テルペノイドの骨格合成酵素の中にはプレニル基転移ドメインと環化ドメインが融合した二機能性環化酵素が存在し、2007 年に *fusicoccadiene* 合成酵素 PaFS が発見されて以降、そのホモログの機能解析が急速に進められてきた。しかしこれまでは、標的遺伝子は PaFS などとの相同性のみに基づいて選択されており、その生成物や反応機構をあらかじめ推定することはできなかった。また、酸化修飾を含む生合成経路の全容が解明されているジテルペン(C20)は *aphidicolin* などの数例が知られているのみで、セスタテルペン(C25)に関してはほとんど解明されていなかった。そこで本研究では、糸状菌異種発現系を利用した新規テルペン環化体のゲノムマイニングおよびその酸化修飾による生物活性天然物の異種生産に着手した。

1 章では、二機能性テルペン環化酵素の系統樹解析に基づくクレード特異的なゲノムマイニングを行った。糸状菌 *Bipolaris maydis* および *Phoma betae* からクレード A に属する 4 種の環化酵素 BmTS1, 2, 3, Pb1 が見出され、その機能解析により 4 種の新規生成物 Bm1, Bm2, Bm3, Pb1 を取得した(Fig. 4-1)。これらは、同じクレード A に属する NfSS の生成物 *sesterfisherol* と類似の生合成経路から分岐して生じたものであると推定された。その初発の環化機構は、クレード B に属する環化酵素における機構とは異なっていたことから、環化酵素のアミノ酸配列相同性と環化機構との間には関連性があることが示された。

さらに 1 章では、NfSS に対する変異導入実験により *sesterfisherol* 生合成経路の同定を試みた。共同研究者である佐藤博士によって、*sesterfisherol* 生合成において環形成の順序が異なる 2 通りの経路(Path A, B)が計算化学的に推定された。NfSS において化合物近傍に位置すると予想された芳香族アミノ酸残基に対し変異を導入したところ、Path A から分岐したと思われる生成物 NFM-1, 2 が得られた(Fig. 4-1)。このことから、*sesterfisherol* 生合成経路の同定に成功し、セスタテルペン生合成経路および中間体の推定において計算化学的手法が有効であることが示された。

これらの知見から、アミノ酸配列相同性に基づく新規テルペノイドの探索手法を提案した。本手法により、新規あるいは既知の天然物を与える可能性のある環化酵素の推定や、構造類似天然物の集中的合成が可能になると考えられる。さらに、計算化学的手法を組み合わせることにより精度の高い生合成経路の推定や生合成中間体の同定が可能になると考えられる。

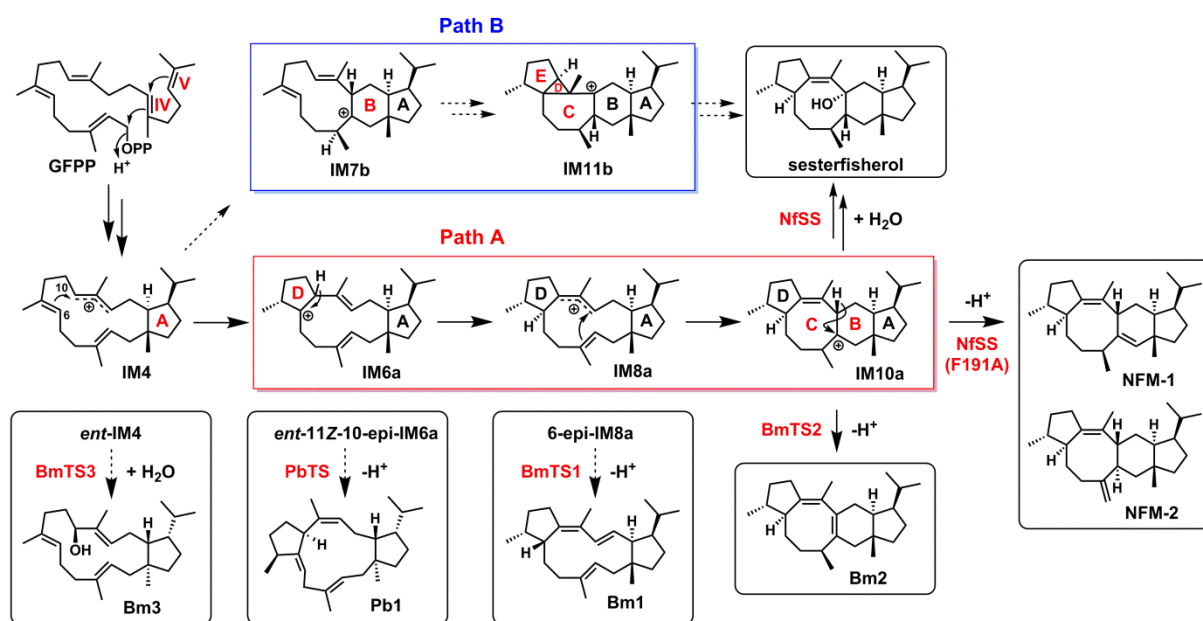


Fig. 4-1 クレード A に属する環化酵素が与える生成物の推定生合成経路

2 章では、二機能性環化酵素の与える環化体の酸化修飾により生物活性天然物の異種生産を試みた。BmTS3, Pb1 の周辺遺伝子を探索し、見出された酸化酵素遺伝子を環化酵素遺伝子と共発現させることにより、既知天然物 *terpestacin* および新規天然物 *betaestacin* の取得に成功した (Fig. 4-2)。また、*ophiobolin F* の酸化修飾により *ophiobolin* 類縁化合物の異種生産を試みた結果、*ophiobolin* 非生産菌である *A. clavatus* 由来の *oblB_{Ac}* (P450) は 4 種の新規生成物を与えたのに対し、*ophiobolin* 生産菌由来の *oblB_{Bm}*, *oblB_{Ev}* は既知天然物 *ophiobolin C* を与えた (Fig. 4-2)。

以上の実験により、既知天然物の取得、新規天然物の取得、類似遺伝子クラスターからの想定外な新規天然物の取得という 3 通りのゲノムマイニングの例が示された。*Phoma betae* と *Colletotrichum orbiculare* から見出された *betaestacin* 生合成クラスター中の P450 (相同性 36-38%) が異なる生成物を与えたことから、ホモログどうしが同じ機能を持つかどうか判断する上でおよそ 40% という相同性が基準となるのではないかと考えられた。一方で、*ophiobolin* 生合成遺伝子クラスター中の *oblB_{Ac}* と *oblB_{Bm/Ev}* (相同性 67-68%) のように、高い相同性を示しながらも異なる機能をもつ例もあることが示された。

1 章にて提唱したゲノムマイニング手法と、2 章で用いた環化酵素と修飾酵素の共発現手法を組み合わせることで、新規生物活性天然物の網羅的合成が可能になるのではないかと考えている。

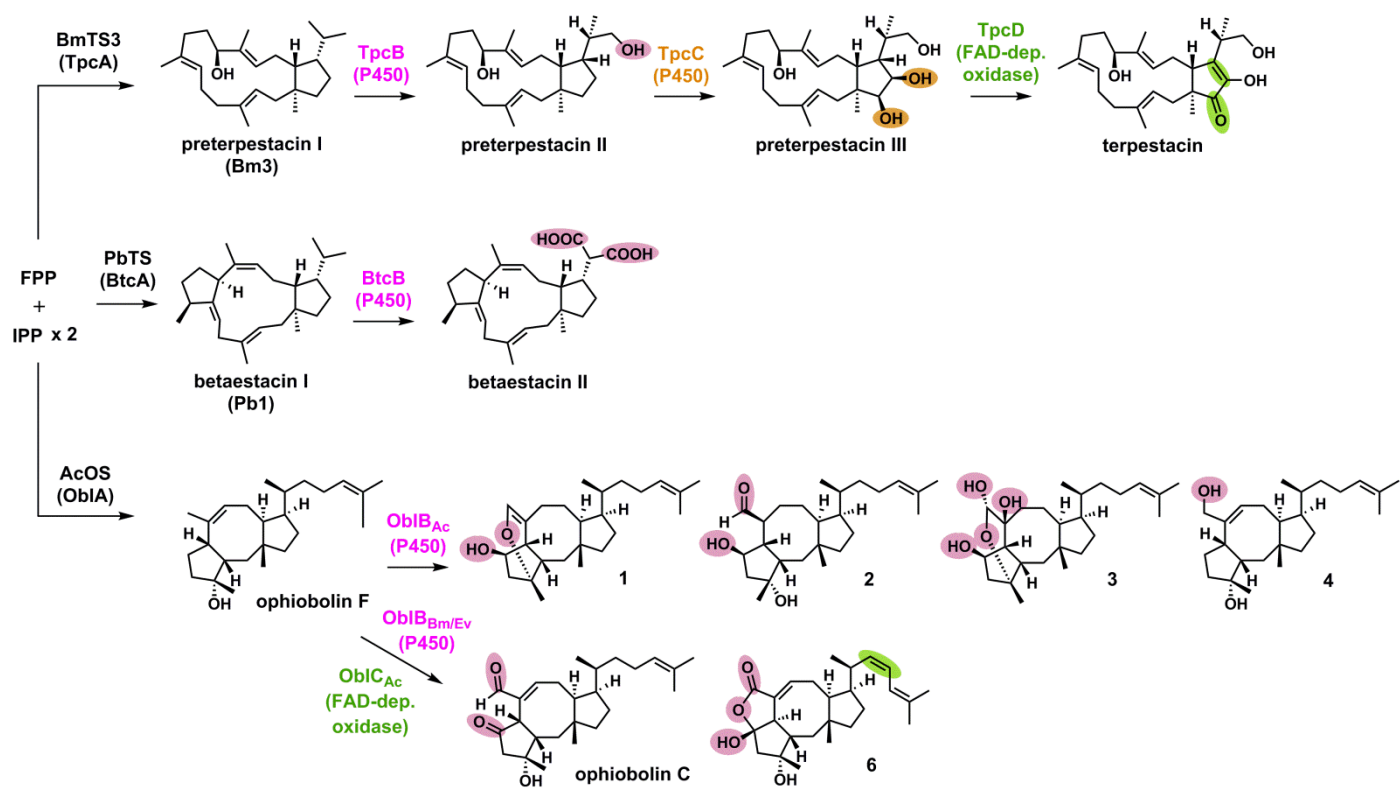


Fig. 4-2 環化体の酸化修飾による天然物生合成

謝辞

本学での研究を行うにあたりまして、日々ご指導ご鞭撻を賜りました及川英秋教授、南篤志准教授、劉成偉助教、尾崎太郎助教、そして東京農工大学大学院工学研究院の大栗博毅教授に心より感謝申し上げます。

本研究に際しまして、共同研究として DFT 計算を行って頂いた東京大学大学院薬学研究科の内山真伸教授、佐藤玄博士、ドッキングシミュレーションを担当して頂いた鳥取大学大学院工学研究科の永野真吾教授に多大なるご協力を頂きましたことを深く感謝申し上げます。また、PbTS や betaestacin 生合成遺伝子クラスターの機能解析を行って頂いた高磊・工藤洸星両氏に感謝いたします。

NfSS のホモロジーモデリングを行って頂きました東京大学生物生産工学研究センターの西山真教授、葛山智久准教授、富田武郎助教に厚く御礼申し上げます。

化合物の構造決定に際しまして、VCD 測定を行って頂きました北海道大学院先端生命科学研究科の門出健次教授、谷口透助教、NMR 測定を依頼させて頂いた北海道大学農学部の福士江里博士に深く感謝いたします。

ophiobolin 研究や二機能性テルペン環化酵素の探索に用いた *B. maydis* を提供していただいた鳥取大学農学部の児玉基一郎教授、*E. varicolor* のゲノム DNA を提供していただいた岩手医科大学の藤井勲教授に深く感謝いたします。