



Title	糸状菌由来の代表的な天然物群生合成における未解決課題の解明に関する研究
Author(s)	瀧野, 純矢
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15195号
Issue Date	2022-09-26
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15195
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90505
Type	doctoral thesis
File Information	TAKINO_Junya.pdf



糸状菌由来の代表的な天然物群生合成
における未解決課題の解明に関する研究
(Studies on skeletal construction mechanisms in the
biosynthesis of fungal natural products)

北海道大学大学院 総合化学院 有機反応論研究室
瀧野 純矢
2022年 博士論文

目次

第 1 章 序論

- 1-1. 糸状菌が生産する二次代謝産物の生合成
 - 1-2. 糸状菌天然物生合成遺伝子の異種発現による機能解析
 - 1-3. 本研究の目的
- 参考文献

第 2 章 植物ホルモンアブシジン酸生合成研究

- 2-1. 緒言
 - 2-1-1. 植物ホルモンアブシジン酸
 - 2-1-2. アブシジン酸生合成研究の背景
 - 2-2. 糸状菌におけるアブシジン酸生合成
 - 2-2-1. BcABA3 の機能解析- *in vitro*-
 - 2-2-2. BcABA3 の機能解析 -*in vivo*-
 - 2-3. 新奇テルペン環化酵素 BcABA3 の推定環化機構
 - 2-3-1. BcABA3 の触媒する環化反応における中間体の特定 -*allofarnesene*-
 - 2-3-2. BcABA3 の触媒する環化反応における中間体の特定 - β -*farnesene*-
 - 2-3-3. 重水素標識 FPP を用いた反応機構の解析
 - 2-3-4. BcABA3 の推定環化機構
 - 2-3-5. 速度論解析
 - 2-4. BcABA3 の推定活性部位
 - 2-5. 考察
 - 2-6. 糸状菌における ABA 生合成経路
 - 2-7. まとめ
- 参考文献

第 3 章 糸状菌還元型ポリケタイド合成酵素の機能解析

- 3-1. 緒言
 - 3-1-1. 糸状菌由来ポリケタイド天然物
 - 3-1-2. ポリケタイド合成酵素
 - 3-1-3. HR-PKS の立体配置制御
- 3-2. phialotide 生合成における HR-PKS の立体制御
 - 3-2-1. phialotide 生合成遺伝子クラスターの探索
 - 3-2-2. phialotide 生合成遺伝子クラスターの異種発現

- 3-2-3. ポリケタイド鎖の解離
 - 3-2-4. prophialotide A の絶対立体配置
 - 3-3. phomenoic acid・ACR-toxin 生合成における HR-PKS の立体制御
 - 3-3-1. phomenoic acid 生合成遺伝子クラスターの異種発現
 - 3-3-2. prophomenolactone の絶対立体配置
 - 3-3-3. ACR-toxin 生合成遺伝子の異種発現
 - 3-4. 立体配置制御則
 - 3-4-1. 立体配置制御則の提唱
 - 3-4-2. ポリヒドロキシポリケタイドの分類
 - 3-4-3. ポリヒドロキシポリケタイドの立体配置制御について
 - 3-4-4. 立体配置制御の適用範囲の検証
 - 3-4-5. 立体配置制御則の例外
 - 3-5. まとめ
- 参考文献

第4章 実験部

- 4-1. Chapter 2
 - 4-2. Chapter 3 [Synthetic study on standards]
 - 4-3. Chapter 3 [Heterologous expression study]
- 参考文献

第5章 総括

謝辞

1章 序論

1-1. 糸状菌が生産する二次代謝産物

生物の体内では、アミノ酸や脂肪酸、糖など、生物に普遍的に存在し、生命維持に欠かせない一次代謝産物が生合成されている。これに対して、二次代謝産物には、外敵から身を守るための毒素や、昆虫などを誘引するフェロモン、他生物種を警戒させる色素などが存在する。これらは特定の生物に偏在し、生命の維持には直接関係しないが、様々な目的のため、一次代謝産物を原料として生合成される。二次代謝産物は、メバロン酸やメチルエリスリトール-4-リン酸由来のイソプレン単位を原料とするテルペン、酢酸由来のポリケタイド、アミノ酸由来のペプチドやアルカロイドと、原料となる一次代謝産物によって分類される [1]。

カビやキノコに代表される糸状菌が生産する二次代謝産物には、複雑な骨格を持ち、顕著な生理活性を示す化合物が数多く存在する。コレステロール低下剤 **lovastatin** (ポリケタイド)や抗生物質 **penicillin** 類 (非リボソーム依存型ペプチド)、植物ホルモン **gibberellin** 類 (テルペン)はその代表例である (図 1-1-1)。このように顕著な活性をもつ糸状菌天然物は、医薬品や農薬のリード化合物のソースとして期待され、探索研究が活発に行われてきた。

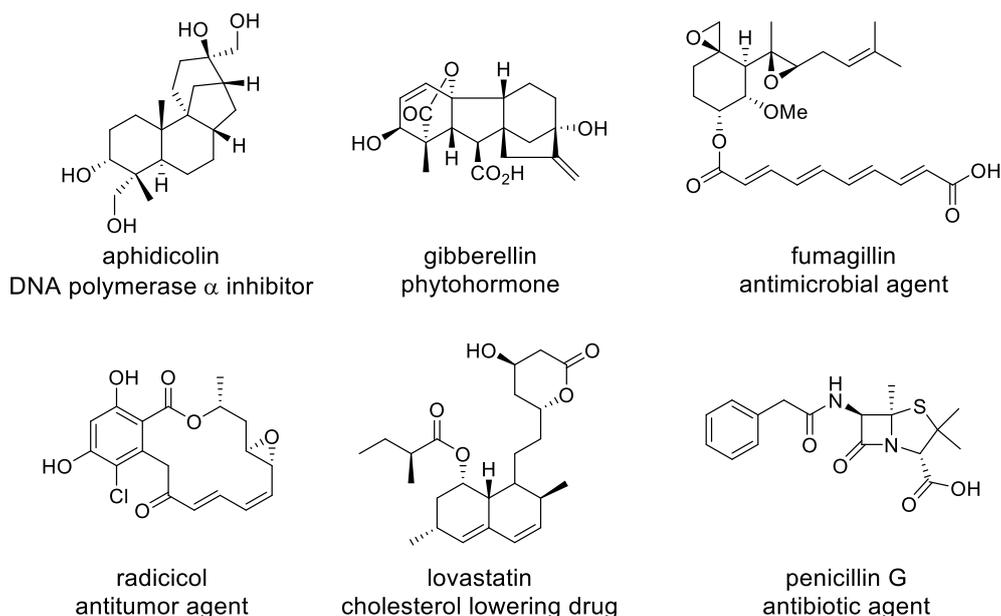


図 1-1-1. 糸状菌が生産する二次代謝産物

また、「化学合成では多段階を要する天然物の複雑な骨格を、生物はどのように構築しているのか?」という問いに答えるべく、多くの化学者が長年に渡って研究を行ってきた。天然物の生合成に利用されている化学反応を触媒する「酵素」を扱った研究により、骨格構築酵素の作用により母骨格が形成された後、修飾酵素が作用することで天然物が合成されることがわかってきた。以下に、本研究で対象とするテルペンとポリケタイドに関わる骨格構築酵素の概要を記す

<テルペン環化酵素>

テルペン環化酵素は、イソペ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)が連結したファルネシルニリン酸 (FPP)やゲラニルゲラニルニリン酸 (GGPP)などのアキラルな鎖状前駆体を原料とし、キラルな環状化合物を形成する。テルペン環化酵素は、ピロリン酸の脱離により生じたカルボカチオンから、水素移動、骨格転移などの反応を触媒することで環化体を与える。単一の活性部位中で進行する多段階反応の厳密制御が、テルペン環化酵素の特徴である。その反応機構は、主に、同位体標識前駆体を用いた実験や部位特異的な変異実験などにより、合理的に推定されている [2]。最近では、密度汎関数 (DFT)法を活用した反応機構の推定なども行われるようになってきた [3]。

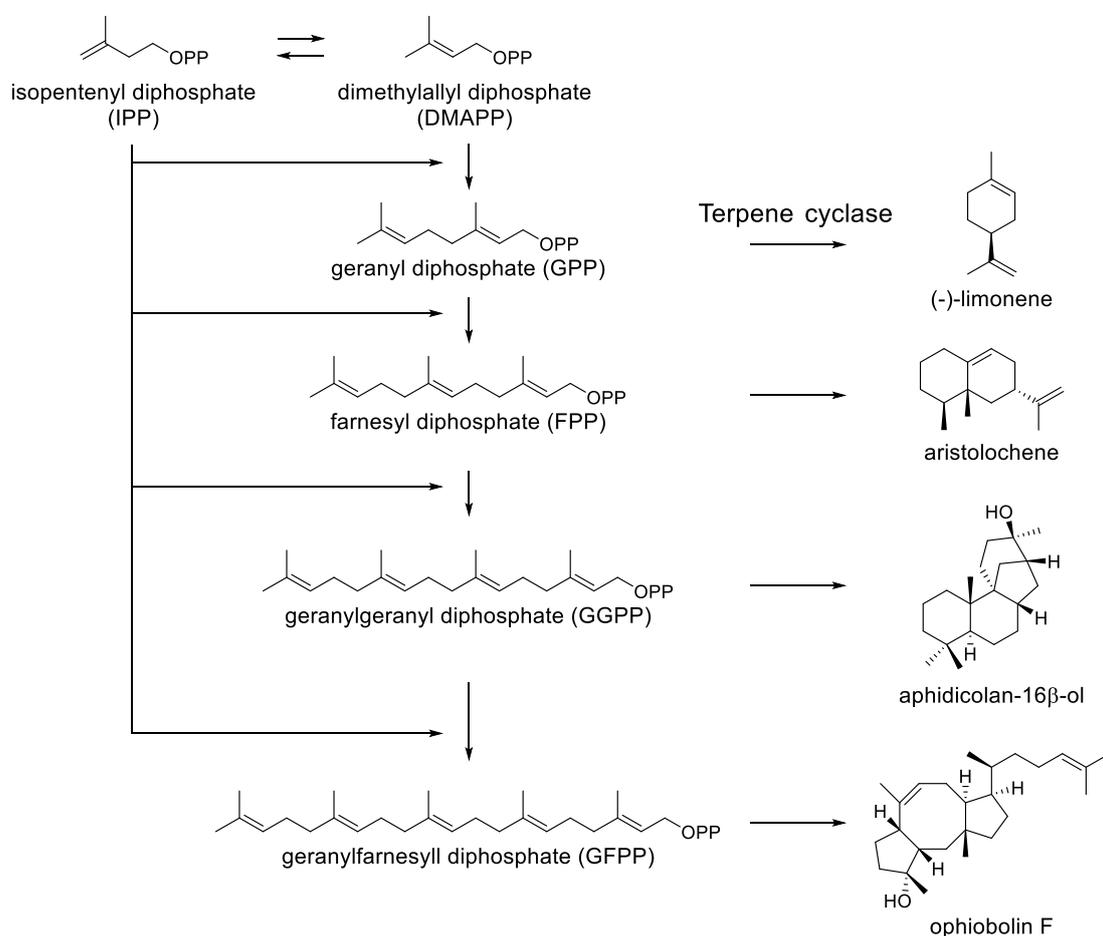


図 1-1-2. テルペン環化酵素の反応

本酵素は、カルボカチオンの生成機構の違いにより、**class I** と **class II** に分類される。前者では **DDxxD** モチーフのような金属結合モチーフと結合した二価金属イオンがニリン酸を活性化し、脱離することでカルボカチオンを発生させる。後者では、**DxDD** モチーフをプロ

トン源として二重結合がプロトン化することでカルボカチオンが発生する [4]。こうした従来型の酵素に加えて、**Class I, II** の環化酵素が連続的に働く酵素や、従来型と異なるモチーフを有する **UbiA** タイプのプレニル基転移酵素 [5]、セスクアテルペン合成酵素 [6] が見つかった。信頼性の高い発現系の利用は、こうした新しいタイプの環化酵素の発見に大きく寄与してきた。実際、当研究室では、後述する麴菌異種宿主発現系という信頼性の高いシステムを活用することで、世界に先駆けて、炭素数 25 のセスタテルペンを合成する二機能性テルペン環化酵素・**sesterfisherol** 環化酵素を発見した。また、類縁酵素の集中的な解析により、**sesterfisherol** への反応過程で生じると考えられたカチオン性中間体から派生した環化体の取得に成功した。この反応機構は、**DFT** 計算や標識前駆体を用いたラベル実験により実証された [7]。

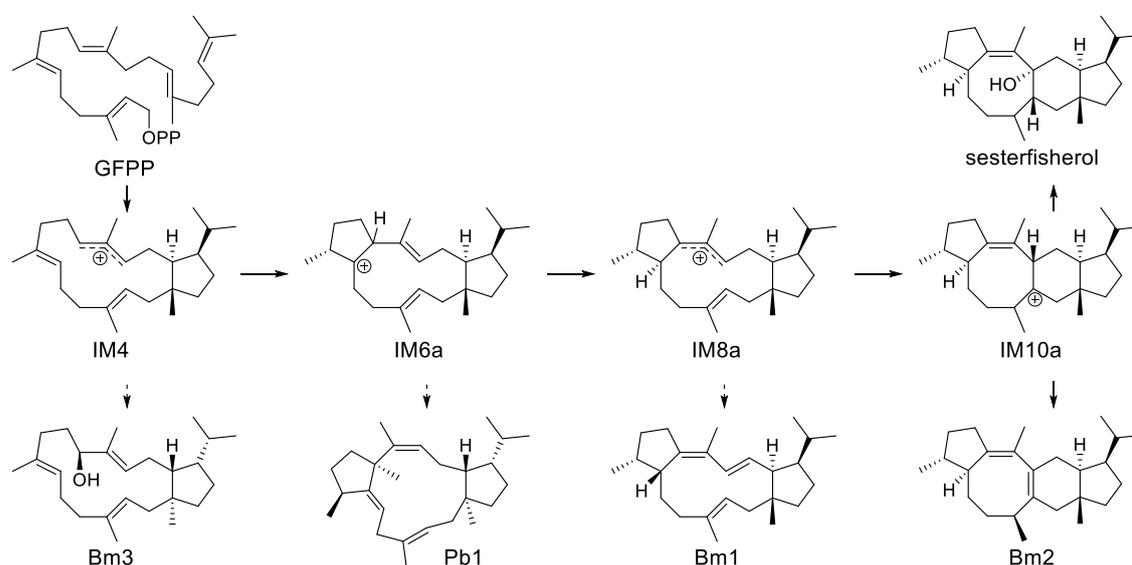


図 1-1-3. 当研究室で解析された二機能性テルペン環化酵素の反応機構

<ポリケタイド合成酵素>

ポリケタイド合成酵素 (**PKS**)は、脂肪酸合成酵素と類似した巨大酵素であり、基質の認識や縮合、還元などを触媒する機能単位 (ドメイン)が連なったモジュールによって構成される (図 1-1-4)。ポリケタイド合成酵素は、マロニル **CoA** やアセチル **CoA** を原料とし、各ドメインが順番に機能することで炭素鎖を伸長する (図 1-1-5)。

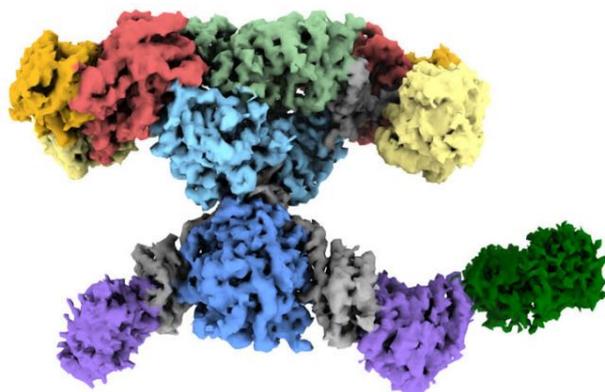


図 1-1-4. HR-PKS (LovB, C)の Cryo-EM 密度マップ (3.60 Å) [8]より引用
(LovB: 335 kDa, LovC: 39.5 kDa)

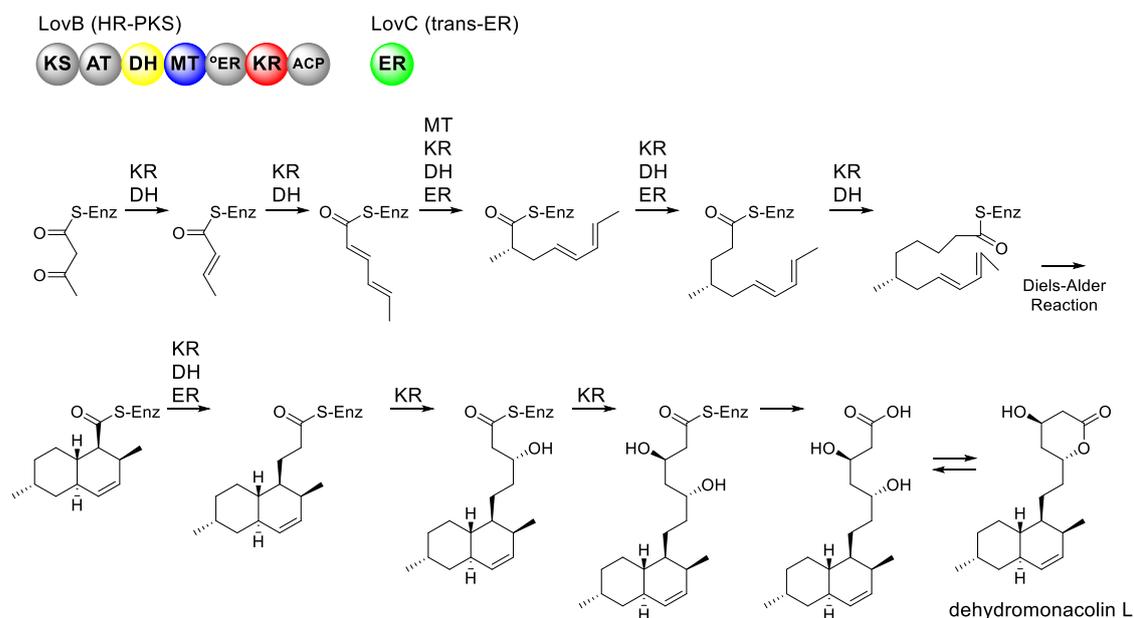


図 1-1-5. ポリケタイド合成酵素の反応

ポリケタイド合成酵素の機能解析における課題は、1) PKS と共有結合した状態で炭素鎖伸長反応が進行するため、反応過程で生成する中間体の取得には困難を伴うこと、2) 巨大酵素であるがゆえに、酵素の取り扱いが難しく、組み換え酵素を用いた *in vitro* の解析例が限定的であることが挙げられる。

当研究室で開発した麴菌異種発現系は、PKS の解析においても有効であり、これまでに、**betaenone**、**didymellamide**、**solanapyrone** など PKS や PKS と非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS) が連結した PKS-NRPS によって生合成される天然物の異種生産に成功し、生合成経路を明らかにしてきた [9] (図 1-1-6)。

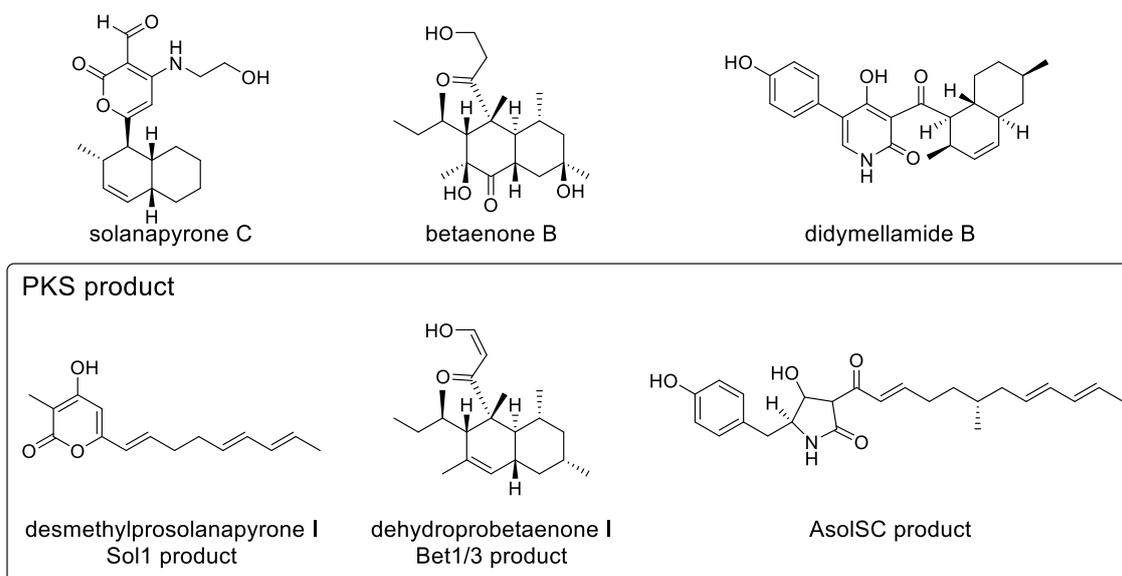


図 1-1-6. 当研究室で解析された PKS と生成するポリケタイド骨格および天然物の構造

1-2. 糸状菌天然物生合成遺伝子の異種発現による機能解析

生合成遺伝子の異種発現宿主として、古くから大腸菌や酵母が用いられてきた。両者は、遺伝子操作方法が確立されており、発現ベクターも豊富である。また、酵母は大腸菌と異なり膜タンパク質の発現も可能であるという利点も備えている。しかしながら、糸状菌由来の遺伝子の異種発現においては、糸状菌とスプライシング機構が異なるために、大腸菌や酵母を用いた発現系では、イントロンを含むゲノム DNA 配列を用いることができない。そのため、1) mRNA より逆転写した cDNA を調製する必要である、2) 正しくスプライシングされた mRNA を得るためには、適切な培養条件の検討が必要である、3) 機能未知遺伝子では、取得した配列が正しくイントロンが除去された配列であるか否かを判断することが難しい、という問題がある。

大腸菌や酵母を用いた従来法の問題点を補完し、解決できる糸状菌由来遺伝子の異種発現手法として、*Aspergillus oryzae* や *Aspergillus nidulans* を宿主とした麹菌異種発現系も開発されてきた。当研究室では主に麹菌 *A. oryzae* を異種発現宿主として用いてきた。麹菌異種発現系の利点を以下にまとめる。

1) ゲノム DNA 配列を直接導入可能

麹菌が属する子囊菌由来の遺伝子であれば、イントロンを含んだ gDNA 配列が正しく転写・スプライシング・翻訳される。そのため、mRNA の調製などを行うことなく、注目する遺伝子を解析できる。加えて、従来法では困難だった機能未知遺伝子を強制発現することで新しい化合物を取得することもできる。

2) 複数遺伝子の導入による天然物の異種宿主生産が可能

一度に複数の遺伝子を同時に発現させることで、天然物の異種宿主生産が可能である。これまでに当研究室では、**ophiobolin F [10]**や **penitrem A [11]**などのテルペノイド、**betaenone [9]**などのポリケタイド、**ustiloxin B [12]**などの RiPPs の異種宿主生産を達成しており、天然物の種類に依存しない汎用性を持つことを明らかにしてきた。また、担子菌由来生合成遺伝子の cDNA を異種発現し、**pleuromutilin [13]**の全生合成を達成したことから、異種発現可能な生物種の範囲も広がっている。最終産物のみならず、生合成中間体も取得できるため、遺伝子の導入前後の構造変化から、導入した遺伝子の機能を明らかにできる。

3) 構造解析に十分な量の化合物を生産可能

A. oryzae はアミラーゼ遺伝子を発現させるための強力なプロモーター **PamyB** を有し、1 リットルの培養で、数 g 単位でアミラーゼを生産できるほどタンパク質生産能力に優れている。そのため、誘導プロモーター制御下に外来遺伝子を導入するだけで、基質供給系の増強など、特別な操作をしないで **100 mg/L** ほどの構造解析に十分な量の化合物を生産できる。

4) 導入遺伝子に無関係な余計な代謝産物を合成しない

細胞という複雑系での異種宿主生産であるにも関わらず、生成した代謝産物は細胞内のほか酵素による反応を受けることなく、細胞内外で蓄積する。そのため、蓄積した代謝産物の化学構造を決めることで、導入した遺伝子の機能を推定できる。

5) 酵素の働きを補助する酵素や毒性を回避する機能を備えている

P450 などの修飾酵素では、対応する還元酵素による電子の供給が必要であるが、麹菌内在性の還元酵素の基質受容能が高いために、別途、還元酵素を導入することなく修飾酵素が機能する。そのため、**A. oryzae** を利用した **P450** の異種発現・機能解析が多数報告されるようになってきた [14]。また、トランスポーターが多く、外来遺伝子のはたらきにより毒性のある化合物が生産された場合にも耐性を示すことが多い。

一方、麹菌異種宿主発現系の欠点は、1) 遺伝子導入に使用可能なマーカーが少ないこと、2) 多くの薬剤に耐性を示すため、形質転換体のスクリーニングに適さない薬剤が多いこと、3) 遺伝子長が大きくなると遺伝子導入効率が悪くなり、スクリーニングに手間がかかることなどが挙げられる。しかし、これらの問題は、当研究室で発見したホットスポット (=導入遺伝子が **100%** 発現する領域)への選択的な遺伝子導入”ホットスポットノックイン法”によって解決された。また、本手法では、東京大学で開発されたリサイクルシステム (**cas9** 発現用プラスミドを形質転換体から脱落可能なシステム)を利用しているため、同じマーカー

を繰り返し利用することができる。本手法を用いることによって、従来スクリーニングに手間のかかっていた DNA サイズの大きな遺伝子や多数の遺伝子の一挙導入による機能解析が効率よく達成できるようになった。実際に、erinacine [15]や cyclochlorotine [16]などの生合成解析が行われた。

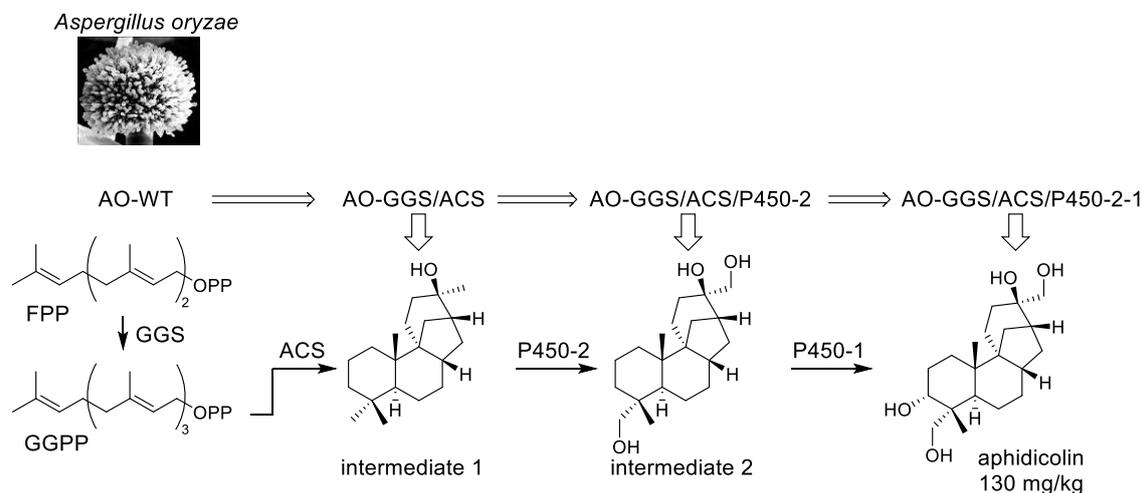


図 1-2-1. 麹菌異種発現系による aphidicolin の生合成解析

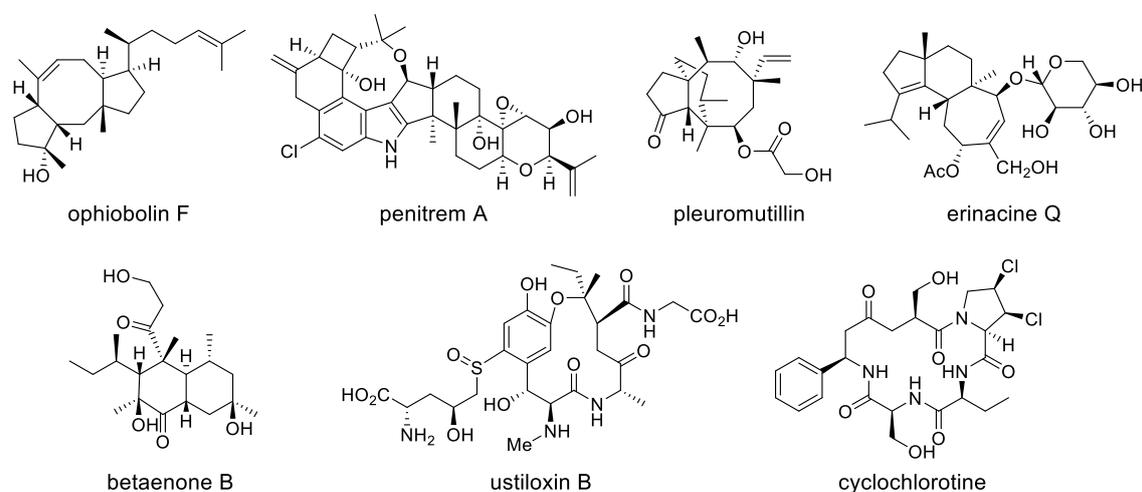


図 1-2-2. 麹菌異種発現系によって生合成解析を達成した天然物

1-3. 本論文の目的

糸状菌由来天然物の生合成における骨格構築酵素は、多段階反応を厳密に制御して複雑な炭素骨格を構築する。こうした酵素の機能同定・機能解析には、大腸菌・酵母・麹菌といった信頼性の高い発現系が有効である。本論文では、これらの発現系を組み合わせることで、糸状菌生合成における未解決課題を解決することに成功した。

2章では、植物ホルモンアブシジン生合成研究として、糸状菌におけるアブシジン酸生合成の最大の謎であった骨格構築酵素を発見し、アブシジン酸生合成の全容解明を達成した。また、発見した新規テルペン環化酵素の環化機構、活性部位の推定も行った。

3章では、糸状菌還元型ポリケタイド合成酵素の機能解析として、繰り返し機能する各ドメインがもつ立体選択性について研究した。ポリケタイド合成酵素の異種発現によるポリケタイド鎖の単離・構造決定により、立体配置制御の規則を提唱した。

参考文献

- [1]: Dewick, P. M., *Medicinal Natural Product A Biosynthetic Approach* 3rd Edition
- [2]: Jeroen S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 87.
- [3]: H. Sato, K. Teramoto, Y. Masumoto, N. Tezuka, K. Sakai, S. Ueda, Y. Totsuka, T. Shinada, M. Nishiyama, C. Wang, T. Kuzuyama, M. Uchiyama, *Scientific Reports*, **2016**, 5, 18471.
- [4]: D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2006**, 106, 3412.
- [5]: W. Cheng, W. Li, *Science*, **2014**, 343, 878.
- [6]: M. Fujihashi, T. Sato, Y. Tanaka, D. Yamamoto, T. Nishi, D. Ueda, M. Murakami, Y. Yasuno, A. Sekihara, K. Fuku, T. Shinada, K. Miki, *Chem. Sci*, **2018**, 9, 3754.
- [7]: H. Sato, K. Narita, A. Minami, M. Yamazaki, C. Wang, H. Suemune, S. Nagano, T. Tomita, H. Oikawa, M. Uchiyama, *Sci. Rep.* **2018**, 8, 2473.
- [8]: J. Wang, J. Liang, L. Chen, W. Zhang, L. Kong, C. Peng, C. Su, Y. Tang, Z. Deng, Z. Wang, *Nature Communications*, **2021**, 12, 867.
- [9]: a) T. Ugai, A. Minami, R. Fujii, M. Tanaka, H. Oguri, K. Gomi, H. Oikawa, *Org. Lett.* **2015**, 17, 5658. b) T. Ugai, A. Minami, K. Gomi, H. Oikawa, *Tetrahedron Lett.* **2016**, 57, 2793. c) R. Fujii, T. Ugai, H. Ichinose, M. Hatakeyama, T. Kosaki, K. Gomi, I. Fujii, A. Minami, H. Oikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, 80, 426.
- [10]: R. Chiba, A. Minami, K. Gomi, H. Oikawa, *Org. Lett.* **2013**, 15, 594.
- [11]: C. Liu, K. Tagami, A. Minami, T. Matsumoto, J. C. Frisvad, H. Suzuki, J. Ishikawa, K. Gomi, H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 5748.
- [12]: Y. Ye, A. Minami, Y. Igarashi, M. Izumikawa, M. Umemura, N. Nagano, M. Machida, T. Kawahara, K. Shin-ya, K. Gomi, H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 8072.
- [13]: M. Yamane, A. Minami, C. Liu, T. Ozaki, I. Takeuchi, T. Tsukagoshi, T. Tokiwano, K. Gomi, H. Oikawa, *ChemBioChem*, **2017**, 18, 2317.
- [14]: X. Zhang, J. Guo, F. Chenga, S. Li, *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 38, 1072.
- [15]: C. Liu, A. Minami, T. Ozaki, J. Wu, H. Kawagishi, J. Maruyama, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 39, 15519.
- [16]: Y. Jiang, T. Ozaki, C. W. Liu, Y. Igarashi, Y. Ye, S. Tang, T. Ye, J. Maruyama, A. Minami, H. Oikawa, *Org. Lett.* **2021**, 23, 7, 2616.

2章 植物ホルモンアブシジン酸生合成研究

2-1. 緒言

2-1-1. 植物ホルモンアブシジン酸

植物ホルモンは、種の違いにかかわらず植物に共通に存在する有機化合物であり、きわめて低い濃度域 (0.01~1 μM) で、成長・分化及びその他の生理過程を調節する物質である。1970 年以前から知られている植物ホルモンは、オーキシシン (auxin)、ジベレリン (gibberellin)、サイトカイニン (cytokinin)、エチレン (ethylene)、アブシジン酸 (abscisic acid) の 5 種類である。(図 2-1-1) [1]。

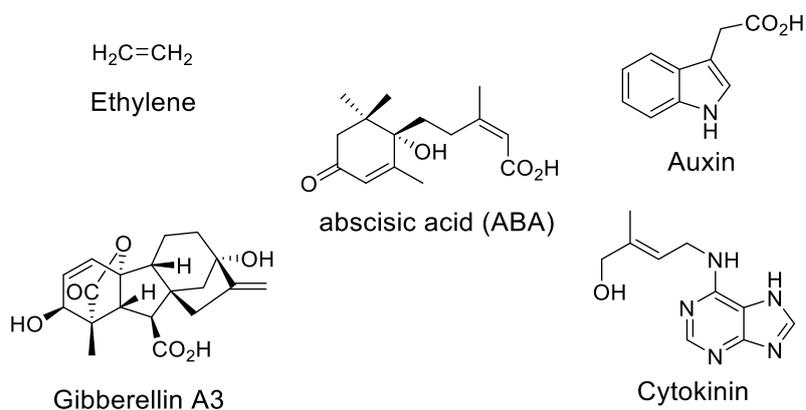


図 2-1-1. 代表的な植物ホルモンの化学構造

アブシジン酸 (ABA, 2-1)は、1961 年に Liu らによって、ワタの葉と果実の離脱を促進する物質として、ワタの葉柄から単離された化合物である [2]。「その後の解析から、器官離脱だけではなく気孔の閉鎖、種子の成熟や休眠にかかわることが明らかにされ、特にストレス応答と密接な関係があるストレスホルモンであることが示された」([3]より引用) (図 2-1-2)。このような機能から、ABA 含有肥料が乾燥・低温・傷害からの保護、果実の生長・発色の促進に有効であることが報告されている [4]。実際に、米国ではトマト、ブドウといった野菜・果実類の肥大や着色促進剤、発芽時期の調整剤として農業利用されている。また、将来的には砂漠のような乾燥地域などでの緑化や農業への利用が期待される。

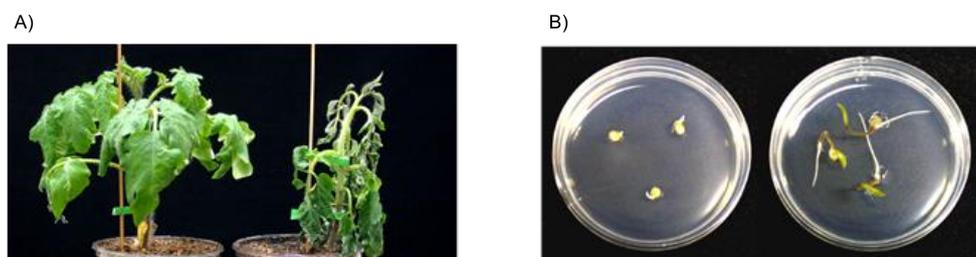


図 2-1-2. ABA の機能; A) 乾燥条件下で気孔の閉鎖 B) 発芽の制御 (左 ; 通常の植物, 右 ; ABA をつくりえない植物) 宇都宮大学 岡本昌憲先生よりご供与

ABA は種子植物だけでなく、シアノバクテリア、藻類、コケ、シダ、さらには海綿、ヒド
 ラ、原虫、哺乳類など動物の細胞からも検出されている [5]。また、菌類では、植物感染性
 の *Cercospora* 属や *Botrytis* 属などが ABA を生産する [6]。植物病原菌における ABA の役
 割としては、孢子からの発芽や、付着基の形成を加速させることに加え、宿主植物のホルモ
 ン作用を攪乱することで侵入を容易にすることなどが報告されている [7]。実際、ABA 生合
 成系を破壊した株では植物への感染力が消失する [8]。

2-1-2. アブシジン酸生合成研究の背景

アブシジン酸の生合成経路は、植物と糸状菌で異なることが知られている。種子植物では、 β -carotene を経由したカロテノイド経路が報告されている。 β -carotene から生合成される 9-cis-zeaxanthin は、zeaxanthin oxidase, neoxanthin synthase (NSY), dioxygenase (NCED) の作用により xanthoxin へと変換される。次いで、xanthoxin に対して、6 員環上および末端アルデヒドの酸化が進行することで ABA が生合成される (図 2-1-3) [9]。コケ・シダでも同様の経路で ABA が生合成されると考えられている [5]。

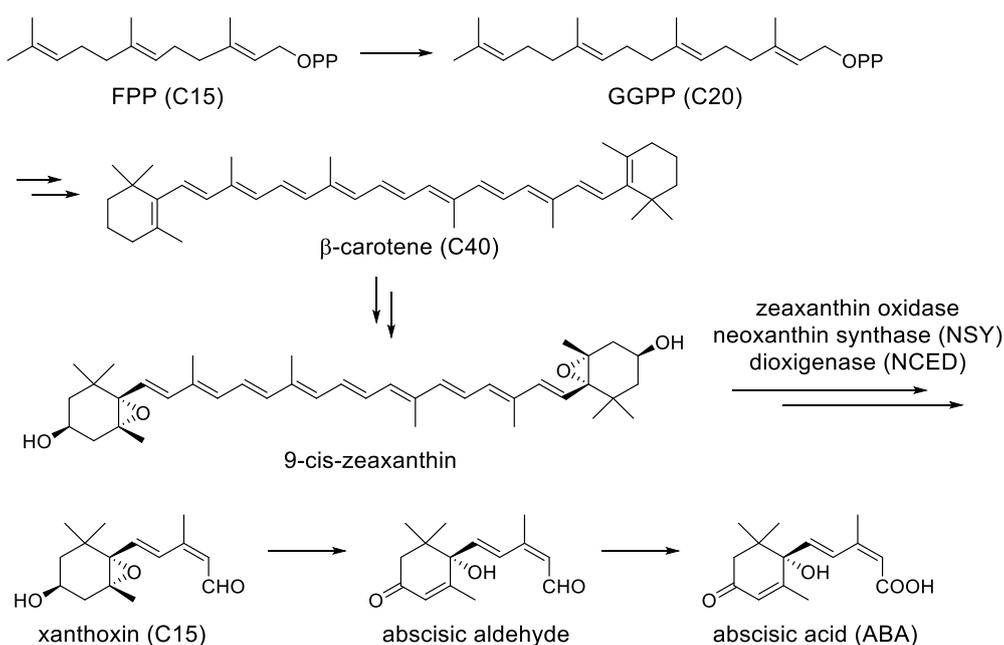


図 2-1-3. 種子植物でのアブシジン酸生合成経路 (カロテノイド経路)

一方、糸状菌での生合成経路は同位体標識実験により推定されているのみであった。灰色かび病菌 *Botrytis cinerea* では、dihydro-ABA (**2-5**) (1986年) [10]、グルコース (2000年) [11]、 α -ionylideneethane (**2-2**) および allofarnesene (**2-9**) (2004年) [12] の標識体の投与実験が行われた。その結果、植物とは異なり、メバロン酸経路によって生合成されたファルネシル二リン酸 (FPP) が **2-9** を経て **2-2** へと変換され、その後の酸化修飾により **2-5** を経由して ABA へと変換される経路が予想された (図 2-1-5) [12]。また、2004年には cytochrome P450 の遺伝子破壊実験の結果、ABA 生合成に関わる遺伝子 *bcABA1* が同定された [13]。さらに、2006年にはその周辺の遺伝子の発現解析および遺伝子破壊実験が行われ、cytochrome P450 である *BcABA1,2*、酸化還元酵素 *BcABA4*、機能未知酵素 *BcABA3* の4酵素からなる ABA 生合成遺伝子クラスターが発見された (図 2-1-4) [14]。以上の研究により、*B. cinerea* では環化体 **2-2** が3種の修飾酵素 *BcABA124* による酸化的な修飾反応を受けて ABA へと変換されると予想された (図 2-1-5) [13]。また、機能未知の酵素 *BcABA3* は転写調節に関与すると考えられた [13]。しかしながら、1) 生合成において鍵となる FPP から **2-2** への環化反応を触媒する酵素が特定されていない、2) 3種類の修飾酵素の機能が十分に解明されていないなど、ABA の生合成経路には不明な点が多く残されていた。

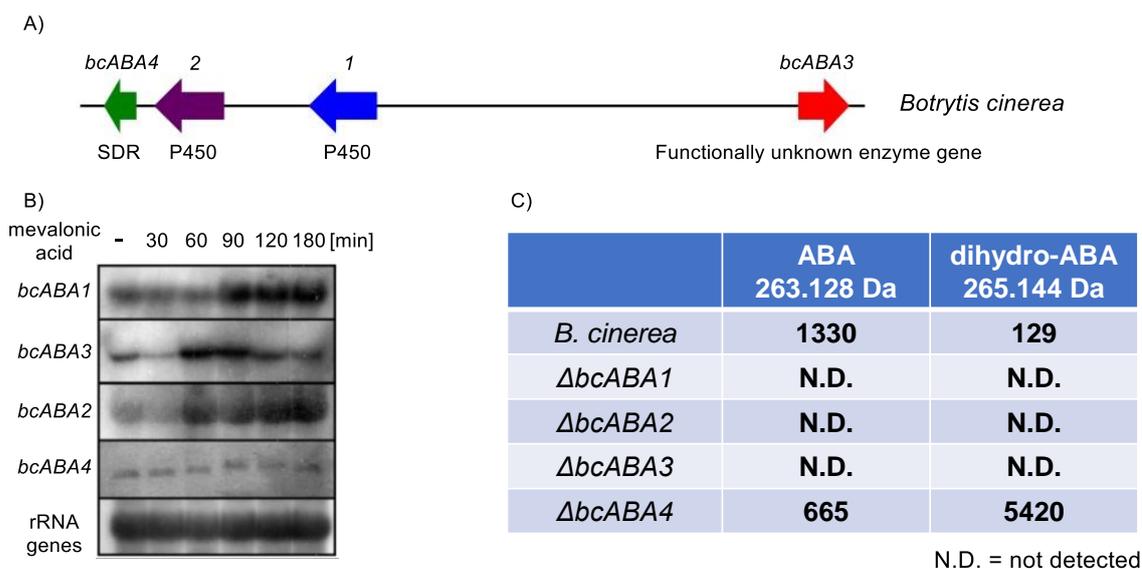


図 2-1-4. *B. cinerea* でのアブシジン酸生合成研究

A) ABA 生合成遺伝子クラスター B) ABA 生合成遺伝子の発現解析の結果

C) ABA 生合成遺伝子の欠失による ABA, dihydro-ABA の生産量の変化

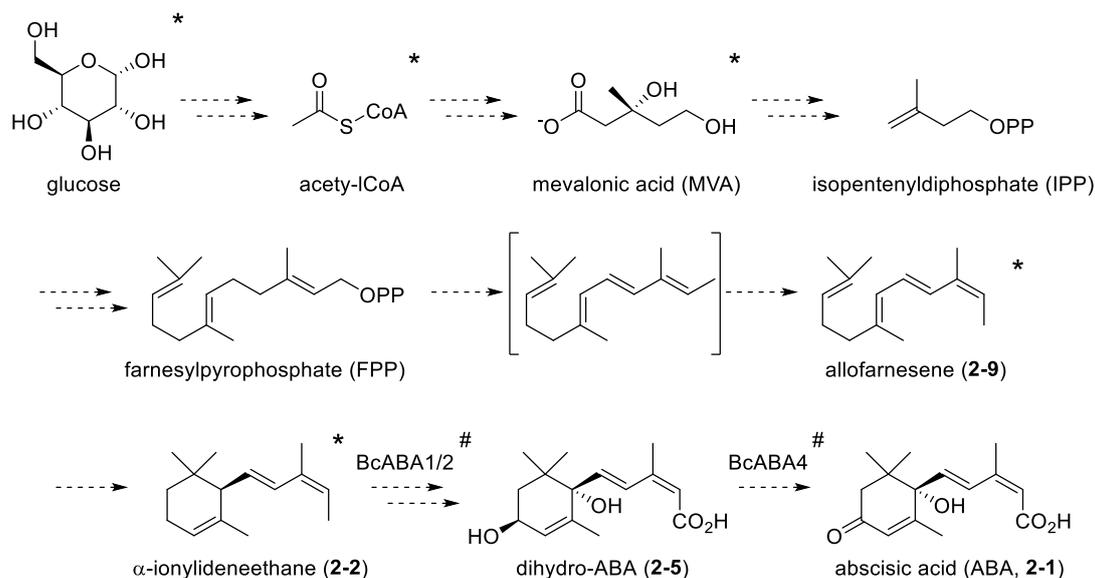


図 2-1-5. *B. cinerea* でのアブシジン酸予想生合成経路 (テルペノイド経路)

#: 当研究室で機能解析した酵素、*: 投与実験に使われた化合物

こうした背景下、当研究室の小崎は、入手可能な *B. cinerea* MAFF 306914 を実験材料として ABA 生合成研究を開始した。まず、3 種の修飾酵素のオーソログをクローニングし、麴菌形質転換体 AO-*bcABA124* を作製した。次いで、構築した形質転換体 (AO-*bcABA124*) に対して、3 種の予想生合成中間体 **2-2**、 α -ionylideneethanol (**2-3**)、 α -ionylideneacetic acid (**2-4**) を投与したところ、いずれの化合物も ABA へと変換された [15]。これより、① *B. cinerea* MAFF 306914 由来の修飾酵素 BcABA124 が正常に機能すること、② **2-2, 2-3, 2-4** が ABA 生合成経路の中間体であることが明らかになった。また、後述するように、単独導入株を用いた微生物変換実験や組み換え酵素を用いた *in vitro* 実験などから、酸化的修飾反応の経路を疑いの余地なく解明した (図 2-1-6)。これにより、ABA 生合成において残された課題は、FPP から **2-2** への環化反応を触媒する酵素の特定に絞られた。

2 章では、糸状菌における ABA 生合成において最大の謎とされてきた FPP から **2-2** への環化反応を触媒するテルペン環化酵素の探索を行った。先行研究における遺伝子破壊実験の結果から、生合成への関与が指摘されていた機能未知遺伝子 *bcABA3* に着目し、大腸菌や麴菌を宿主とした信頼性の高い発現系を用いて機能解析を行った。その結果、BcABA3 が **2-2** を生成する新しいタイプのテルペン環化酵素であることを明らかにした。その特異な環化機構は、新たに確立した大腸菌を宿主とする微生物変換実験と同位体標識前駆体を用いた酵素反応から明らかにした。さらに、BcABA3 は典型的なテルペン環化酵素に保存される金属結合モチーフを持っていないため、変異体解析により BcABA3 活性部位を推定した。また、ラセミ体基質の投与による実験結果にあいまいさが残るため、異種宿主発現により調製したキラルな **2-2** を用いて、酸化的修飾反応を再検討した。

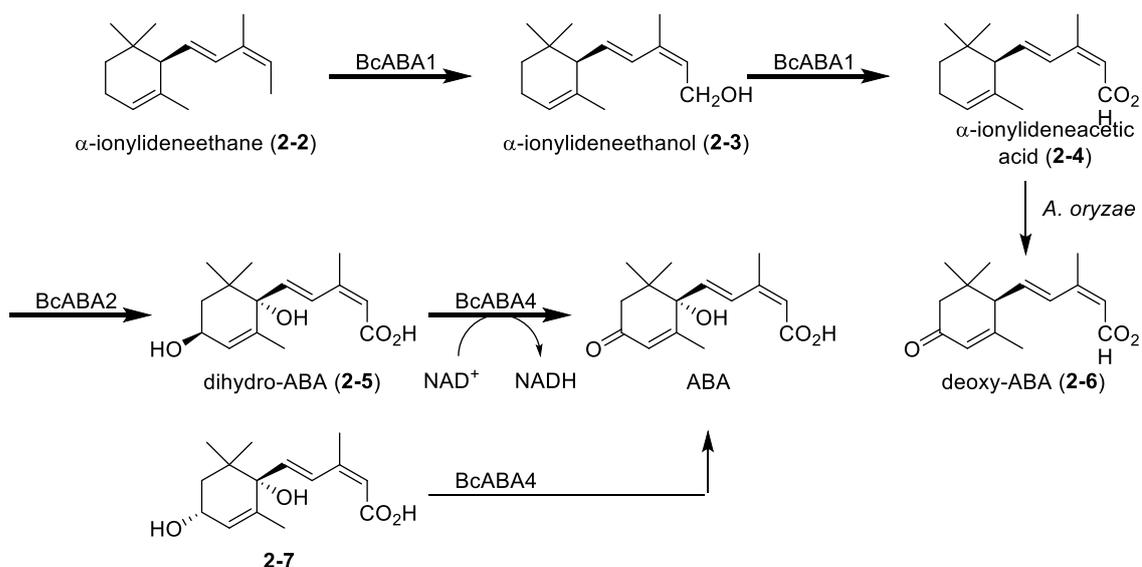


図 2-1-6. 当研究室で解析した ABA 生合成経路

2-2. 新奇テルペン環化酵素 BcABA3

2-2-1. BcABA3 の機能解析 *-in vitro-*

当研究室で行った微生物変換実験と以前に行われた標識体の取り込み実験の結果から [15]、生合成中間体である **2-2** は、生物が普遍的にもつ炭素数 15 (C15) の前駆体であるファルネシル二リン酸 (FPP) から生合成されると考えられる。FPP のピロリン酸部の脱離を起点とした環化反応は、主に DDxxD モチーフや NSE モチーフといった金属結合モチーフを有する Class I テルペン環化酵素により触媒されるが (図 2-2-1)、Class I テルペン環化酵素が生合成遺伝子クラスター上に見つからないため、「クラスターには存在していないテルペン環化酵素が反応に関与するのではないか?」という仮定の下、環化酵素の探索が進められてきた。2018 年、他グループの研究で、*B. cinerea* ATCC58025 株がもつ 5 種のセスキテルペン環化酵素の発現解析および遺伝子破壊実験が行われ、ABA 生合成遺伝子と同じ発現パターンを示し、欠失させると ABA の生産が消失するセスキテルペン環化酵素 BcABA5 が同定され、ABA 生合成の骨格構築反応を担うと予想された [18]。しかしながら、BcABA5 が **2-2** を与える直接的な実験結果が報告されていないことに加え、「クラスター中に存在する機能未知遺伝子 *bcABA3* を破壊した場合に ABA の生産が消失した」という先行研究 [12] と矛盾した実験結果に対する考察も行われていなかった。本研究では、遺伝子破壊実験の結果を重要視し、BcABA3 がテルペン環化酵素として FPP から **2-2** への環化反応に関与すると予想して機能解析を行った。

青枠: *bcABA3_S* における終止コドン, 赤枠: *bcABA3_L* における終止コドン
 酵素の機能を確かめるため、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* 実験を行った。
bcABA3_L は、MAFF306914 株から発現用ベクター-pColdI にクローニングした。一方、*bcABA3_S* は先に構築したプラスミドを基に、変異導入キットを用いて人為的に1塩基を除去することで調製した。構築したプラスミドをつかって大腸菌を形質転換し、N末領域にHis タグをもつ組み換えタンパク質の発現・可溶化を検討したところ、*BcABA3_L* は可溶化したのに対して、*BcABA3_S* は可溶化しなかった。後者の発現系を検討したところ、*BcABA3_S* は Maltose-binding protein との融合タンパク質として調製できた。次いで、従来のテルペン環化酵素の反応条件を参考にして [19]、 Mg^{2+} 存在下で FPP (130 μ M) を基質とした酵素反応を行い、反応生成物を GC-MS で測定したところ、*BcABA3_L* を用いた場合にのみ **2-2** の生産を確認した (図 2-2-3)。 Mg^{2+} 非存在下では反応が進行しなかったことから、*BcABA3_L* は Mg^{2+} 依存性の酵素であり、FPP から **2-2** への環化反応を触媒することが明らかになった。以降、*BcABA3_L* を *BcABA3* として説明する。

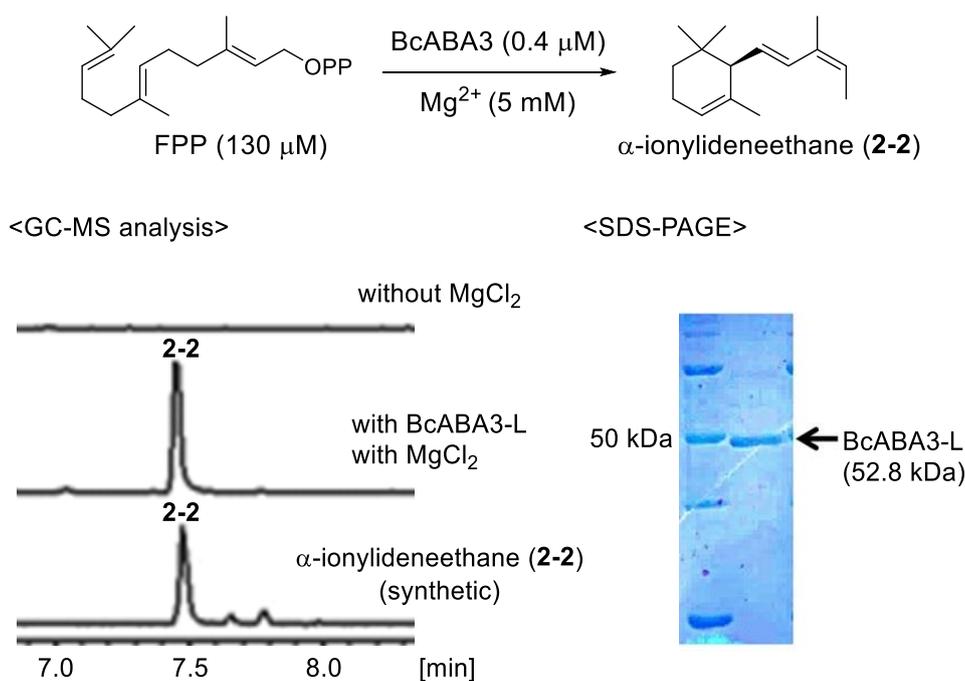


図 2-2-3. 組み換えタンパク質 *BcABA3* の *in vitro* 実験

2-2-2. BcABA3 の機能解析 -in vivo-

ABA 生合成における鍵酵素 BcABA3 の活性が確認できたことから、ABA 生合成に関わる 4 種の遺伝子 (*bcABA1234*) を麹菌へと導入することで ABA の異種生産を検討した。既に構築していた麹菌形質転換体 AO-*bcABA124* (pTAex3-*bcABA1*, pUSA2-*bcABA24*) に対して、新たに構築したプラスミド pAdeA2-*bcABA3* を用いて *bcABA3* を追加導入し、4 遺伝子導入株 AO-*bcABA3/124* を構築した。本形質転換体の代謝産物を UPLC-MS で分析したところ、*bcABA3* 追加導入株にのみ ABA と保持時間、スペクトルが一致するピークが観測された (図 2-2-4)。ABA 生産量を UV クロマトグラム ($\lambda=260-280$ nm) のピーク面積から算出したところ、固体培地で 69 mg/kg、液体培地で 8 mg/L と見積もった。また、本形質転換体ではわずかにシャント化合物である deoxy-ABA (2-6) が観測されたのみで、UPLC で観測可能なその他の生合成中間体 (2-4, 2-5) はみられなかった。これより、2-2 から ABA への酸化修飾反応は効率的に進行することが強く示唆された。

以上に記載した *in vitro* 実験と *in vivo* 実験での結果から、糸状菌 *B. cinerea* による ABA 生合成においては、既知テルペン環化酵素と相同性を示さない BcABA3 が FPP から中間体 2-2 への環化反応を触媒することを明らかにした。

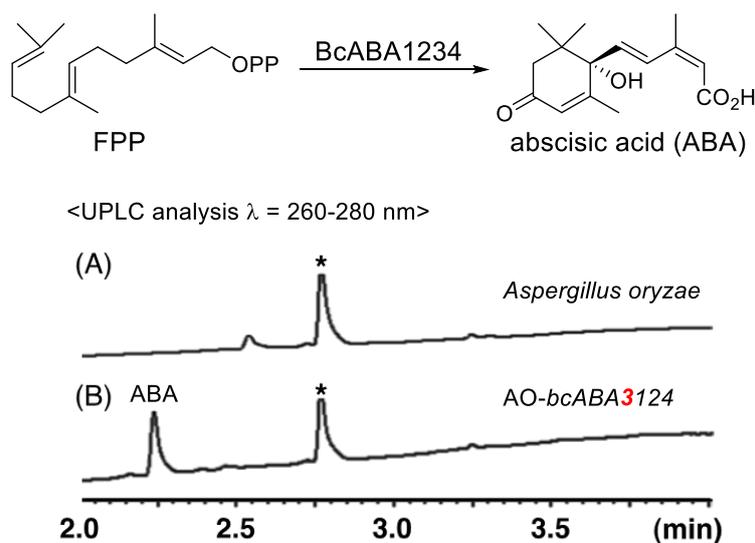


図 2-2-4. AO-*bcABA3/124* が生産した代謝産物の UPLC 分析の結果

2-3. BcABA3 の反応機構解析

2-3-1. BcABA3 の触媒する環化反応における中間体の特定-allofarnesene-

BcABA3 が触媒する FPP から **2-2** への反応については、標識された allofarnesene (**2-9**) が ABA に取り込まれたと報告されている [12]。この結果から、平井らは、trimethyldodecatriene や **2-9** といった複数の中性分子を経由して **2-2** を与えるという興味深い環化機構を提唱した(図 2-3-1)。中でも、FPP から **2-9** の生成機構は、他のテルペン環化酵素にはみられない本酵素に特有の反応機構と考えられたため、その解明に取り組むことにした。

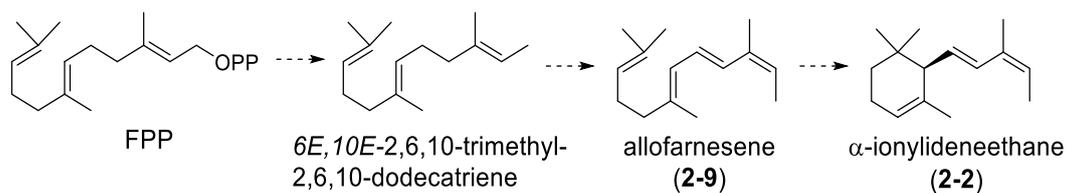


図 2-3-1. 予想された BcABA3 の環化機構

はじめに、**2-9** が BcABA3 の反応中間体であることを確かめるために、**2-9** を基質とした *in vitro* 実験を行った。**2-9** は既報に従って [12]、pseudoionone から Wittig 反応により 4 種の異性体の混合物として得た (図 2-3-2)。化合物 **2-9** は水への溶解性が低いため、疎水性の高い基質を用いた酵素反応を参考にして [20]、溶媒、酵素量、添加剤などを検討したが、いずれの条件でも生成物 **2-2** は観測されなかった。

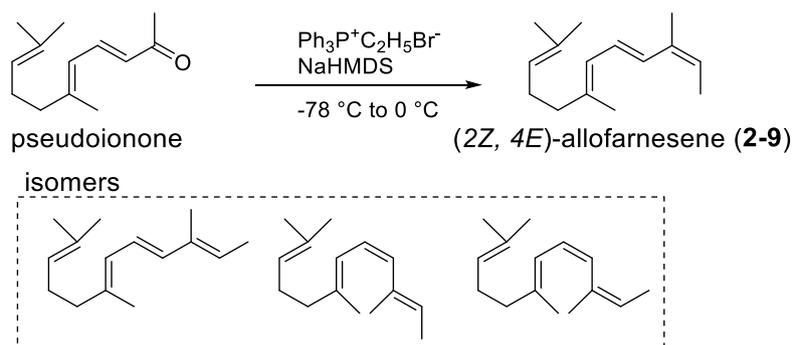


図 2-3-2. allofarnesene (**2-9**) の合成

【検討した項目】

- ・ 溶媒 : DMSO, MeOH, EtOH, 2-propanol, Acetone
- ・ 酵素量 : 0.4 μM , 4 μM , 20 μM , 40 μM
- ・ 添加剤 : triton-X100, -OPP

・バッファー：Tris-HCl (pH 7.0-9.0), HEPES (pH 6.5-8.0), H₃PO₄ (pH 6.0-8.0)

文献調査を行うと、BcABA3 と同様に、疎水性中間体を経由するテルペン環化酵素は既に知られているが、推定中間体からの変換反応を直接的に観測した例はないことがわかった。例えば、aristolochene synthase (AS)や 5-epi-aristolochene synthase (TEAS)でも中性分子 germacrene を経由する環化機構が提唱されているが、その存在は、1) FPP のアナログ体である 6,7-dihydrofarnesyl diphosphate を基質にした場合に 6,7-dihydrogermacrene が観測されることや [21]、2) germacrene がプロトン化される際のプロトン化を触媒する残基である Y520 をフェニルアラニンに置換した場合に野生型では観測されない germacrene が観測されたこと [22]から合理的に推定されているのみである (図 2-3-3)。

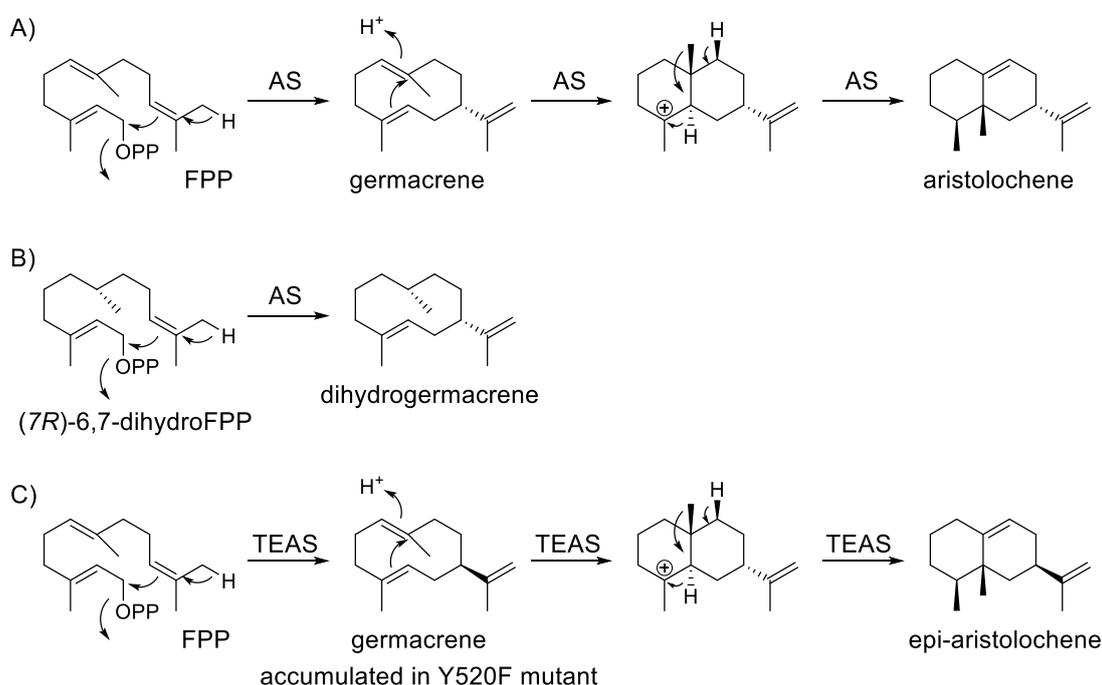


図 2-3-3. aristolochene synthase, epi-aristolochene synthase の反応

A) aristolochene synthase が触媒する germacrene を経由する環化反応

B) (7R)-6,7-dihydro-FPP を基質とした aristolochene synthase の酵素反応

C) epi-aristolochene synthase が触媒する反応および Y520F での germacrene の蓄積

以上の背景を踏まえ、本研究では、疎水性化合物 **2-9** が中間体であることを直接的に立証するため、*in vivo* での新たな実験系の確立を目的に検討した。具体的には、BcABA3 発現大腸菌 (EC-bcABA3)に **2-9** を投与して **2-2** の生産の有無を調べることで、投与した基質が中間体であるかどうか検証しようとした。予備検討の過程で、内在性の FPP から生成する **2-2** の生成量が投与した基質から生成する **2-2** の生成量を上回っており、予想中間体からの **2-2** の生産を確認できないことがわかってきた。この問題を解決するため、大腸菌を培養する

際に fosmidomycin を添加することにした。Fosmidomycin は、大腸菌内の FPP 生合成経路 (MEP 経路)において DXP から MEP への変換を触媒する 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase の阻害剤であり [23]、その添加により大腸菌内で生合成される FPP が減少する (図 2-3-4)。ただし、fosmidomycin が 100 μM 以上の高濃度になると大腸菌が生育しなくなるため、適切な濃度を予備的に検討し、終濃度 5.5 μM の場合に **2-2** の生産が見られなくなることを見出した。この条件で EC-*bcABA3* を培養後、大腸菌を集菌し、リン酸バッファー (pH 7.4) で懸濁した溶液に対して **2-9** を投与し、その後 SPME fiber で揮発成分を捕集し GC-MS で分析した。その結果、生産量はわずかではあったものの、再現性良く **2-2** の生産が観測された (図 2-3-5)。これより、**2-9** は BcABA3 が触媒する環化反応の中間体であることを明らかにできた。

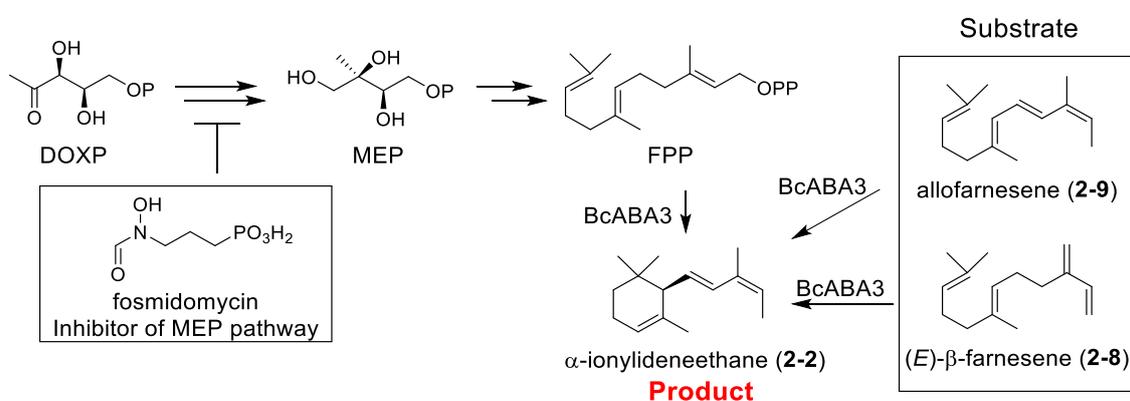


図 2-3-4. fosmidomycin による FPP 生合成の阻害機構

<GC-MS analysis, m/z 148, 204>

* impurity from *E. coli*

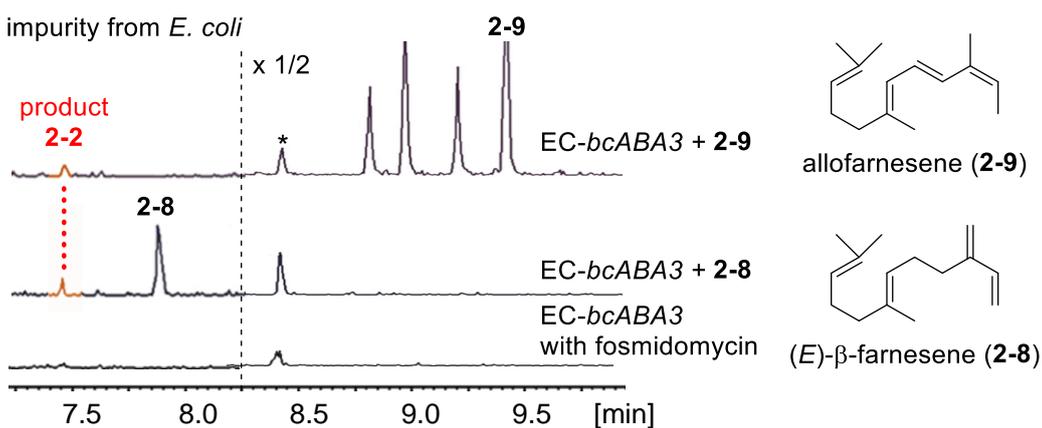


図 2-3-5. EC-*bcABA3* に対する **2-8**, **2-9** 投与実験の結果

2-3-2. BcABA3 の触媒する環化反応における中間体の特定 - β -farnesene-

2-9 が中間体であることがわかったため、次に **2-9** から **2-2** への環化反応におけるプロトン化の際の面選択性を明らかにすることを目的として、90%重水中で酵素反応を行った。反応生成物 **2-2** の 10 位メチレンプロトンは非等価なシグナルとして 1.19 ppm (H10-a) と 1.46 ppm (H10-b) に観測されており、この内 H10-b が H15 (0.91 ppm)、H12 (1.79 ppm)、H5 (5.45 ppm) とそれぞれ NOE 相関を示したことから、H10-b を *pro-R* H10 と帰属した。重水中での酵素反応生成物の $^2\text{H-NMR}$ 測定の結果、H10-b の位置にシグナルが観測された (図 2-3-7)。したがって、C10 位でのプロトン化は紙面手前側から進行することがわかった。また、驚くべきことに、反応に関与してないはずの 1 位、12 位のメチル基への重水素の取り込みも観測された。

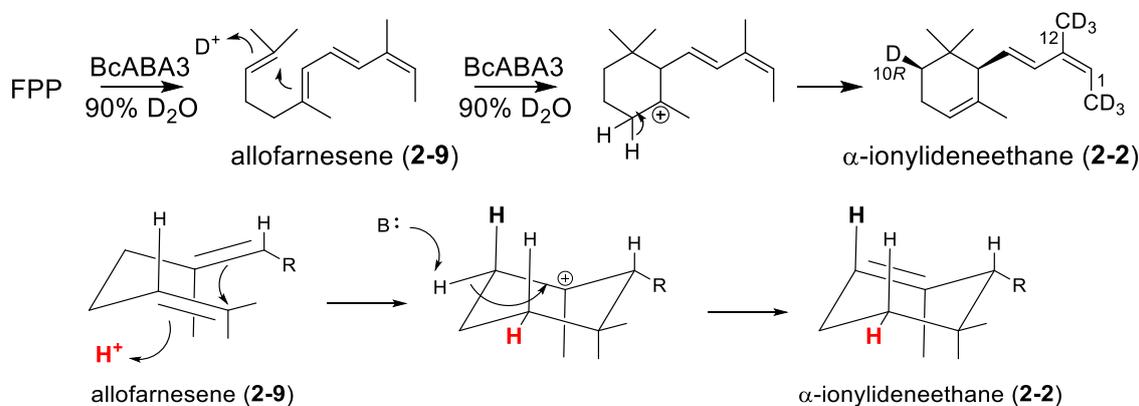


図 2-3-6. BcABA3 の反応における環化機構 (**2-9** から **2-2**)

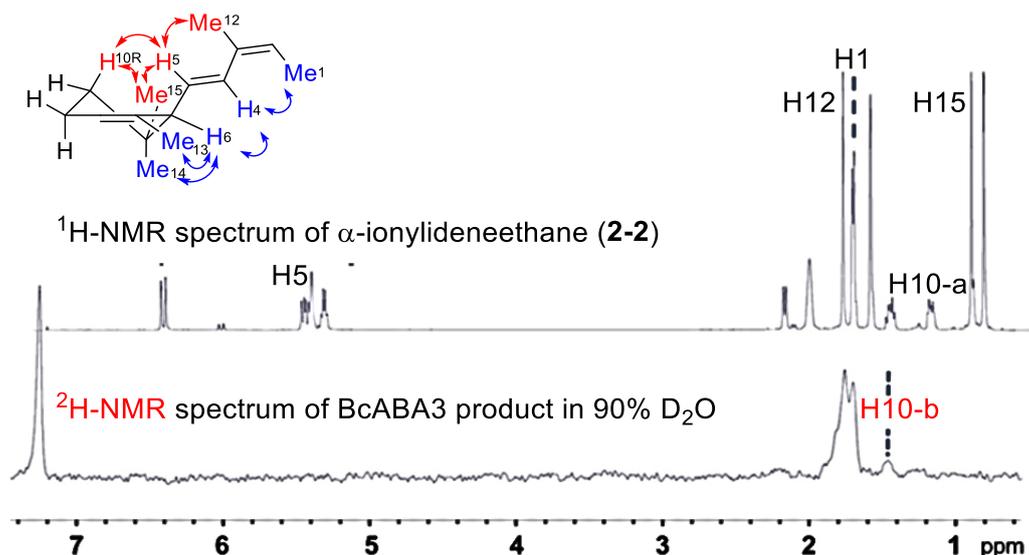


図 2-3-7. 環化体 **2-2** の NMR スペクトル

上段: 非標識体の $^1\text{H-NMR}$; 下段: 重水を用いた反応生成物の $^2\text{H-NMR}$

筆者が調べた限りでは、テルペン環化酵素の反応において、メチル基に重水素が取り込まれる現象は珍しく、**caryolan-1-ol synthase (GcoA)**で報告されている (図 2-3-8) [24]。GcoA においては、重水中で酵素反応を行った場合、環化体である **caryolan-1-ol** の 9 位と 12 位に重水素が導入される。このうち 9 位の重水素は予想中間体 β -caryophyllene が環化する際のプロトン化に由来するものであるが、12 位の重水素は β -caryophyllene の methyldiene 部分でプロトン化-脱プロトン化が繰り返されることで導入されたと考えられている。GcoA で提唱されている機構を考慮して BcABA3 で観測されたメチル基への重水素の導入機構を考えると、 β -farnesene (**2-8**)の末端ジエンでのプロトン化-脱プロトン化が繰り返されることによって 1 位と 12 位のメチル基に重水素が取り込まれたのではないかと予想した (図 2-3-9)。

2-8 の関与は先行研究でも予想されていなかったため、**2-9** と同様に EC-bcABA3 への **2-8** (Wako)の投与実験を行った。その結果、**2-2** への変換が観測されたため、**2-8** もまた BcABA3 の反応における中間体であることが明らかになった (図 2-3-5)。

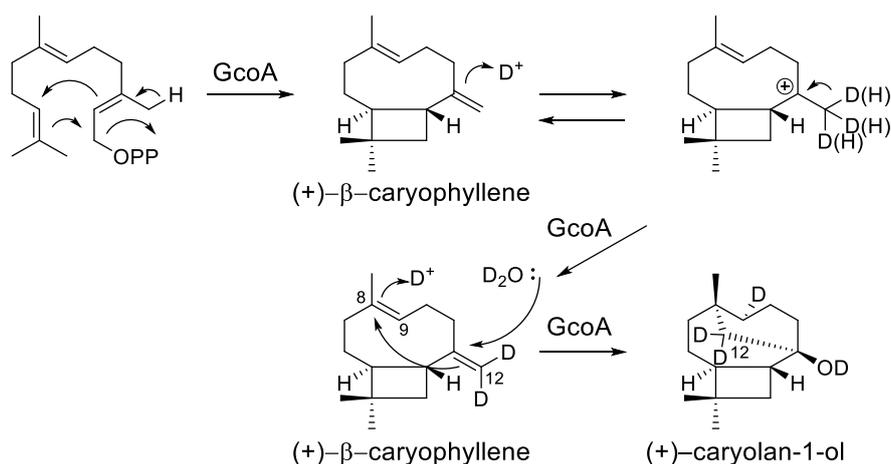


図 2-3-8. caryolan-1-ol への環化反応におけるメチル基への水素の取り込みメカニズム

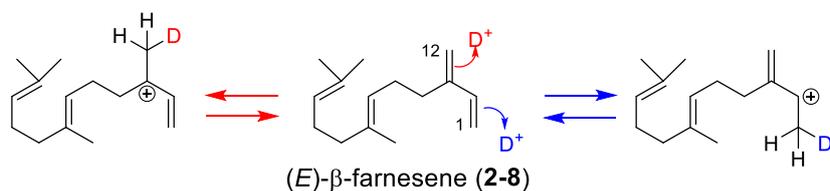


図 2-3-9. β -farnesene (**2-8**)を介した末端メチル基への重水素の取り込みメカニズム

2-3-3. 重水素標識 FPP を用いた反応機構の解析

2-8、2-9 という 2 種の疎水性中間体を経由して 2-2 が生成することがわかったことから、次に、反応の過程における水素原子の移動を、各種重水素標識 FPP を基質とした酵素反応によって解析した。一般に、酵素反応における反応機構の解析では、標識前駆体から調製した標識生成物の NMR 測定が行われている。この手法では、反応の前後における標識位置の変化を直接的に観測できるというメリットがあるものの、100 μg 以上の生成物を調製しなくてはならない。位置特異的に標識した FPP の合成には、多段階反応を要するため、高価な標識試薬を用いて大量の各種標識体を合成するのは容易ではない。この問題を避けるため、当研究室では MS スペクトルのフラグメントパターンから標識位置を合理的に推定する手法を開発している [25]。本手法では、重水素標識 FPP を体系的に調製し、各標識体を用いた場合の酵素反応生成物の検出イオンピークの質量数を比較することで、生成物における重水素の有無や移動を判断できる。NMR 法との大きな相違点は、ng オーダーの生成物があれば測定可能であるという点である。実際に、当研究室では、この手法を用いて 4 環性骨格をもつ phomopsene を与える環化酵素 PaFS の環化機構を解明している [25]。

標識体の合成は、先行研究と同様、ゲラニル 2 リン酸 (GPP) 合成酵素、FPP 合成酵素を用いた [26]。GPP と標識 IPP を FPP 合成酵素によって縮合することで、FPP の 3 つ目のユニット (unit 3) にのみ重水素を導入した。同様に、ジメチルアリル 2 リン酸 (DMAPP) と標識 IPP を FPP 合成酵素によって反応させ、unit 2,3 に重水素を導入した。unit 2 のみへの重水素の導入では、GPP 合成酵素を用いて DMAPP と標識 IPP から標識 GPP を調製した後に、FPP 合成酵素を用いて標識 GPP と非標識 IPP から標識 FPP を合成した。このようにして、4 種の重水素標識 IPP から合計 12 種の重水素標識 FPP を調製した (図 2-3-10)。

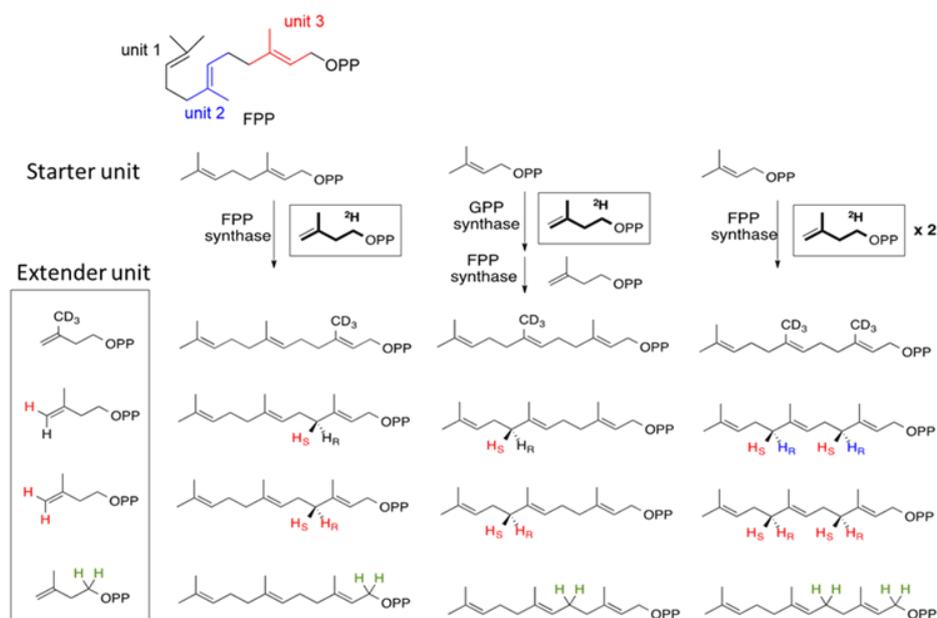


図 2-3-10. 各種重水素標識 FPP の酵素合成

2-2 の EI-MS スペクトルでは、主に、分子イオンピーク m/z 204 (M^+)と **2-2** の retro-Diels-Alder 反応によるフラグメントイオンピーク m/z 148 (F_{148})が観測される。この2つのピークの質量数に着目してデータを比較したところ、4, 8 位の重水素標識体を用いた場合に非標識体と比較して特徴的な重水素の増加を観測した。すなわち、4,8-D₄-FPP、8S-D-FPP、4S-D-FPP をそれぞれ基質とした場合の MS スペクトルを比較すると、4,8-D₄-FPP の時には 2 m.u.の増加が観測されたのに対し、8S-D-FPP では重水素の取り込みは観測されず、4S-D-FPP では 1 m.u.の増加が観測された (図 2-3-11)。この結果より、8位 *pro-SH* は6員環が形成された後の脱プロトン化の過程で、選択的に引き抜かれることがわかった。また、4位は異性化する際に、*pro-R H* が選択的に引き抜かれることが示唆された。

加えて、1, 12 位の重水素標識体 (1-D₂-FPP、12-D₃-FPP) では、1~3 m.u.の増加によってクラスター化したピークが観測された。これは、先ほどの重水中での重水素への置換反応とは逆に、軽水中で反応を行うことで、ラベル化したメチル基上で軽水素への置換反応が進行したためであると考えられる。一方、C13 位メチル基の標識体 (13-D₃-FPP) ではクラスター化は観測されなかった (図 2-3-11)。

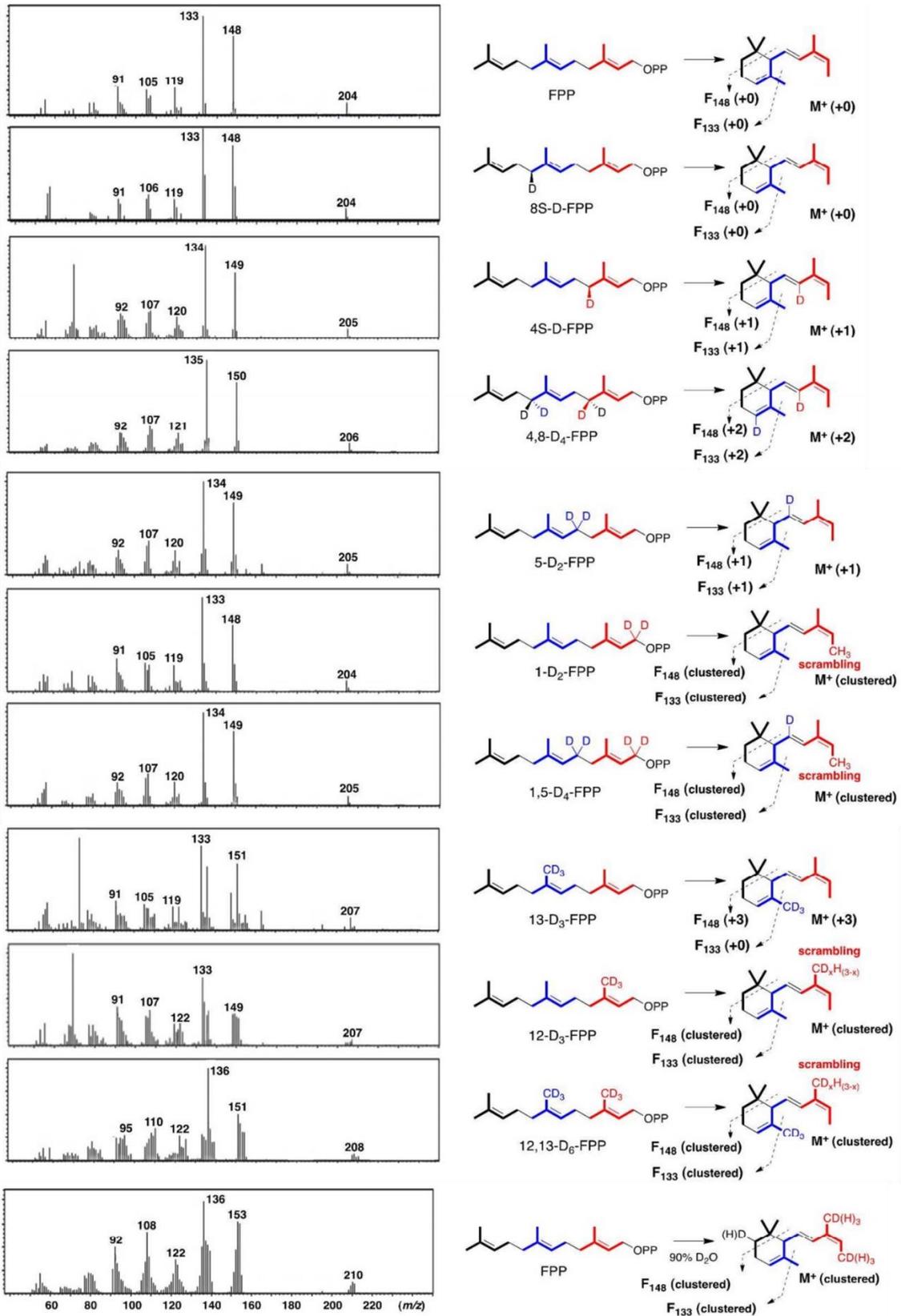


図 2-3-11. 重水素標識 FPP を用いた酵素反応生成物の EI-MS スペクトル

2-3-4. BcABA3 の推定環化機構

以上の実験結果より、BcABA3 の環化機構を推定した (図 2-3-12) [27]。この反応は、FPP のピロリン酸部分の開裂により生じたカルボカチオン中間体 A^+ の脱プロトン化による **2-8** の形成 (Step 1)、**2-8** の末端ジエン部位におけるプロトン化-脱プロトン化を繰り返す過程で生じるカルボカチオン B^{1+} もしくは B^{2+} を経由した **2-9** への異性化 (Step 2)、**2-9** のプロトン化から開始される **2-2** への環化 (Step 3) の 3 段階で進行する。Step 1 の反応は β -farnesene 合成酵素と同じ反応である。Step 2 での中性分子の異性化反応は BcABA3 特有の反応であり、テルペン環化酵素による環化の過程で 2 種の中性分子を経由する反応は極めて稀である。また、重水素の標識パターンから先行研究で予想されていなかった **2-8** の関与を推定し、今回新たに確立した微生物変換実験系によって証明した。Step 3 の反応は、オレフィンのプロトン化から開始される反応である。その立体選択性は、重水や重水素標識 FPP を用いた実験によって、オレフィンのプロトン化では環化体の 10 位 *pro-R* に水に由来する水素が取り込まれ、脱プロトン化では 8 位 *pro-S* の水素が立体選択的に引き抜かれることを確かめた。この立体化学は lycopene synthase が ϵ -carotene を形成するときと同じである (図 2-3-13) [28]。

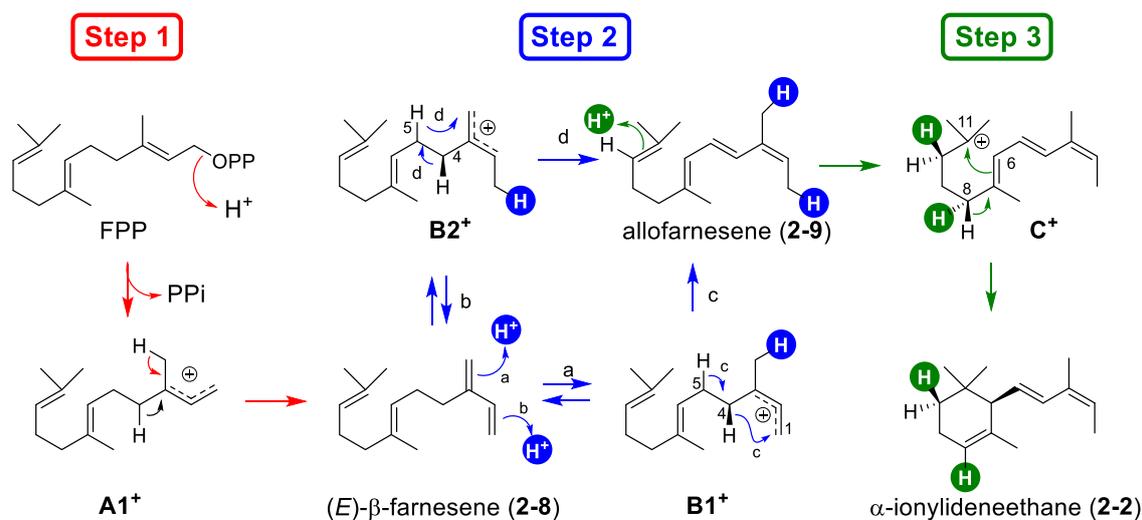


図 2-3-12. 本実験結果に基づく BcABA3 の推定環化機構

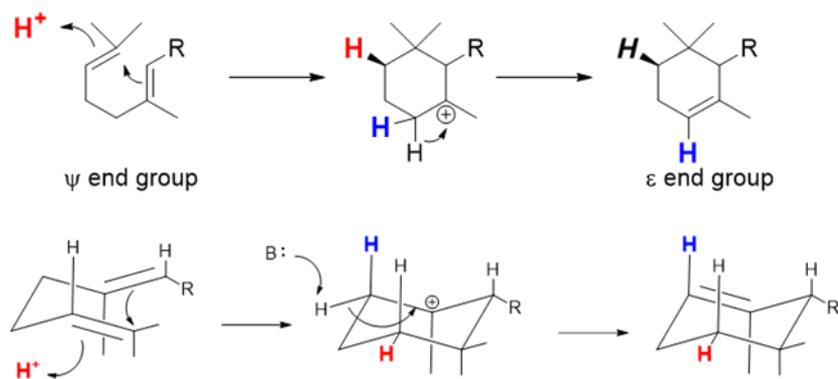


図 2-3-13. lycopene synthase の反応機構

2-3-5. 速度論解析

次に BcABA3 の酵素学的な性質を調べるため、至適温度、金属要求性、至適 2 価金属イオン濃度、至適 pH の 4 項目について検討した。酵素反応の変換率は GC-MS クロマトグラムにおける生成物のピーク面積から算出した。また、金属要求性について検討する際の相対活性は、 $[Mg^{2+}] = 20 \text{ mM}$ で反応したときの変換率を 100 と定義して、各金属での相対的な変換率を求めた。

各項目の検討の結果を図 2-3-14 にまとめる。BcABA3 の最適条件は 30°C 、 Mg^{2+} 濃度 : 20 mM, pH 8.0 (HEPES) であり、2 価金属は Mg^{2+} 以外に、 Mn^{2+} でも 10% 程度の酵素活性があることがわかった。この条件で Lineweaver-Burk plot を作成し、 $K_m = 2.0 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 50 \pm 2 \times 10^{-3} / \text{sec}$ と求めた (図 2-3-15)。aristolochene synthase では、 $K_m = 0.6 \pm 0.1 \mu\text{M}$, $k_{cat} = 43 \pm 2 \times 10^{-3} / \text{sec}$ であり [19]、他のテルペン環化酵素と同程度の酵素活性を示すことがわかった。

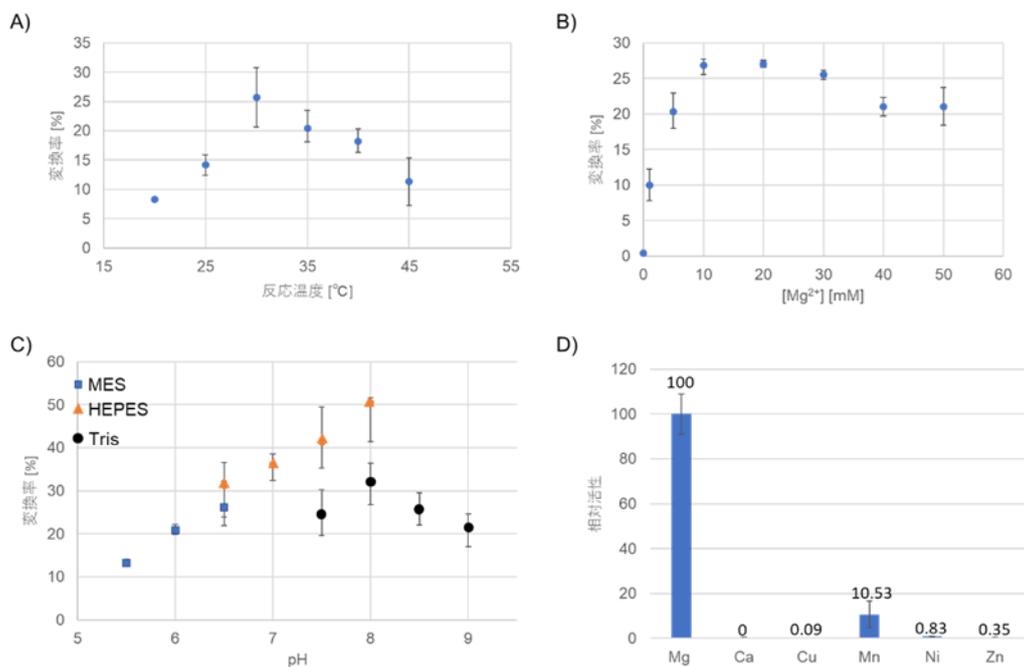


図 2-3-14. BcABA3 の酵素学的諸性質 に関する解析
 A) 至適温度, B) 至適金属イオン濃度, C) 至適 pH, D) 二価金属要求性

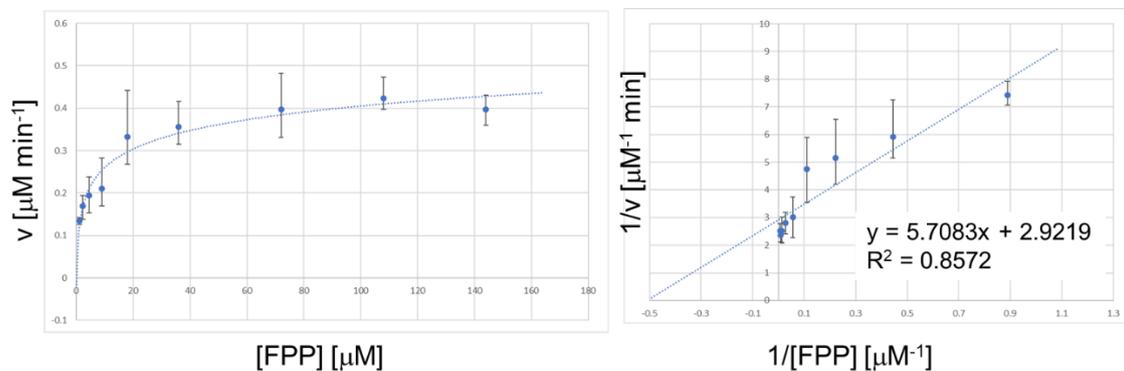


図 2-3-15. BcABA3 に関する Lineweaver-Burk plot

また、最適条件で BcABA3 の反応を 1 時間行い、反応生成物を GC-MS で分析したところ、酵素活性が向上したため、**2-2** に加えて、中間体 **2-9** と新たな化合物 **2-10** が観測された (図 2-3-17A)。**2-10** は、標品との保持時間およびフラグメントイオンパターンの比較により中間体 **2-8** の異性体である (*E*)- α -farnesene (**2-10**) と決定した (図 2-3-16)。**2-10** が反応の中間体であるのか、それともシャント化合物であるのかを確認するため、重水中での酵素反応ならびに EC-*bcABA3* を用いた微生物変換を行った。微生物変換の基質として使う **2-10** は、(*E*)- α -farnesene synthase を発現した大腸菌を培養、抽出することで調製した [29]。BcABA3 発現大腸菌に対する **2-10** の投与実験の結果、**2-2** への変換が観測できなかった。

る 2-10 の投与実験の結果 C) 50%重水中での酵素反応生成物の EI-MS スペクトル

2-4. BcABA3 推定活性部位

前節 2-2-1 で記載した通り、FPP の環化酵素を触媒するテルペン環化酵素では、一般に、ピロリン酸部分の認識に関わるモチーフが存在する。先述した **Class I** 環化酵素に保存される DDxxD や NSE モチーフに加えて、UbiA タイプのプレニル基転移酵素や環化酵素が有する金属結合モチーフ (NDXXDXXXD、DXXXD モチーフ) も知られている (図 2-4-1. A, B, 2-4-2. A)[30]。また近年、従来のテルペン環化酵素と相同性を示さない新規酵素 BsuTS、BsiTS の構造解析が行われ、**Class I** 型の金属結合モチーフと重なるアスパラギン酸残基が二価金属の認識に関与していることが示された(図 2-4-1 C, 2-4-2. B) [31]。いずれの場合においても、アスパラギン酸/グルタミン酸のような酸性アミノ酸残基が高く保存されている。前章の実験により、**BcABA3** による環化反応では二価金属が必須であることが明らかになったことから同様のモチーフが存在すると考えられたが、アミノ酸配列を比較しても、既知のモチーフと類似の配列は見つからなかった (図 2-4-3)。従って、本酵素は他の環化酵素とは異なる機構で FPP を認識している可能性が高く、その認識機構には興味もたれる。

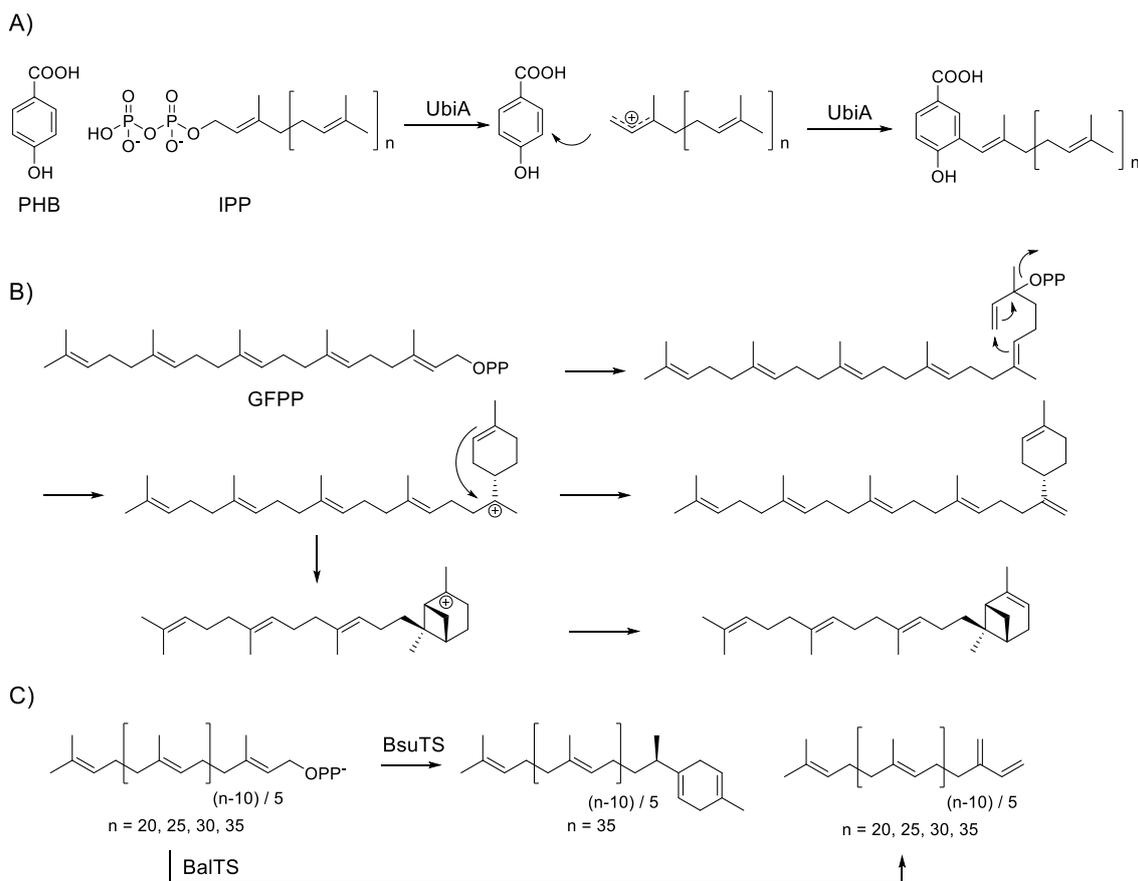


図 2-4-1. **Class I** テルペン環化酵素とは異なるニリン酸認識モチーフを持つ酵素の反応
A) UbiA 型プレニル基転移酵素の反応 B) UbiA 型テルペン環化酵素の反応

C) large-terpene 環化酵素 (BsuTS, BaITS)の反応

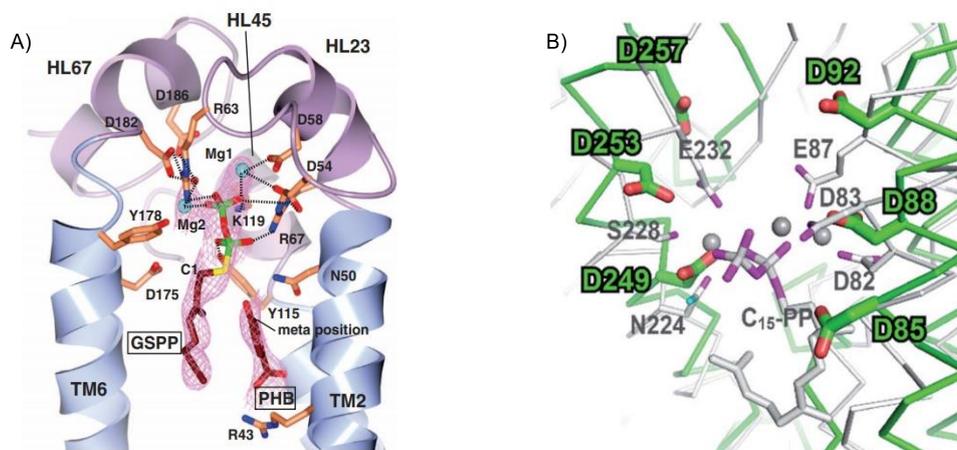


図 2-4-2. Class I テルペン環化酵素とは異なる二リン酸認識部位を持つ酵素の活性部位の構造; A) UbiA 型 結晶構造 [30]より引用 B) BaITS 結晶構造 [31]より引用

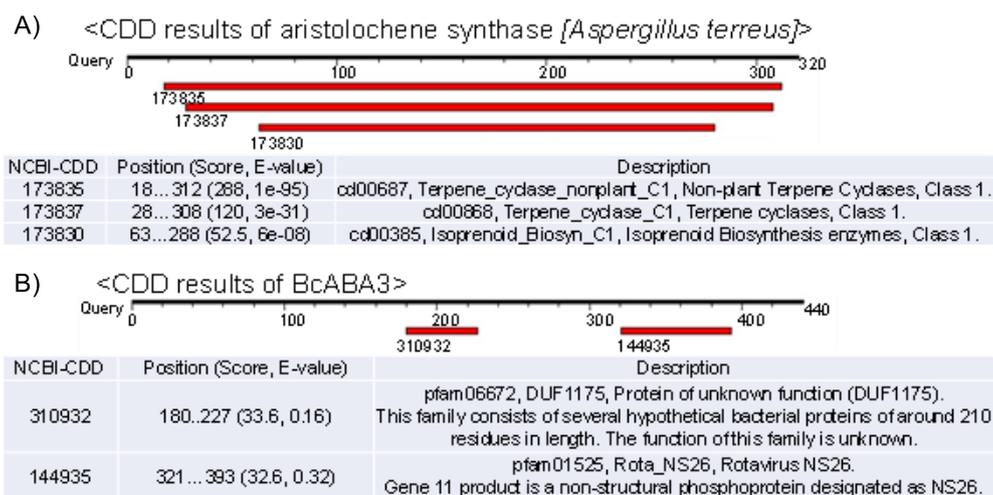


図 2-4-3. Conserved domain search を用いたテルペン環化酵素のモチーフ検索結果
A) aristolochene synthase の結果、B) BcABA3 の結果

BcABA3 のアミノ酸配列をクエリーとして BLAST 検索を行ったところ、100 以上のオアソログが見つかった。いずれの遺伝子も BcABA3 と同様に、既知のテルペン環化酵素に保存されるモチーフを持っていない機能未知酵素であった。現時点では BcABA3 の結晶構造は得られていないことから、BcABA3 の活性部位を予想するために、各酵素とアミノ酸配列を比較した。この際、相同性が高い酵素とアミノ酸配列を比較しても特異的に保存される領域は見いだせなかったため、50-60%と中程度の相同性を示す酵素 (12 種) のアミノ酸配列と比較した。その結果、高く保存されている 3 つの領域 (region 1-3) が見いだされた (図 2-4-4.)。これらの領域に活性部位があると仮定して、既知のピロリン酸部分の認識に関わるモ

チーフに多く見られる酸性アミノ酸残基 (D/E)を中心に合計 25 のアミノ酸をそれぞれアラインへと置換した変異体を構築した。変異体が与える生成物の同定を簡便に行うため、変異型 BcABA3 発現大腸菌を培養し、IPTG 誘導後に SPME fiber で揮発成分を捕集した化合物を GC-MS で分析した。

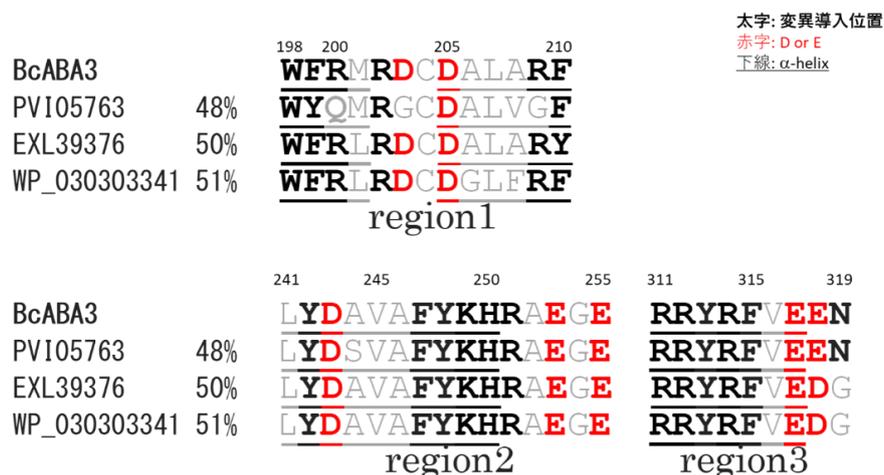


図 2-4-4. BcABA3 とオーソログ酵素間で保存性の高い領域

太字: 変異導入位置, 赤色: 酸性アミノ酸残基, 灰色: 保存されていないアミノ酸残基または非変異導入位置, 下線: HH pred によって予想された α -helix の位置

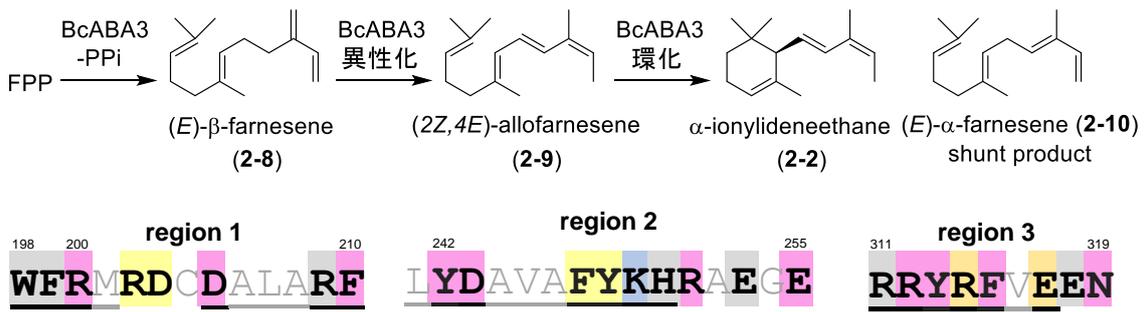
PVI05763: *Periconia macrospinoso* (多犯性植物病原性糸状菌、48% identity)

EXL39376: *Fusarium oxysporum* (トマト病原性糸状菌、50% identity)

WP_030303341: *Streptomyces sp.* (放線菌、51% identity)

変異実験の結果を図 2-4-5 に示す。Region 2 に注目すると、酸性アミノ酸残基の変異体 D243A や E255A で代謝産物が観測されなかった。一方、K249 やその周辺に位置する F247, Y248 の変異体では、反応中間体である 2-8、2-9 やシャント化合物 2-10 が観測された。中間体やピロリン酸部分が開裂したシャント化合物が観測されたことから、この領域のアミノ酸残基がピロリン酸部分の開裂に関与し、BcABA3 の活性部位近傍に位置していることが強く示唆されたため、変異体が生成物を与えなかった D243 や E255 が金属結合モチーフの一部であると考えられた。一方、region 1 では R200A, D205A, F210A の変異体で、region 3 では R312A, Y313A, F315A, N319A で代謝産物が観測されなかった。

生成物が観測されなかった変異体について、酵素が正しくフォールディングしているかどうか確かめるため、別途、酵素の可溶性を検証した。その結果、region 2、region 3 の確認した全ての変異体が可溶性の酵素であることが確認された。一方、region 1 では R200A, F210A が可溶化しなかった。この結果より、region 1 のアミノ酸残基はタンパク質の構造安定化に寄与している可能性が高く、region 3 はピロリン酸部分との相互作用に関わることが示唆された。



<GC-MS analysis m/z 69, 93, 107, 135>

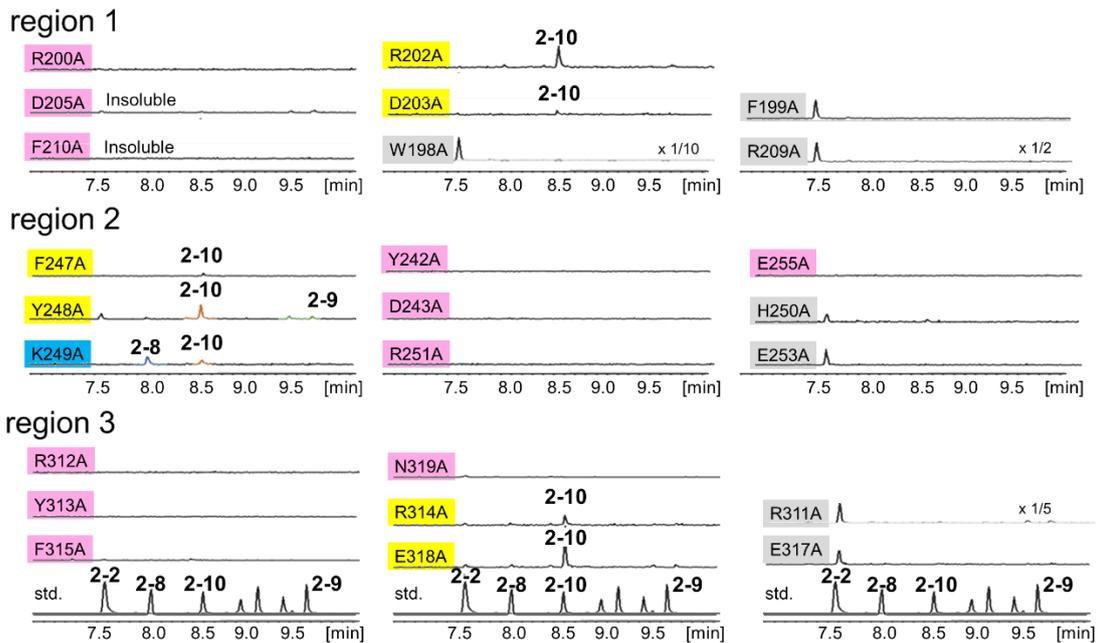


図 2-4-5. BcABA3 変異体が生産した代謝産物の GC-MS 分析の結果

配列上の太字: 変異導入位置, 下線: HH pred によって予想された α -helix の位置

ハイライト赤: アラニン置換によって代謝産物を与えなくなったアミノ酸残基, 黄: アラニン置換によって(*E*)- α -farnesene (**2-10**)が蓄積したアミノ酸残基, 青: アラニン置換によって β -farnesene (**2-8**)が蓄積したアミノ酸残基, 灰: アラニン置換しても代謝産物に変化が見られなかったアミノ酸残基

2-5. 考察

変異実験の結果を解釈するため、タンパク質の構造予測プログラム AlphaFold2 を用いて BcABA3 の立体構造を予測した。図 2-5-1 には、上述の BcABA3 変異体の代謝解析の結果を反映して、赤) アラニン置換によって酵素活性が著しく低下した推定活性部位内部のアミノ酸、黄) シヤント化合物 **2-10** を蓄積、もしくは酵素活性が減少した推定活性部位入口付近のアミノ酸、青) 中間体 **2-8** を蓄積したアミノ酸、の 3 種に分類して特徴的な残基を示した。変異体解析によって反応に重要だと推定されたアミノ酸の多くが固まって存在することがわかった。中でも、金属結合モチーフによく見られる酸性アミノ酸残基に着目すると、アラニン置換によって生成物が観測されなかった region 2 の D243、E255 や、**2-2** 生産量が著しく減少した region 3 の E253 が近傍に位置していることがわかった。テルペン環化酵素に保存される DDxxD モチーフがピロリン酸部位の脱離反応に関与することを考えると、先の結果は、これらの酸性アミノ酸残基が同じ役割を担っていることを示唆する結果と考えている。また、その周辺には、アラニン置換によって活性が失われた、もしくは BcABA3 の活性が弱くなったアミノ酸である Y242、H250、Y313、F315 が確認できる。これらはいずれも芳香族アミノ酸である。芳香族アミノ酸は、テルペン環化酵素において、カチオン- π 相互作用によってカルボカチオン中間体の安定化に寄与することが知られている。よって、BcABA3 推定活性部位に見出された上述の芳香族アミノ酸も同じ役割を果たしていると考えられる。

活性ポケットの入り口を図 2-5-1 上側と仮定すると、region 3 の変異体のうちシヤント化合物 **2-10** が観測された R314、E318 や、生成物が観測されなかった R312 が活性部位の入り口に位置している。これらのアミノ酸残基がアラニンに置換されると、活性部位の空間が大きくなるため、基質を適切なコンフォメーションで認識できなくなったと考えられる。その結果として、反応が進行しない、もしくは、シヤント化合物を与えたのではないかと考えられる。

K249A は反応中間体 **2-8** が観測された興味深い変異体である。K249 は推定活性部位の内部に位置しており、**2-8** から **2-9** への異性化において、プロトンを引き抜く塩基として働いている可能性がある。

BcABA3 の立体構造と、変異体解析の結果が良く一致することから、推定された活性部位の妥当性が示された。今後は、CotB2 の立体構造に基づいた詳細な触媒機構の解析例 (図 2-5-3) [32]を参考にし、基質 FPP のアナログ体を合成し、結晶構造解析を行うことで、より詳細な活性部位や触媒機構についての知見の獲得を目指す。

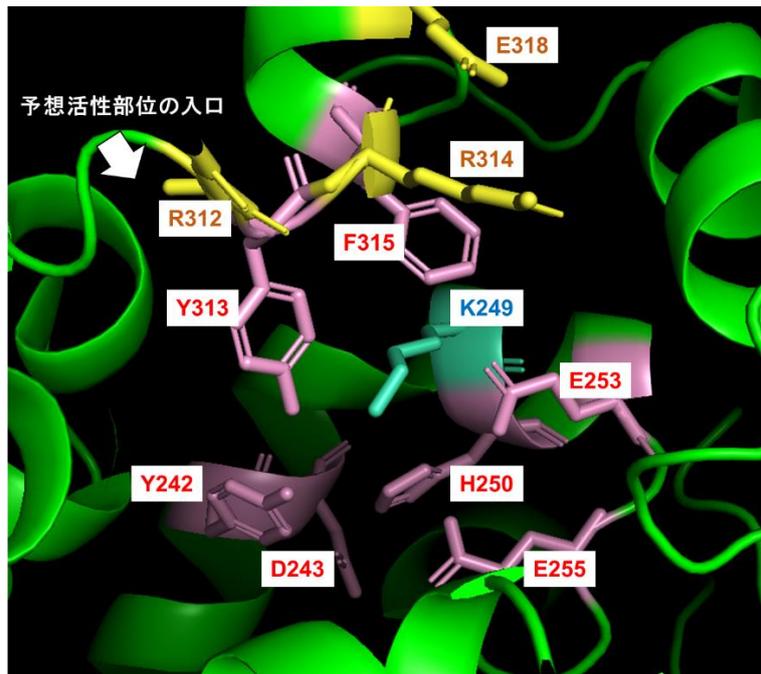


図 2-5-1. AlphaFold2 による BcABA3 予測構造における推定活性部位

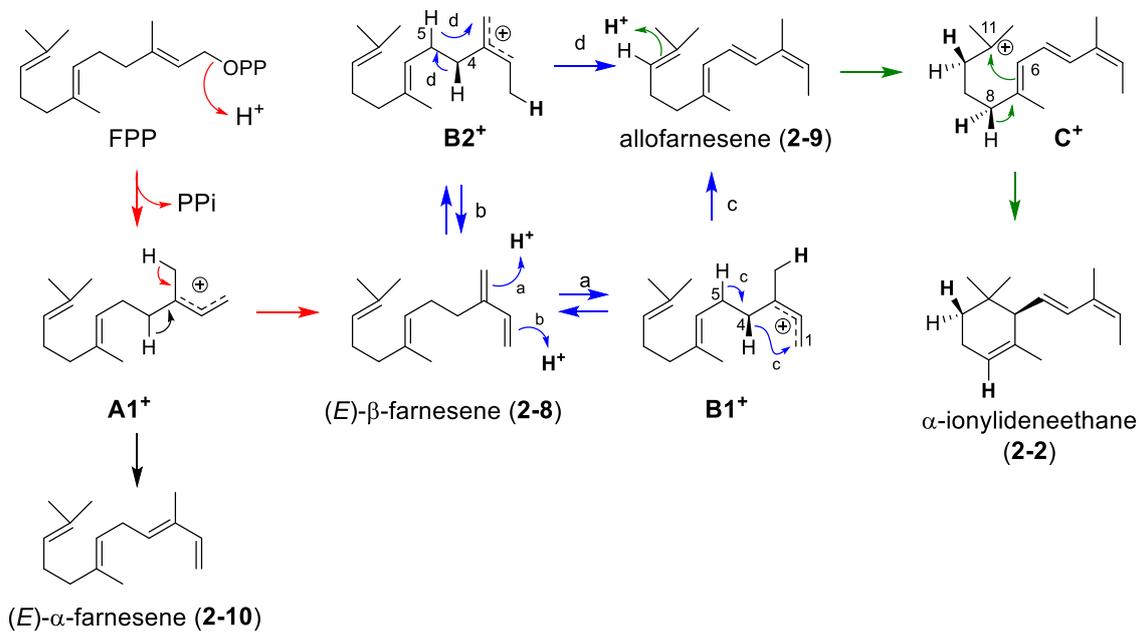


図 2-5-2. 変異実験の結果をふまえた BcABA3 の推定環化機構

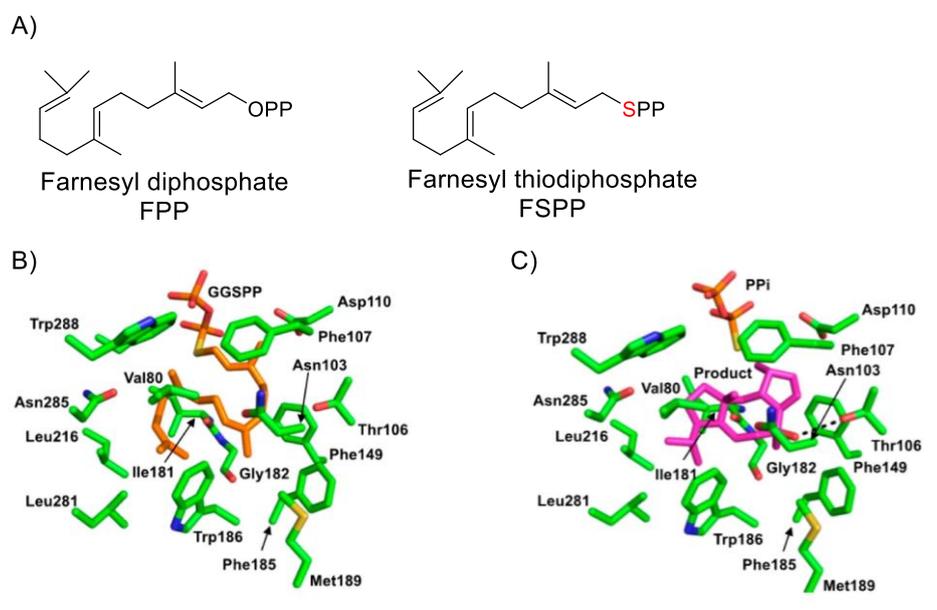


図 2-5-3. A) セスキテルペン環化酵素の基質 FPP (左)とアナログ体 FSPP (右)の構造
 B) GGPP のアナログ体 GSPP とジテルペン環化酵素 CotB2 の X 線結晶構造
 C) B の実験で得られた CotB2 の結晶構造をもとにした、環化体と酵素の結晶構造モデル
 B, C は [32]より引用

2-6. 糸状菌における ABA 合成経路

当研究室の小崎による先行研究から、**2-2** に対する酸化修飾反応が明らかにされた。ただし、先行研究はラセミ体の合成中間体を用いた実験であり、ラセミ体の **2-2** を基質とした場合に光学活性な **2-6** が生成したことから、BcABA1 による酸化修飾反応の過程で光学分割が起こっていることがわかった。同様の現象は BcABA2 でも起こり得るため、酵素的に調製した(*R*)-**2-2** を用い、微生物変換を再検討した。

はじめに、bcABA3 を導入した形質転換体 AO-bcABA3 を調製した。その代謝産物を GC-MS で分析したところ **2-2** を生産していたことから、大量スケールで培養することで、(*R*)-**2-2** を取得した (20 mg/kg 米培地)。調製した(*R*)-**2-2** を 3 種の形質転換体(AO-bcABA1、AO-bcABA2、AO-bcABA124)および麹菌野生株(AO-WT)へ投与し、その代謝産物を UPLC で分析した。AO-bcABA124 では ABA と少量の **2-6** が観測された。また、AO-bcABA1 では **2-4** と **2-6** への変換が観測された。一方で、AO-bcABA2、AO-WT では新たな代謝産物は観測されなかった(図 2-6-2 A)。

次いで、**2-4** を基質とした微生物変換を行った。この実験においても酵素による光学分割に関する議論を回避するため、(*R*)-**2-4** を用いて実験を行うことにした。(*R*)-**2-4** は AO-bcABA13 の異種生産でも取得できるものの、以前の実験から、長期間の培養では **2-4** が麹菌による酸化反応で **2-6** へと変換されることがわかっている。大量スケールでの培養では培養期間が長くなる傾向にあるため、本実験では AO-bcABA1 を用いた(*R*)-**2-2** の微生物変

換のスケールを大きくすることで(R)-2-4 を取得した (1.9 mg from 4.6 mg of 2-2)。 (R)-2-4 を用いた微生物変換の結果、AO-*bcABA2* では 2-5 への変換のみが観測され、ジアステレオマー 2-7 は観測されなかった。一方、AO-WT、AO-*bcABA1* では 2-6 への変換が観測された (図 2-6-2 B)。野生株においても 2-4 から 2-6 への酸化反応が進行したことから 2-6 はシャント化合物と予想されたが、*Cercospora rosicola* で提唱されているように [33]、2-6 の C6 位での酸化反応が進行する可能性も考えられた。そこで、2-6 が生合成中間体であるか調べるため、AO-*bcABA124* への投与実験を行った。その結果、ABA への変換が観測されなかったため、2-4 の酸化反応によって生成した 2-6 は生合成中間体ではないことが明らかになった (図 2-6-2 C)。2-4 から 2-6 の酸化反応は、内在性の酵素による副反応であると考えられる。同じような副反応の例としては、*paxiline* 異種生産時の加水分解 [34]、*solanapyrone* 異種生産時の酸化反応[35]などが報告されている (図 2-6-3)。

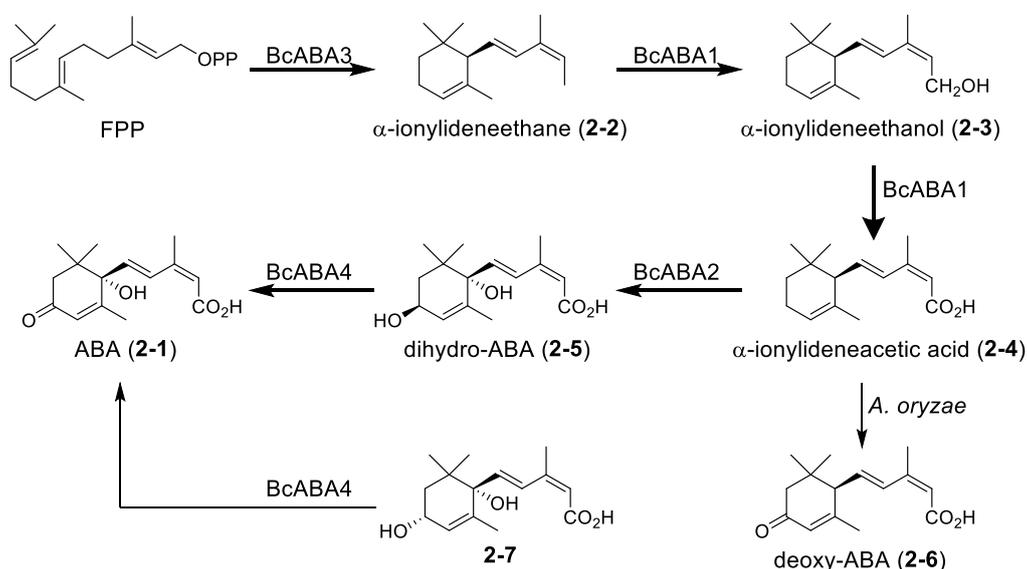


図 2-6-1. ABA 生合成経路

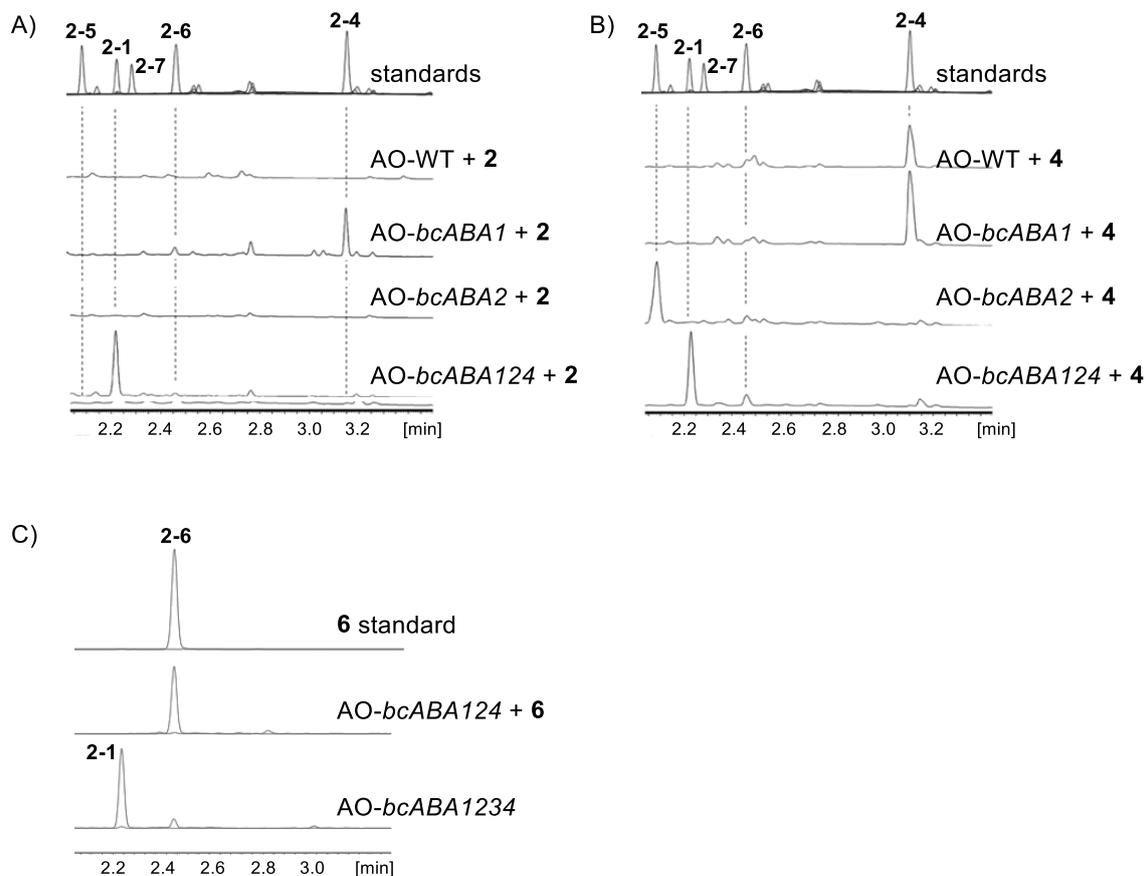


図 2-6-2. 修飾酵素遺伝子の機能解析の結果；

A) AO-*bcABA1*, AO-*bcABA2*, AO-*bcABA124* に対して **2-2** を投与した場合の UPLC 分析 ($\lambda = 260-280 \text{ nm}$)、

B) AO-*bcABA1*, AO-*bcABA2*, AO-*bcABA124* に対して **2-4** を投与した場合の UPLC 分析 ($\lambda = 260-280 \text{ nm}$)、

C) AO-*bcABA124* に対して **2-6** を投与した場合の LC-MS 分析 (m/z 247, 249)

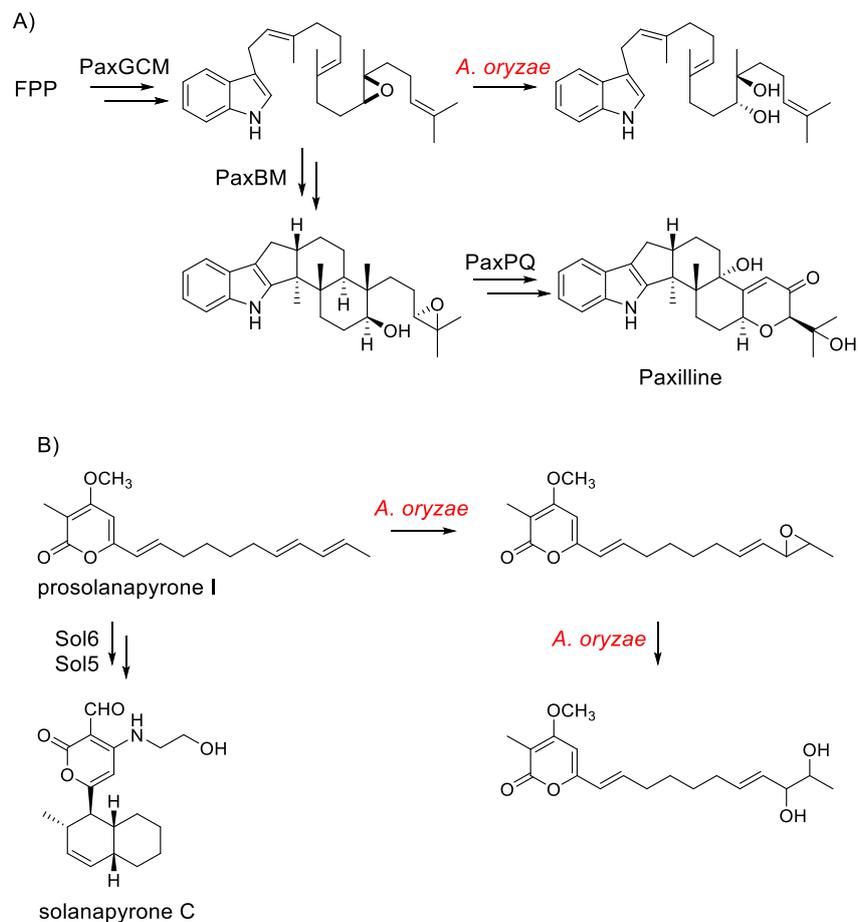


図 2-6-3. 発現宿主 *A. oryzae* による副反応の例； A) paxilline、B) solanapyrone

以上の実験結果から、BcABA1 は **2-2** の末端メチル基に対する 3 段階の酸化反応を触媒し、BcABA2 は **2-4** の 6 員環上の異なる位置への 2 段階の酸化反応を立体選択的に触媒することを改めて確認できた。当研究室の小崎による先行研究との相違点は、微生物変換に用いた基質の光学純度にあるが、AO-bcABA2 による **2-4** の酸化反応に着目すると、先行研究と比較して変換効率が向上していることがわかった (約 50%⇒100%、反応時間：6 時間)。このことから、BcABA2 は (*R*)-**2-4** を優先的に受容することを強く示唆することができた。また、先行研究から観測されていた **2-6** は生合成中間体ではないことを実験的に証明した (図 2-6-1) [36]。

一連の研究で明らかにした *B. cinerea* における ABA の生合成経路は、標識実験によって明らかにされた *Cercospora* 属糸状菌での ABA 生合成経路とは異なる。例えば、*C. rosicola* では、*B. cinerea* では生合成中間体ではない **2-6** が中間体であり [33]、*C. cruenta* では γ -ionylideneethane が生合成中間体であると推定されている [12] (図 2-6-4)。この経路の違いは、ABA 生合成酵素の活性部位におけるわずかな違いによるものと推定される。今後、*C. rosicola* や *C. cruenta* での ABA 生合成酵素の機能解析が行われて、その活性部位の構造を

比較すれば、生合成経路の違いがもたらされた原因について詳細な知見を得ることができると考えている。

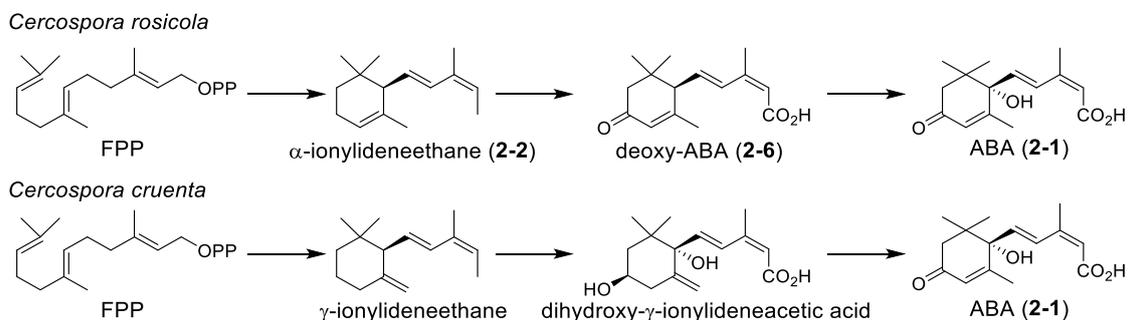


図 2-6-4. *Cercospora* 類における ABA の予想生合成経路

2-7. まとめ

糸状菌における植物ホルモンアブシジン酸の生合成研究では、遺伝子破壊実験や同位体標識前駆体の取り込み実験の結果から、生合成遺伝子クラスターおよび生合成中間体が推定されていた。また、当研究室における先行研究では、修飾酵素遺伝子発現麹菌を用いた推定中間体の微生物変換実験により、3種の修飾酵素の機能および反応する順序が明らかにされた。以上の成果により、骨格構築酵素の同定が ABA 生合成における最後の課題となった。

本章では、生合成遺伝子クラスター中の機能未知遺伝子 *bcABA3* を信頼性の高い異種発現手法によって機能解析を行い、*BcABA3* が従来のテルペン環化酵素とは相同性のない新規テルペン環化酵素として、ABA 生合成における骨格構築を担うことを明らかにした。*bcABA3* は先行研究の遺伝子破壊実験によって、ABA 生合成への関与が指摘されていたが、これまで機能解析されたどの酵素とも似ていないために、詳細な機能解析が報告されていなかった。また、本章での機能解析の結果、ABA 生産株の公開ゲノム配列と ABA 非生産株の配列がわずかに異なっていることがわかり、この配列の違いが機能解析を妨げていたと考えられる。

次いで、重水素標識 FPP を基質とした *in vitro* 酵素反応実験、*bcABA3* 発現大腸菌への中性中間体の *in vivo* 変換実験により、*BcABA3* が触媒する特異な環化機構を明らかにした。特に後者は、本研究で新たに開発した実験系であり、酵素反応に適さない中性分子を変換できるという特徴をもつ。この手法は、中性分子の関与が示唆されている *aristolochene synthase* (中性分子: *germacrene*) のような他環化酵素の反応機構の解析においても有効である。

また、25種の *BcABA3* 変異体の代謝産物分析によって、新規テルペン環化酵素の活性部位の推定に成功した。*AlphaFold2* による予測構造から、推定活性部位の妥当性が示された。さらなる解析により、新しい金属結合モチーフとして実証することで、新規テルペン環化酵素や新規テルペノイドの発見が期待される。

以上、本章の実験では、ABA 生合成において最大の謎であった骨格構築酵素の発見に成功し、その反応機構の提唱や活性部位の推定を達成した。また、4 遺伝子を麹菌に導入することで、ABA の異種生産にも成功した。既に明らかにされていた植物での ABA 生合成は 12 酵素が必要であることと比較すると、生合成に関与する酵素の数が少なく、ABA の異種生産などへの応用も期待できる。また、既知酵素と相同性のない新規テルペン環化酵素を発見したことによって、BcABA3 ホモログの探索による新規天然物の取得などにつながると期待される。

参考文献

- [1]: 勝見允行、**1991** 年、裳華房、植物のホルモン
- [2]: W. C. Liu, H. R. Carns, *Science* **1961**, *134*, 384.
- [3]: Y. Kobayashi, H. Tanaka, *Kagaku to Seibutsu*, **2017**, *55*, 4, 256.
- [4]: A. Katayama-Ikegami, M. Gao-Takai, R. Shimada, K. Matsuda, T. Sakamoto, *Hort Res.* **2017**, *16*, 3, 317.
- [5]: a) F. Hauser, R. Waadt, J. I. Schroeder, *Curr Biol*, **2011**, *21*, 346. b) W. Hartung, *Funct Plant Biol*, **2010**, *37*, 806. c) M. Magnone, S. Bruzzone, L. Guida, G. Damonte, E. Millo, S. Scarfi, C. Usai, L. Sturla, D. Palombo, A. D. Flora, E. Zocchi, *J. Org. Chem.* **2009**, *284*, 17808.
- [6]: W. T. Frankenberger, M. Arshad, *Phytohormones in soils microbial production and function.* **1995**
- [7]: C. A. Spence, H. Bais, *Curr Opin Plant Biol*, **2015**, *27*, 52.
- [8]: C. A. Spence, V. Lakshmanan, N. Donofrio, H. P. Bais, *Front Plant Sci*, **2015**, *6*, 1.
- [9]: M. Seo, T. Koshiba, *TRENDS in Plant Science*, **2002**, *7*, 41.
- [10]: N. Hirai, M. Okamoto, K. Koshimizu, *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 8, 1865.
- [11]: N. Hirai, R. Yoshida, Y. Todoroki, H. Ohigashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 7, 1448.
- [12]: M. Inomata, N. Hirai, R. Yoshida, H. Ohigashi, *Phytochemistry*. **2004**, *65*, 414.
- [13]: V. Siewers, J. Smedsgaard, P. Tudzynski, *Appl. Environ. Microbiol.* **2004**, *70*, 3868.
- [14]: V. Siewers, L. Kokkelink, J. Smedsgaard, P. Tudzynski, *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 4619.
- [15]: T. Kozaki, Master thesis, Hokkaido University, **2017**.
- [16]: B. V. Milborrow, M. Garmston, *Phytochemistry*, **1973**, *12*, 1597.
- [17]: a) M. Kwon, S. A. Cochrane, J. C. Vederas, D. K. Ro, *FEBS Lett*, **2014**, *588*, 4597. b) E. Y. Shishova, L. D. Costanzo, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 1941.
- [18]: I. Izquierdo-Bueno, V. E. Gonzalez-Rodriguez, A. Simon, B. Dalmais, J. Pradlier, P. L. Pecheur, A. Mercier, A. Walker, C. Garrido, I. G. Collado, M. Viaud, *Environ. Microbiol.* **2018**,

20, 2469.

- [19]: B. Felicetti, D. E. Cane, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *126*, 7212.
- [20]: a) M. Kubota, M. Nodate, M. Yasumoto-Hirose, T. Uchiyama, O. Kagami, Y. Shizuri, N. Misawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, *12*, 2421. b) E. V. Brinkman, K. Schipper, N. Bongaerts, M. J. Voges, A. Abate, S. A. Wahl, *J. Vis. Exp.* **2012**, *68*, 4182.
- [21]: D. E. Cane, Y. S. Tsantrizos, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10037.
- [22]: K. A. Rising, C. M. Starks, J. P. Noel, J. Chappell, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1861.
- [23]: T. Kuzuyama, T. Shimizu, S. Takahashi, H. Seto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 7913.
- [24]: C. Nakano, S. Horinouchi, Y. Ohnishi, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 27980.
- [25]: S. S. Shinde, A. Minami, Z. Chen, T. Tokiwano, T. Toyomasu, N. Kato, T. Sassa, H. Oikawa, *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 632.
- [26]: P. M. Dewick, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19*, 181.
- [27]: J. Takino, T. Kozaki, Y. Sato, C. Liu, T. Ozaki, A. Minami, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12392.
- [28]: F. X. Cunningham, B. Pogson, Z. Sun, K. A. McDonald, D. DellaPenna, E. Gantt, *Plant Cell*, **1996**, *8*, 1613.
- [29]: S. Nagamine, C. Liu, J. Nishishita, T. Kozaki, K. Sogahata, Y. Sato, A. Minami, T. Ozaki, C. Schmidt-Dannert, J. Maruyama, H. Oikawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, *15*, 409.
- [30]: a) W. Cheng, W. Li, *Science*, **2014**, *343*, 878. b) Y. Yang, Y. Zhang, S. Zhang, Q. Chen, K. Ma, L. Bao, Y. Tao, W. Yin, G. Wang, H. Liu, *J. Nat. Prod.* **2018**, *81*, 1089.
- [31]: M. Fujihashi, T. Sato, Y. Tanaka, D. Yamamoto, T. Nishi, D. Ueda, M. Murakami, Y. Yasuno, A. Sekihara, K. Fuku, T. Shinada, K. Miki, *Chem. Sci.* **2018**, *9*, 3754.
- [32]: T. Tomita, S. Y. Kim, K. Teramoto, A. Meguro, T. Ozaki, A. Yoshida, Y. Motoyoshi, N. Mori, K. Ishigami, H. Watanabe, M. Nishiyama, T. Kuzuyama, *ACS Chem. Biol.* **2017**, *12*, 1621.
- [33]: H. Yamamoto, M. Inomata, S. Tsuchiya, M. Nakamura, T. Oritani, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, *12*, 2644.
- [34]: K. Tagami, C. Liu, A. Minami, M. Noike, T. Isaka, S. Fueki, Y. Shichijo, H. Toshima, K. Gomi, T. Dairi, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260.
- [35]: R. Fujii, T. Ugai, H. Ichinose, M. Hatakeyama, T. Kosaki, K. Gomi, I. Fujii, A. Minami, H. Oikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 426.
- [36]: J. Takino, T. Kozaki, T. Ozaki, C. Liu, A. Minami, H. Oikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2019**, *83*, 1642.

3-1. 緒言

3-1-1. 糸状菌由来ポリケタイド天然物

ポリケタイド系天然物は糸状菌やバクテリア、植物が生産する天然物の一群である。糸状菌由来のポリケタイド天然物に着目すると、*Aspergillus terreus* より単離されたコレステロール低下剤である lovastatin [1]、*Fusarium solani* から単離され免疫抑制剤として用いられている cyclosporin A [2]のような医薬品や、T-toxin [3]、aflatoxin [4]、fumonisin [5]のような毒素、糸状菌の腺房形成を阻害する fusarisetin などが知られている。こうした多彩な生物活性は、本化合物群がもつ多様な化学構造に起因している。ポリケタイド系天然物は、多様な骨格構造や生物活性から合成化学者も注目する興味深い天然物群である。

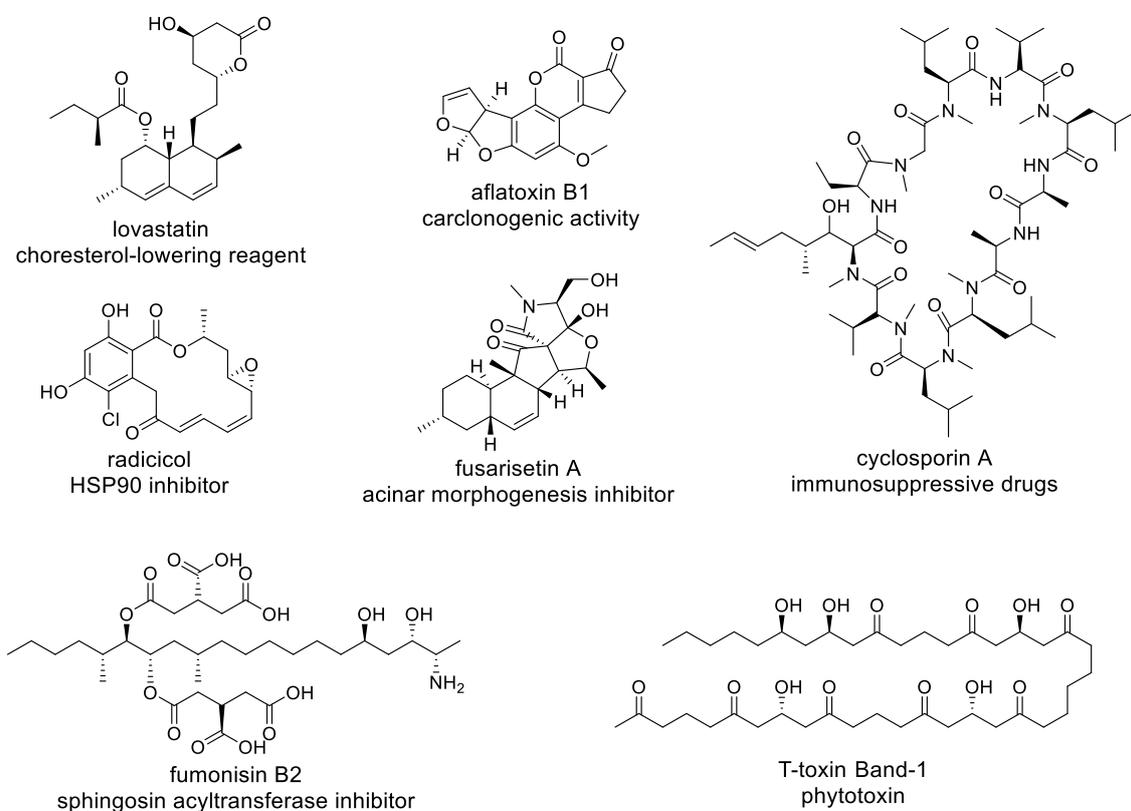


図 3-1-1. 糸状菌由来ポリケタイド系天然物と生物活性

3-1-2. ポリケタイド合成酵素

ポリケタイド系天然物の炭素骨格は、脂肪酸の生合成と同様、アセチル CoA（開始単位）、マロニル CoA（伸長単位）といった酢酸ユニットが Claisen 縮合によりβ-ケトチオエステルへと変換された後、β位ケトンに対する修飾反応（還元、脱水、エノイル還元）が進行することで生合成される。この反応を触媒する酵素をポリケタイド合成酵素（PKS）と呼ぶ。本酵素は、それぞれの反応を触媒する機能単位（ドメイン）から構成される巨大酵素である。以下に、6つのドメインの名称と機能をまとめる。

KS (ketosynthase) : 伸長単位の脱炭酸と、それに伴うクライゼン縮合を触媒
 AT (ACP transacylase) : 伸長単位を ACP 上にロードする
 DH (dehydratase) : KR によって生じたβ-ヒドロキシケトンの脱水反応を触媒
 ER (enoylreductase) : DH によって生じたα,β-不飽和カルボニルの還元反応を触媒
 KR (β-ketoreductase) : KS によって生じたβ位ケトンの還元反応を触媒
 ACP (acyl carrier protein) : ポリケタイド鎖とチオエステルを結合し、各ドメインに運搬

KS、AT、ACP は脂肪酸合成酵素 (FAS)、PKS の炭素鎖伸長における最小単位であり、必須ドメインである。一方で修飾反応を触媒する KR、DH、ER は、FAS においては最小単位と同様に炭素鎖伸長の際に必ず機能するのに対し、PKS では任意に機能するため、ポリケタイド鎖上に水酸基や二重結合が残される [6]。また、PKS には C-メチル化を触媒する MT (methyl transferase) ドメインが存在する例も知られており、ポリケタイド鎖上にメチル基が導入される場合がある。

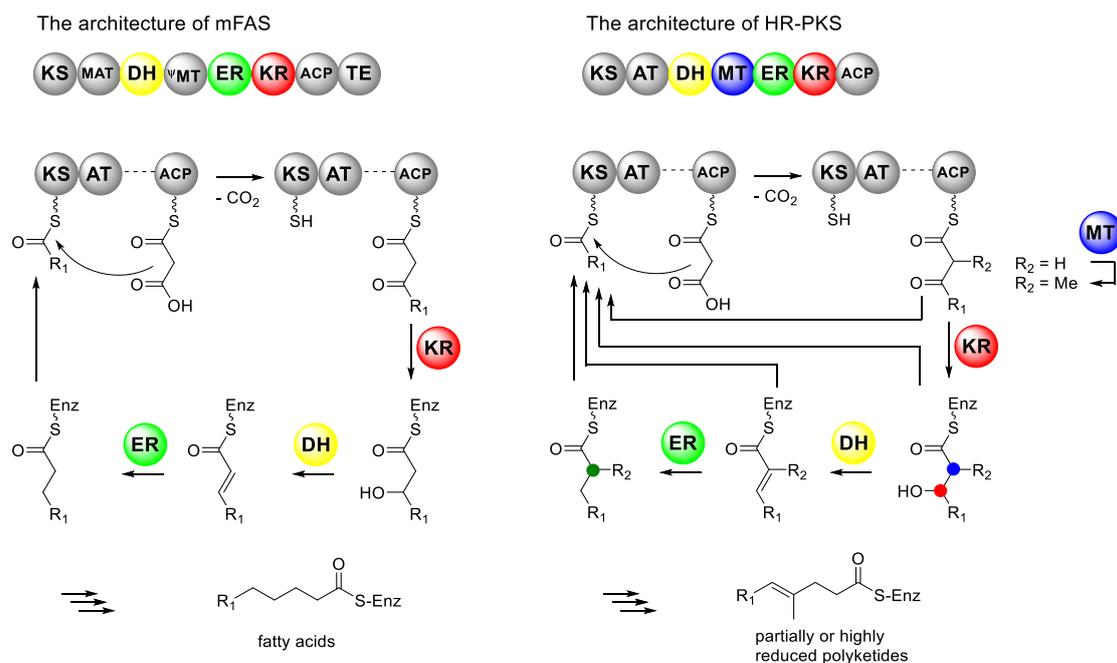


図 3-1-2. 炭素鎖伸長機構

左) FAS のモジュールと反応機構、右) HR-PKS のモジュールと反応機構

PKS は、上述したドメインの構造を基に、大きく Type I、II、III の 3 つに分けられている。Type I の PKS は炭素鎖の伸長に関わる全てのドメインが 1 本のポリペプチドとして存在するのに対し、Type II では各ドメインが 1 つのポリペプチドとして独立しており、Type III の PKS は 1 つのドメインが単純な縮合を繰り返す。本研究ではこのうち、多くの糸状菌ポリケタイドの生合成に関与する Type I PKS に注目した。

Type I PKS は、放線菌などの細菌にみられるマルチモジュラー型と糸状菌などに存在する繰返し型に分類できる。マルチモジュラー型の PKS は、1 サイクルの縮合と続く修飾反応を触媒する上述した機能ドメインから構成されるモジュールが連結した巨大酵素である。一般に、マルチモジュラー型 PKS では、一つのドメインは一回しか働かないため、モジュールの順番とそれを構成するドメインの機能に応じたポリケタイド鎖が構築される [7] (図 3-1-3)。

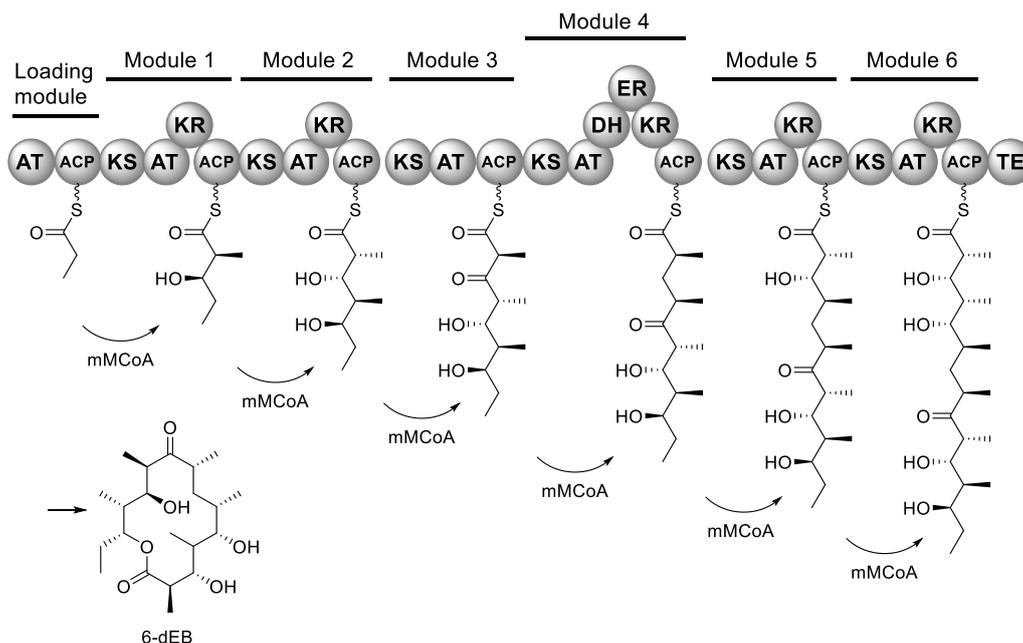


図 3-1-3. バクテリアのマルチモジュラー型 PKS が触媒する炭素鎖伸長機構

糸状菌の繰返し型 PKS は、1つのモジュールのみによって構成され、単一のドメインが繰返し利用されてポリケタイド鎖を構築する。また、生合成されるポリケタイド鎖の還元の有無によって、nonreducing PKS (NR-PKS)、partial-reducing PKS (PR-PKS)、highly reducing PKS (HR-PKS)とさらに細かく分類される [8]。中でも HR-PKS は、基本的に FAS と類似したドメインによって構成され、上述したβ位の修飾反応を担う還元ドメインを有する。しかし、FAS では炭素鎖伸長過程において、1回の炭素鎖伸長サイクルの中ですべてのドメインが利用され飽和脂肪酸を形成するのに対し、HR-PKS では伸長過程で生成する中間体が以降の反応を受けずに次の伸長サイクルの基質として利用されることや、MT ドメインによるメチル化が触媒されることでカルボニルのα位やβ位に置換基をもつポリケタイド鎖が形成される。また、FAS との相違点として、1) モジュール内の ER ドメインが機能せず、独立した酵素 (trans-ER)が骨格構築に関与する場合があること、2) 炭素鎖の酵素からの解離機構に幾つかのパターンがあることを挙げる事ができる。後者については、FAS では C 末端に位置する TE (thioesterase) ドメインによって炭素鎖が酵素から切り出されるが、

HR-PKS では独立した TE ドメインが触媒する場合や、PKS と融合した非リボソーム合成酵素 (NRPS)がアミノ酸との縮合によりポリケタイド鎖を酵素から切り離す場合がある。

3-1-3. HR-PKS の立体配置制御

HR-PKS では、任意の伸長過程において炭素鎖伸長過程における修飾過程がスキップされるため、構造的に多様かつ不斉中心が残ったポリケタイドを合成する [8,9]。上述したように、1つのドメインが繰り返し利用されることから、その厳密な炭素鎖伸長機構を解明すべく、活発に研究が進められている。一方、生成したポリケタイド鎖には反応の過程で導入される置換基に由来する複数の不斉中心があるにもかかわらず、各ドメインが触媒する反応の立体選択性については、ほとんど議論されてこなかった。同位体標識した前駆体の投与や、組換えタンパク質を用いた *in vitro* の酵素反応により、個々の HR-PKS の立体制御機構が報告されているものの [10]、私の知る限りにおいて、構造的・生合成的に関連するポリケタイドの構築を担う HR-PKS の集中的な解析が行われていないため、HR-PKS の立体制御機構について統一的な理解には至っていない。また、天然物の最終構造から HR-PKS 各ドメインの立体選択性を解釈することも難しい。これは、1) KR ドメインによって導入される水酸基の立体化学は炭素鎖伸長過程で失われ、単純なポリエーテルや置換基の少ない飽和脂肪酸が得られることが多い、2) PKS の反応後に行われる酸化反応でも酸素官能基が導入されるため、天然物の構造から酸素原子の由来を特定することが困難である、3) 1つの KR ドメインが異なる立体配置の水酸基を与える場合があるためである (図 3-1-4)。

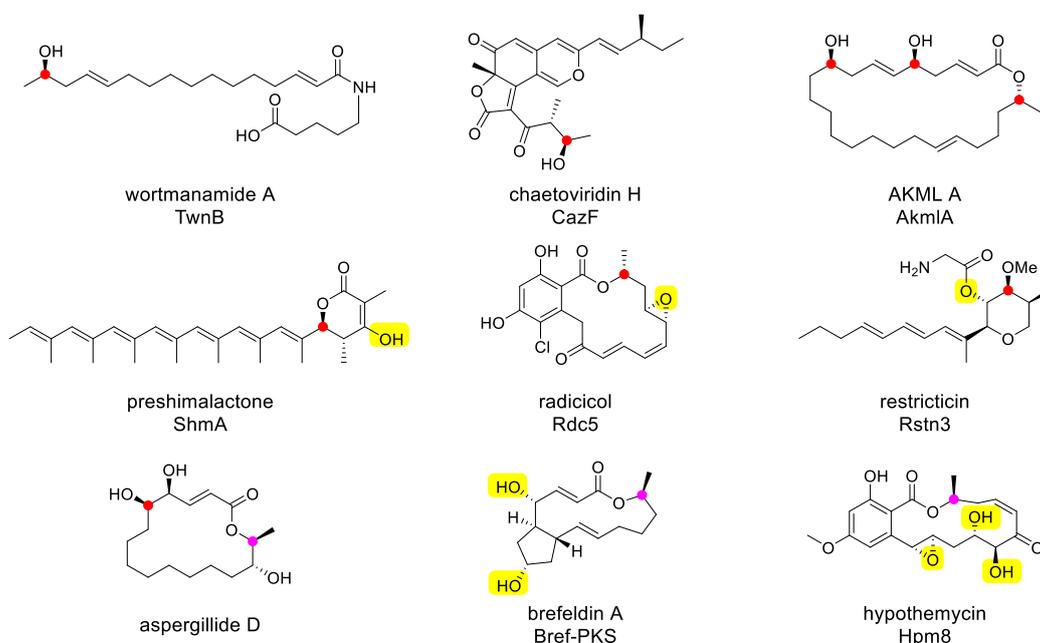


図 3-1-4. 糸状菌 HR-PKS が生産する天然物の構造と対応する HR-PKS

赤：R 配置の水酸基、桃：S 配置の水酸基、黄：修飾酵素により導入された酸素官能基

本章では、「一つのドメインが繰り返し利用されているならば、HR-PKS の各ドメインによって導入される置換基に由来する絶対立体配置は同じである」という仮定の下、各ドメインのもつ立体選択性に着目して研究を行った。上述した問題点を考慮し、複数の不斉中心が存在する phialotide A (**3-1**) [11]や phomenoic acid (**3-2**) [12]、ACR-toxin (**3-3**) [13]などのポリヒドロキシポリケタイドを研究対象とし、以下の戦略に則って研究を進めた。

- 1) 短時間で制御則を見出すために、PKS によって生成するポリヒドロキシ骨格を持つ天然物に注目した。数種の HR-PKS の機能解析から規則を導出し、同一分子内に導入されている置換基 において矛盾がないことを示す。(3-2-1~3-4-1)
- 2) 系統樹解析で HR-PKS を分類し、特定のグループの中に規則に反する機能を持つ HR-PKS がないことを示す。(3-4-2~3-4-3)
- 3) グループを拡大して提唱した規則に反する機能が推定されている HR-PKS を見つけ、その機能が人為的なエラーによって誤って導き出された機能であることを示し、その排除の重要性を指摘する。(3-4-3)
- 4) 人為的なエラーを最大限除去した HR-PKS の解析例をなるべく多く集め、HR-PKS 全体としても規則に矛盾がないことを示す。(3-4-4)
- 5) 最後にどんな規則にも例外が存在するが、例外と考えられる HR-PKS の産物にある置換基の立体配置を比較し、例外が起こりやすい場所を特定し、限定的であることを示す。(3-4-5)

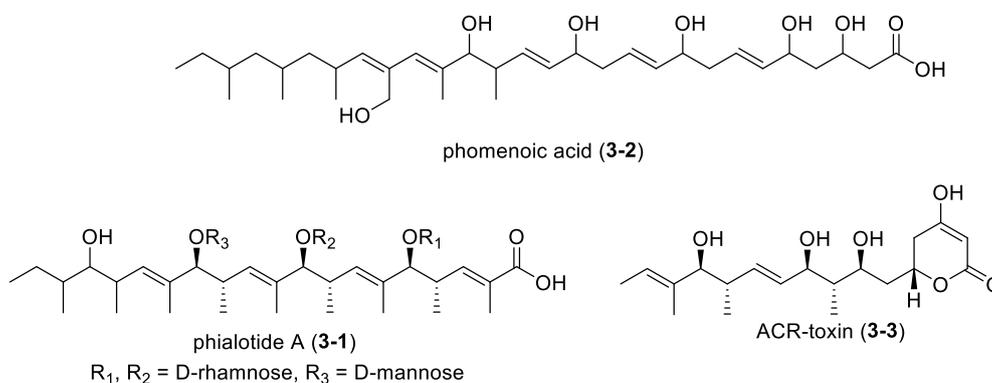


図 3-1-5. 本章で標的としたポリヒドロキシポリケタイドの構造

3-2. phialotide 生合成における HR-PKS の立体制御

3-2-1. phialotide 生合成遺伝子クラスターの探索

直鎖ポリヒドロキシポリケタイドは、先述した **3-1** や **3-2** のほかに、cubensis acid [14]や TMC-171C [15]などが単離報告されている。これらは、水酸基や *E*-オレフィン、分岐メチル基がポリケタイド鎖上に規則的に配置される特徴的な構造を持つ。このうち、**3-2** については生合成研究が報告されており、遺伝子サイレンシング実験によって、**3-2** 生合成に関わる

と推定される HR-PKS (PKS2)が同定された (図 3-2-1) [16]。本章では、生成する天然物と対応させるために PKS2 を *phomA* と命名した。*phomA* の周辺には trans-ER (*phomB*)、シトクロム P450 (*phomE*)、機能未知遺伝子 (*phomD*)、転写因子の 4 種が位置している。定量逆転写 PCR 実験による発現プロファイル解析によって、*phomBDE* の発現パターンが骨格構築酵素遺伝子 *phomA* の発現パターンと類似していたため、*phomABDE* が **3-2** 生合成に関与することが示唆された。化合物 **3-2** と **3-1** の構造類似性を考慮すると、**3-1** 生合成遺伝子クラスター (BGC)には *phom* 遺伝子クラスターの骨格構築酵素遺伝子および修飾酵素遺伝子と相同性をもつ遺伝子の組み合わせが保存されていると考えた。

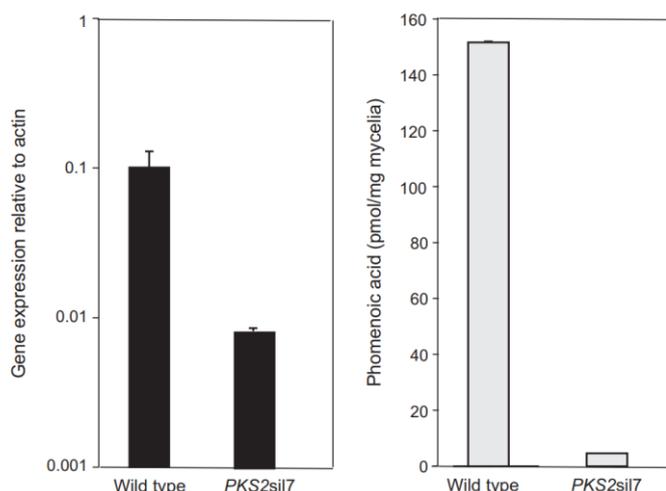


図 3-2-1. 遺伝子サイレンシング実験による phomenoic acid 生合成 HR-PKS の同定
 左) 野生株と PKS2 欠損株でのアクチン遺伝子の発現量比較
 右) phomenoic acid 生産量の比較 [16]より引用

以上の知見を踏まえ、**3-1** 生合成遺伝子を探索した。**3-1** 生産菌である *Pseudophialophora* sp. [11]のゲノム DNA を抽出し、ドラフトゲノムシーケンスを行った。得られたデータに対して、**3-2** 生合成に関与する HR-PKS である *phomA* を指標とし、Local Blast 検索を行った。その結果、*phomA* と高い相同性を示す HR-PKS (*phiaA*: 59% identity)を含む遺伝子クラスターが見つかった。*phiaA* 周辺の遺伝子の機能を、翻訳したアミノ酸配列の保存領域を Pfam で解析する Web ツール 2ndFind (<http://biosyn.nih.go.jp/2ndfind/>)で解析した。その結果、周辺には *phom* 生合成遺伝子クラスターでもみられる t-ER (*phiaB*: 63%)、シトクロム P450 (*phiaE*: 46%)、機能未知遺伝子 (*phiaD*: 48%)が位置していた。これに加えて、NRPS 様酵素遺伝子 (*phiaC*)が存在した(図 3-2-2)。NRPS 様酵素遺伝子は先行研究で注目されていなかったが、*Stagonospora nodorum* や *Metharhizium acridum* にみられる相同な BGC で保存されている [16]。以上から、本研究では *phiaA-E* が **3-1** 生合成に関与する候補であると考えた。

Gene	bp	Typical homology [organism]	Accession	Identity/ Similarity (%)	Homologous plpho enzyme genes (identity/similarity (%))
phiaA	1833	hypothetical protein GGTG_02434 [Gaeumannomyces tritici R3-111a-1]	XP_009218470.1	70/81	phomA (59/75)
phiaB	1010	uncharacterized protein K452DRAFT_292610 [Aplosporella prunicola CBS 121167]	XP_033391914.1	69/81	phomB (63/78)
phiaE	1206	uncharacterized protein K452DRAFT_280347 [Aplosporella prunicola CBS 121167]	XP_033391913.1	46/58	phomE (35/49)
phiaD	2374	hypothetical protein GGTG_14235 [Gaeumannomyces tritici R3-111a-1]	XP_009230426.1	48/60	phoD (42/55)
phiaC	2722	hypothetical protein DL767_000545 [Monosporascus sp. MG133]	RYP42033.1	43/58	phoC (39/53)

図 3-2-2. phialotide 生合成遺伝子クラスター (*phia* BGC)

3-2-2. phialotide 生合成遺伝子クラスターの異種発現

HR-PKS の立体選択性を理解するためには、HR-PKS の直接的な生成物であるポリケタイド鎖を単離する必要がある。これには、細胞内という複雑系であるにもかかわらず、HR-PKS の機能に応じたポリケタイド鎖を生産する麹菌異種発現系が効果的である。そこで、前節 3-2-1 で特定した *phia* 遺伝子を麹菌での異種宿主発現に供し、構築した形質転換体の代謝産物を単離・構造決定することにした。ポリケタイド骨格の生産に関与すると予想された骨格構築酵素遺伝子 *phiaA*、*B* に加え、*phom* 遺伝子クラスターやホモログ遺伝子クラスターで保存されている *phiaC*、*D* を麹菌ホットスポットノックイン用ベクター pDP801、pDP201 にそれぞれ導入した。シトクロム P450 遺伝子 *phiaE* は、骨格形成後の酸化反応を触媒することが予想されるため、本研究では導入遺伝子の候補から除いた。構築したプラスミドをプロトプラスト-PEG 法にて麹菌に導入し、形質転換体 AO-*phiaABCD*、AO-*phiaABC*、AO-*phiaAB*、AO-*phiaAC* を得た。

得られた形質転換体を、MPY 液体培地で培養し代謝産物を抽出した。粗抽出物を LC-MS で分析したところ、AO-*phiaABCD* において野生株 (WT) には見られない新たなピーク **3-4** が確認された。化合物を単離し、HR-MS 分析により分子式を $C_{29}H_{50}O_6$ と決定した。分子式より、本化合物は天然物 **3-1** のアグリコンに相当すると推測された。 1H 、 ^{13}C -NMR スペクトルを **3-1** のスペクトルと比較したところ、カルボニル炭素 (δ_C : 171.9)、オレフィンプロトン (δ_H : 6.78, 5.38, 5.33, 5.33)、オキシメチンプロトン (δ_H : 3.80, 3.70, 3.20, 3.20)、アリル位のメチルプロトン (δ_H : 1.85, 1.68, 1.68, 1.68) に相当するシグナルが良く一致していた。HMBC、HSQC 解析から **3-1** と同じ炭素骨格を有していることがわかり、その平面構造を決定した。また、MS²、MS³ 解析では、*m/z* 403, 305, 207 を示すフラグメントイオンピークが観測された。これらは、分子量から、アリル位で切断されたフラグメントイオンピークだと推測され、繰り返し構造を反映していた。以上のことから、MSⁿ 解析は、後に述べる類縁体 **3-5** などの構造決定の際に有効であることがわかった。また、取得した prophialotideA (**3-4**) は **3-1** がもつすべての酸素官能基とメチル基を備えていたことから、これらの置換基は PhiaA と PhiaB によって導入されることがわかった。

他の形質転換体の粗抽出物についても LC-MS 分析に供したところ、**trans-ER** である *phiaB* を導入していない **AO-*phiaAC*** では **3-4** の代わりに $C_{29}H_{48}O_6$ の分子式を示す新たなピーク **3-5** が確認された。これは **3-4** より水素原子が 2 個分少ない分子式であり、**trans-ER** が二重結合の還元反応を触媒するということを考慮すると、不飽和結合が 1 つ多い構造であることが推定された。 1H -NMR スペクトルを比較した結果、先述した主要なシグナルは **3-4** とよい一致を示していた。また、末端メチルプロトンのシグナル (δ_H : 0.95) が消失し、代わりにオレフィンプロトン (δ_H 5.30)、アリル位のメチルプロトン (δ_H : 1.70, 1.70) に相当するシグナルが観測されたことから、**C18-19** 位に不飽和結合が残った構造であることがわかった。また、**2D-NMR** においても、推定構造は支持された。**3-5** についても MS^2 , MS^3 解析を行った結果、**3-4** と同様に繰り返し構造が反映されたフラグメントイオンピークが観測された。 MS^3 解析では m/z 107.1 の質量を示すフラグメントピークが観測されたことから、メチル末端の二重結合が **3-4** と比較して一つ多いことが支持された。このように質量分析によって、天然物の構造情報を得ることが可能であり、微量成分を用いた構造推定として有効であることが示された。この化合物は、**dehydroprophialotide A (3-5)** と命名した。また、**AO-*phiaABC*** では **3-4** が観測されたが、**AO-*phiaAB*** では **3-4** が観測されなかった。この結果より、機能未知遺伝子 *phiaD* は、**3-4** の生産に必須でないこと、NRPS 様酵素遺伝子 *phiaC* が **3-4** 生合成に必須であることが考えられた。

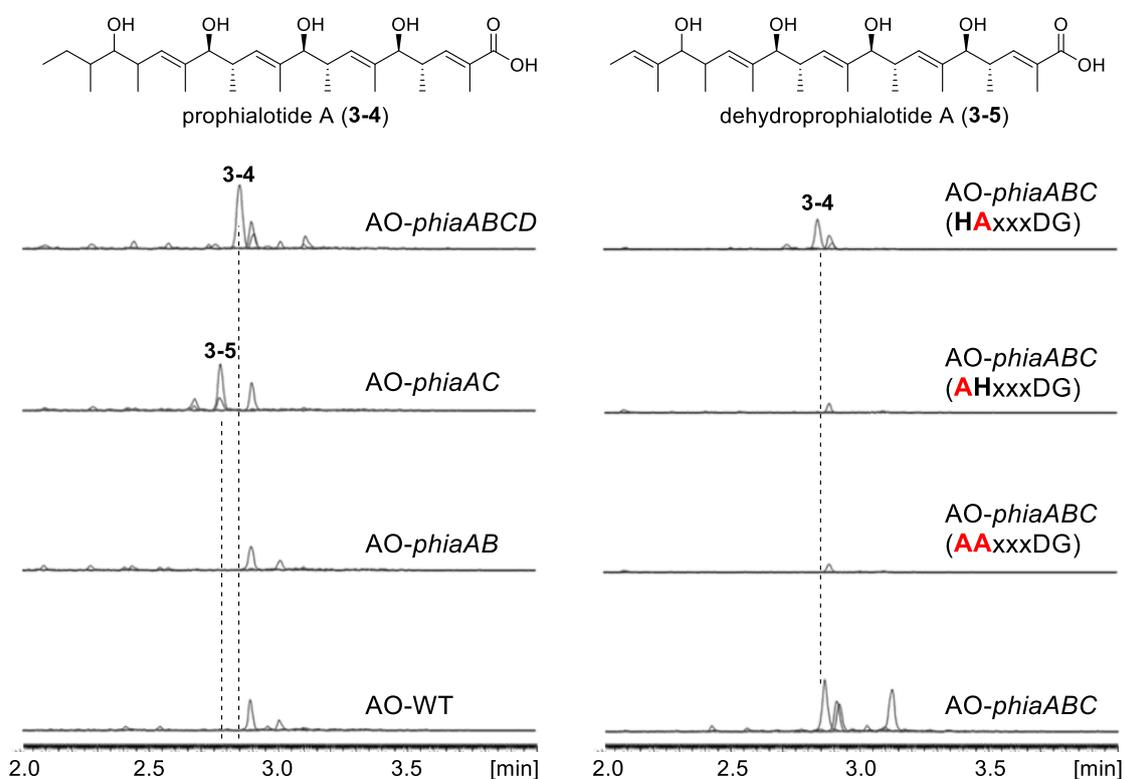
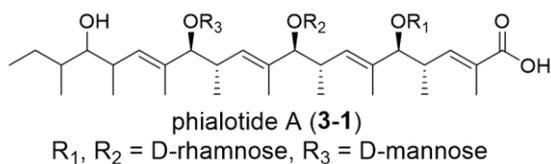
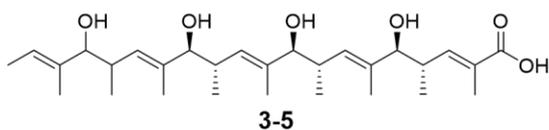
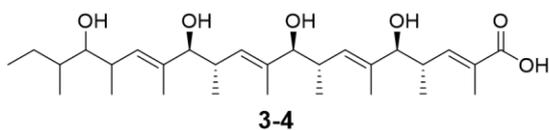
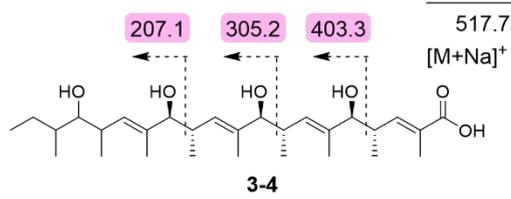


図 3-2-3. 麹菌形質転換体より抽出した代謝産物の UPLC-MS 分析結果 (ESI⁺, m/z 515, 517)



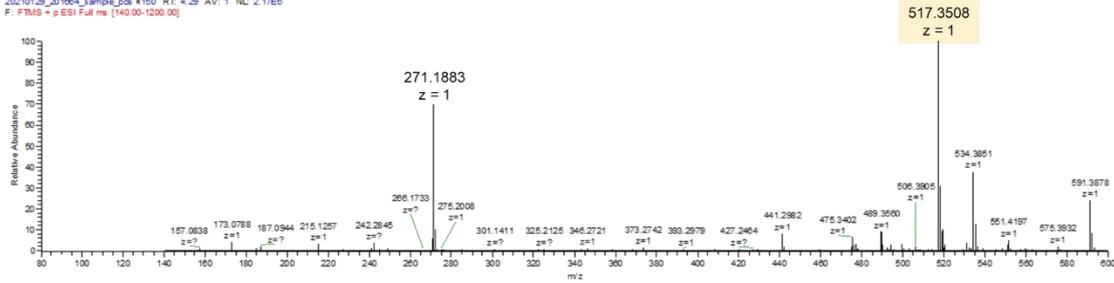
3-4 (methanol-d ₄)			3-5 (methanol-d ₄)			3-1 (methanol-d ₄)		
	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)		δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)		δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)
1	171.9	-	1	171.3	-	1	171.7	-
2	128.9	-	2	129.0	-	2	129.2	-
3	147.6	6.78 (d, 9.8)	3	147.7	6.76 (d, 9.7)	3	147.3	6.65 (dd, 9.8, 1.5)
4	38.0	2.75 (m)	4	38.5	2.8 (m)	4	37.0	2.81 (m)
5	83.9	3.8 (d, 8.6)	5	82.0	4.04 (d, 10.1)	5	87.4	3.78 (d, 9.1)
6	137.1	-	6	134.0	-	6	132.1	-
7	133.6	5.33 (d, 9.3)	7	135.0	5.3 (m)	7	139.2	5.36 (dd, 9.2, 1.0)
8	37.0	2.65 (m)	8	38.0	2.75 (m)	8	35.4	2.75 (m)
9	84.3	3.7 (d, 6.7)	9	84.2	3.81 (d, 8.8)	9	88.3	3.73 (d, 9.7)
10	137.4	-	10	134.0	-	10	132.4	-
11	134.0	5.33 (d, 9.3)	11	135.0	5.30 (m)	11	139.1	5.26 (dd, 9.7, 1.0)
12	36.7	2.65 (m)	12	37.0	2.65 (m)	12	35.4	2.75 (m)
13	84.1	3.20 (m)	13	84.5	3.72 (d, 8.6)	13	90.4	3.75 (d, 9.7)
14	137.7	-	14	134.0	-	14	133.1	-
15	132.9	5.38 (d, 9.7)	15	138.0	5.30 (m)	15	136.6	5.46 (dd, 9.9, 1.0)
16	36.6	2.65 (m)	16	37.0	2.65 (m)	16	36.6	2.70 (m)
17	79.4	3.20 (m)	17	84.5	3.67 (d, 5.7)	17	79.4	3.24 (t, 5.3)
18	38.3	1.52 (m)	18	123.0	-	18	39.4	1.44 (m)
19	27.8	1.28 (m), 1.48 (m)	19	134.0	5.30 (m)	19	27.3	1.46 (m), 1.18 (m)
20	12	0.95 (t, 7.8)	20	12.0	1.70 (d, 7.2)	20	11.9	0.92 (t, 7.6)
2-Me	12.8	1.85 (s)	2-Me	12.8	1.90 (s)	2-Me	12.9	1.86 (d, 1.5)
4-Me	16.8	0.85 (d, 6.6)	4-Me	14.5	0.86 (m)	4-Me	16.8	0.87 (d, 7.1)
6-Me	11.2	1.68 (s)	6-Me	11.5	1.66 (s)	6-Me	10.8	1.63 (d, 1.0)
8-Me	17.8	0.82 (m)	8-Me	17.5	0.81 (m)	8-Me	17.8	0.81 (d, 6.9)
10-Me	11.4	1.68 (s)	10-Me	11.5	1.62 (s)	10-Me	11.0	1.60 (d, 1.0)
12-Me	17.7	0.8 (m)	12-Me	17.5	0.81 (m)	12-Me	17.4	0.78 (d, 7.2)
14-Me	11.6	1.68 (s)	14-Me	13.5	1.65 (s)	14-Me	10.8	1.62 (d, 1.0)
16-Me	18	0.95 (d, 7.8)	16-Me	14.5	0.92 (d, 7.0)	16-Me	18.3	0.98 (d, 7.1)
18-Me	13.5	0.95 (d, 7.8)	18-Me	12.0	1.70 (s)	18-Me	14.5	0.95 (d, 6.7)

図 3-2-4. prophialotide A (**3-4**)、dehydroprophialotide A (**3-5**)、phialotide A (**3-1**)の ^1H , ^{13}C -NMR スペクトル

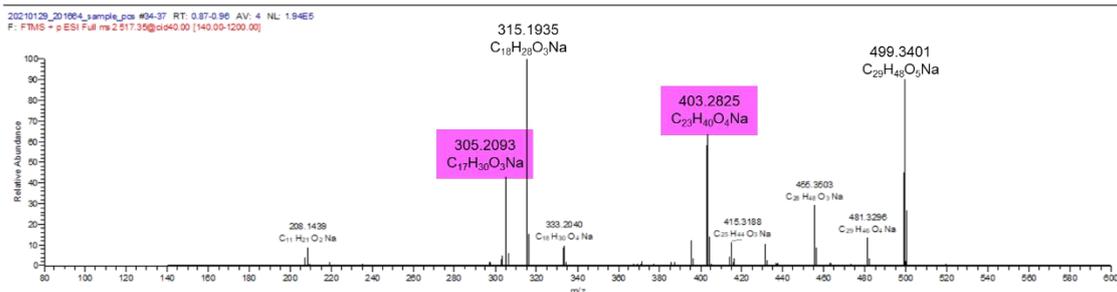


MS spectrum of 3-4

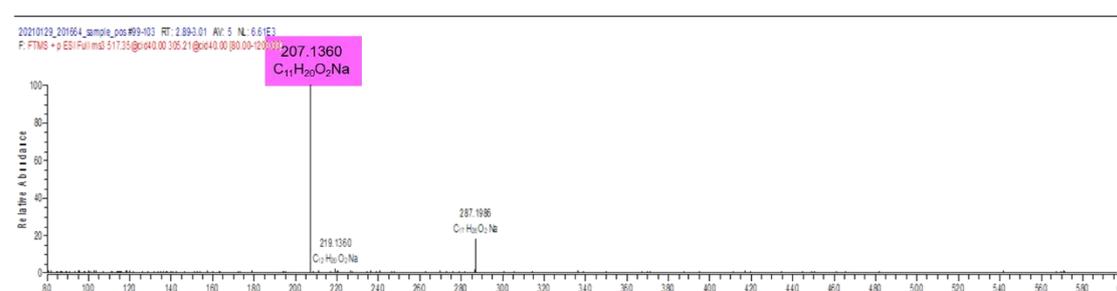
Data_No_Sample name: 20210129_201664_sample_pos
 Operator name: oka seiko
 Comment:
 Instrumental Analysis Div., Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University
 Inst name: LTQ Orbitrap XL
 Time stamp: 01/29/21 09:48:26
 Source Voltage (KV):
 Capillary Voltage (V):
 Tube Lens Voltage (V):
 Flow Rate:



MS² spectrum (precursor ion: m/z 517)



MS³ spectrum (precursor ion: m/z 305)



MS³ spectrum (precursor ion: m/z 403)

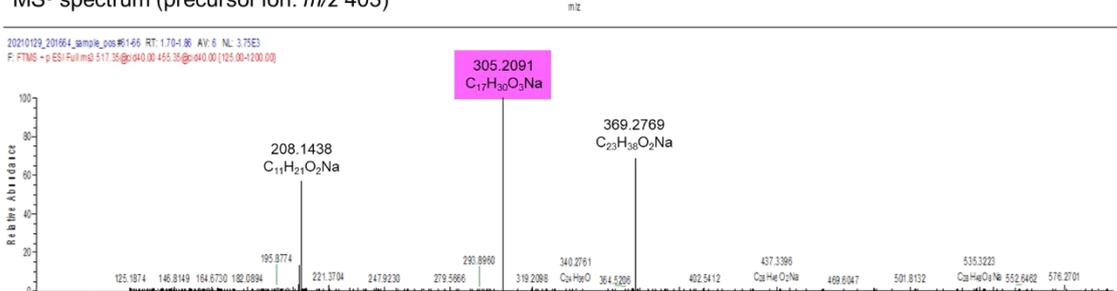
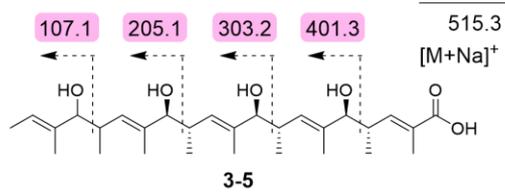
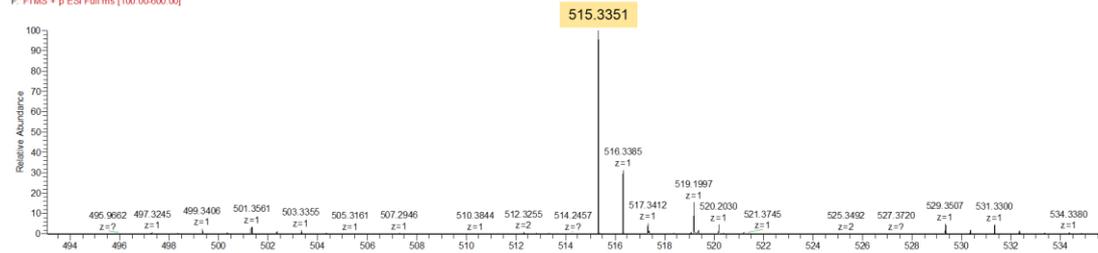


図 3-2-5. prophialotide A (3-4)の MS², MS³解析結果

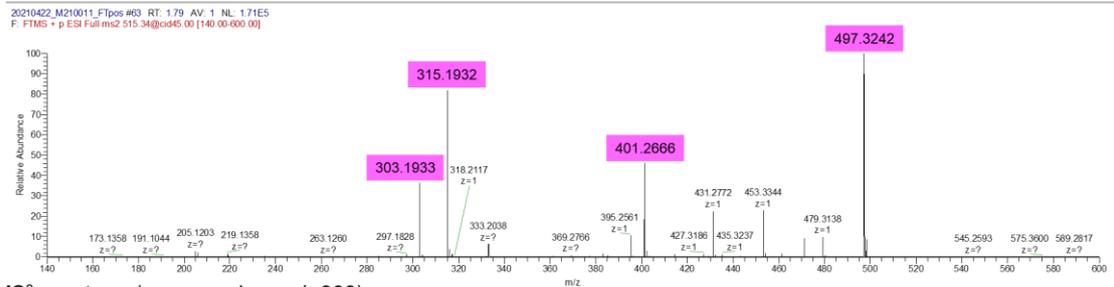


MS spectrum of 3-5

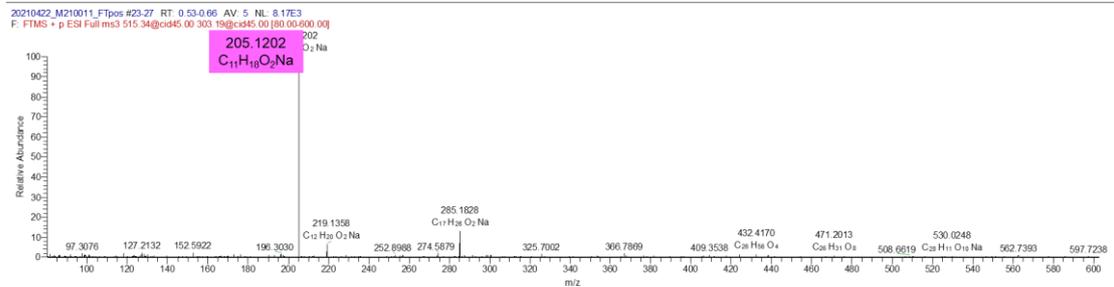
Data_No.: Sample name: C:\Xcalibur\20210422_M210011_FTpos
 Operator name: oka seiko
 Comment:
 Instrumental Analysis Div., Global Facility Center, Creative Research Institution, Hokkaido University
 Inst name: LTQ Orbitrap XL
 Time stamp: 04/22/21 16:13.23
 Source Voltage (KV):
 Capillary Voltage (V):
 Tube Lens Voltage (V):
 Flow Rate:



MS² spectrum (precursor ion: m/z 515)



MS³ spectrum (precursor ion: m/z 303)



MS³ spectrum (precursor ion: m/z 205)

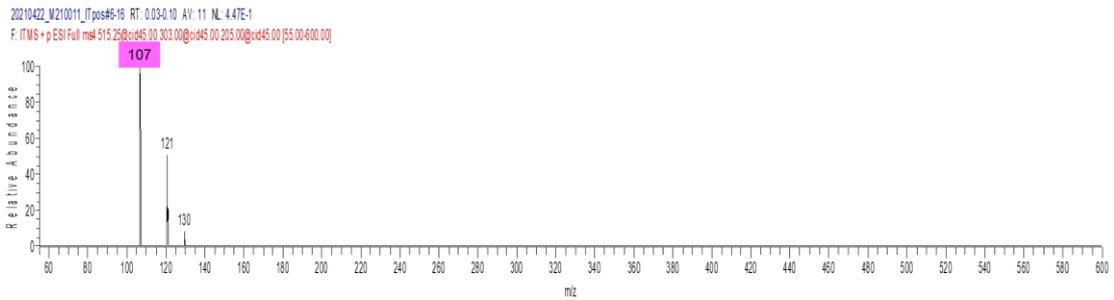


図 3-2-6. dehydroprophialotide A (3-5)の MS², MS³解析結果

3-2-3. ポリケタイド鎖の解離

今回扱った PKS は、前述した骨格構築以外に伸長終了後のポリケタイド鎖の加水分解に大きな特徴があった。一般に、ポリケタイドや脂肪酸の生合成では、酵素中の ACP ドメインに連結したまま炭素鎖伸長が触媒され、C 末端側に位置する TE ドメインによって加水分解反応が触媒されて、酵素からポリケタイドが切り出される。しかし、**3-1** 生合成において PhiaA 内部には TE ドメインが存在しないため、HR-PKS 上で生成したポリケタイド鎖の加水分解には別の酵素・ドメインが関与することが示唆された。NRPS 様酵素 PhiaC を含まない形質転換体において **3-4** が観測されなかったことを考慮すると、PhiaC が加水分解に関与すると考えられた。本酵素は、縮合 (C)ドメインとアデニル化 (A)ドメインの2つのドメインから構成されるが、前者はアミノ酸を用いた分子内ラクトン化やアミド結合形成などの反応を触媒するドメインである。分子内にある水酸基の代わりに水分子が反応すると仮定すると、C ドメインは加水分解反応を触媒することが可能であると考え、活性部位 HHxxxDG モチーフに着目した変異実験を行った [17]。

野生型 *phiaC* をテンプレートとした PCR によって、3 種の変異体(*phiaC_AAxxxDG*, *phiaC_HAxxxDG*, *phiaC_AHxxxDG*)を作製し、先ほどと同様に *phiaA*, *B* と共に麹菌に導入した。変異体導入形質転換体および AO-*phiaABC* をそれぞれ MPY 培地で培養して代謝産物を抽出し、粗抽出物を LC-MS で分析した。その結果、AO-*phiaABC*、AO-*phiaABC_HAxxxDG* では、**3-4** が観測されたが、AO-*phiaABC_AAxxxDG*、AO-*phiaABC_AHxxxDG* では観測されなかった。この結果より、C ドメインがポリケタイド鎖の PKS からの加水分解による切り出しを触媒していることがわかった。

C ドメインは、アミド結合の形成、Pictet-Spengler 反応、ヘテロ環化反応などの多様な反応を触媒する酵素である [18]。PKS-NRPS では、伸長鎖の切り出し反応を C 末端 C_T ドメインが触媒するものが知られている。この C_T ドメインは、真菌 NRPS に特に多く、60-90% の NRPS が C_T ドメインを持っている。C_T ドメインが触媒する反応はマクロラクタム化が主であるが、アミド化や Dieckmann 縮合、trans-エステル化、ラクトン化も報告されている。また、加水分解反応を触媒する C ドメインは、Crocacin B および D-tryptophan 生合成で報告されている。両者ともに、NRPS の T ドメイン上にあるアミノ酸が C 末端に位置する C_T ドメインの作用によって、酵素から切り出される[19]。これらの例と PhiaC との相違点は、PhiaC では N 末端に位置する C ドメインが加水分解反応を触媒する点である。同様の例は報告されておらず、極めて珍しい例と言える。また、最近当研究室では、**3-1** と thermolide との生合成的な関連性に着目して研究を進めることで、thermolide 生合成において本来アミド結合を形成する NRPS (ThmB)の C ドメインが、アミノ酸非存在下では PhiaC の C ドメインと同様、加水分解反応を触媒することを明らかにした[20]。以上の結果から、NRPS の T-R ドメインが欠失した PhiaC と ThmB には進化的な関連性があると考えている。

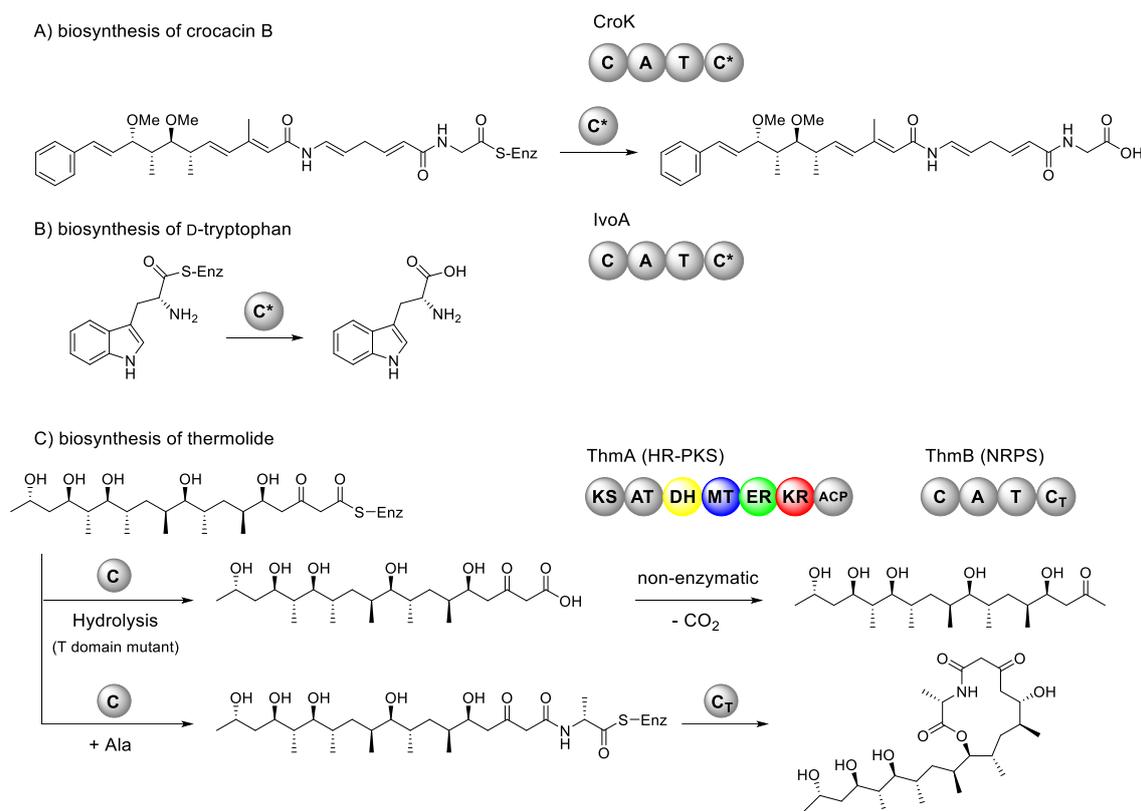


図 3-2-7. C ドメインが触媒する加水分解による炭素鎖解離反応
A) crocacin B 生合成、B) D-tryptophan 生合成、C) thermolide 生合成

以上の実験結果より推定される **3-1** の生合成経路を図 3-2-8 に示した。HR-PKS (PhiaA)、trans-ER (PhiaB)が acetyl-CoA, malonyl-CoA, SAM を原料として炭素鎖を伸長する。1 回目の伸長では MT/KR/DH に加え PhiaB によるエノイル還元反応が進行する。以降は偶数回では MT/KR、奇数回では MT/KR/DH が修飾反応を触媒する。炭素鎖伸長後、NRPS 様酵素 PhiaC によって加水分解反応が触媒され、ポリケタイド鎖が PhiaA から切り出され、**3-4** が生成される。生成物はポリヒドロキシ化合物であるが、冒頭で述べたように、糸状菌由来 HR-PKS の多くがポリエン化合物を与えることとは対照的である。また、天然物 **3-1** は配糖体であるが、遺伝子クラスター中に糖転位酵素遺伝子が存在しないため、クラスター外に位置する遺伝子が生合成に関与していると考えられる [11]。

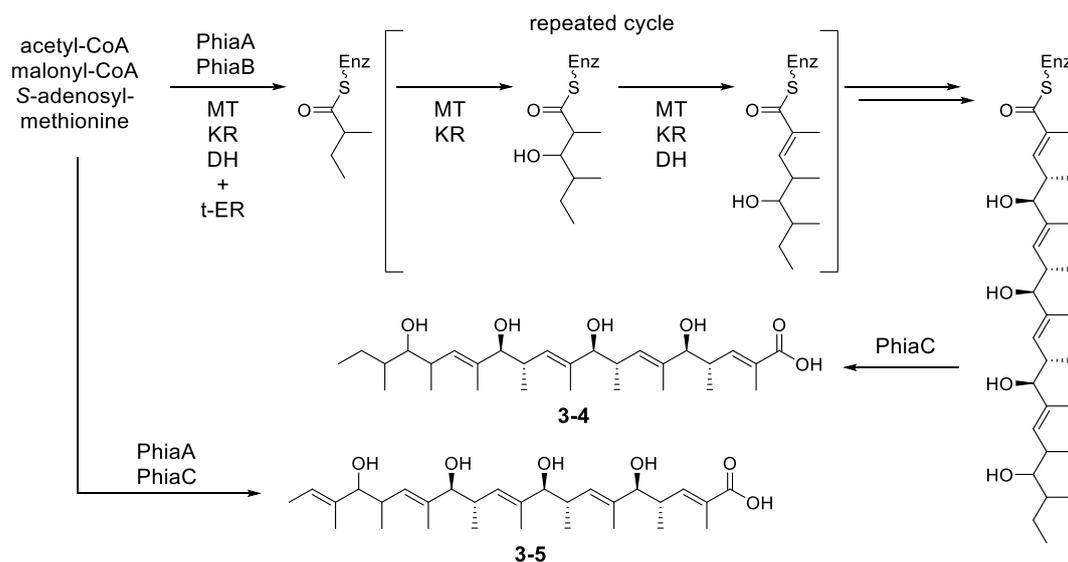


図 3-2-8. prophialotide A (3-4) 推定生合成経路

3-2-4. prophialotide A の絶対立体配置

続いて、HR-PKS の立体制御機構を明らかにするため、**3-4** の絶対立体配置を決定した。本化合物は、適度な間隔で二重結合が存在するため、オゾン分解によって得られる分解生成物と合成標品とのスペクトルを比較することで、一義的に絶対立体配置を決定できると考えた。*AO-phiaABCD* より取得した **3-4** のオゾン酸化および還元によって 2 種の分解生成物 (**3-6**、**3-7**) を取得した。トリオール **3-7** は、 NaBH_4 での還元の際に生じる 2 種のジアステレオマー混合物として得られた。これらの分解産物は適切な誘導體化を行った後、化学合成した **3-6**、**3-7** の標品と比較することで、相対立体配置・絶対立体配置を順に決定した。

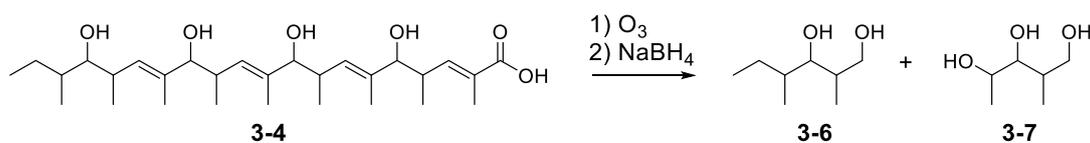


図 3-2-9. prophialotide A (3-4) のオゾン分解反応

【3-6 の合成と立体配置の決定】

まず、**3-6a** を合成した。市販の methyl (S)-3-hydroxy-2-methylpropanoate から文献既知の方法により、**3-9a** を合成した [21]。合成した **3-9a** はジアステレオマー **3-9d** との混合物 (**3-9a**:**3-9d** = 6:4) で得られたため、分離精製によって **3-9a** を得た。**3-9a** について、Pd/C を触媒とした接触還元を行い、続いて TBAF で TBDPS 基を除いて、目的の **3-6a** を 72% の収率で合成した。ジアステレオマー **3-6b-d** は、**3-9b-d** から上述したスキームに従って合成した。

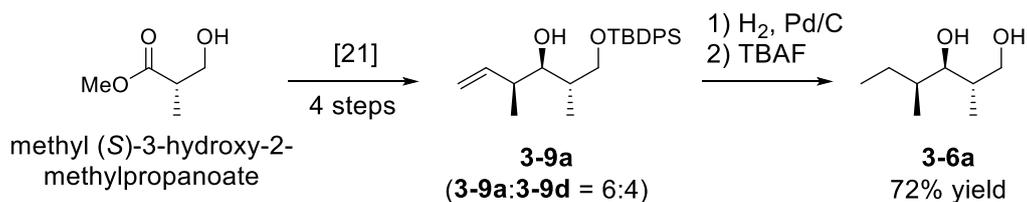


図 3-2-10. 分解生成物標品 **3-6a** の合成

合成した **3-6a-d** では、3 位水素の化学シフトが大きく異なっていた (**a**: 3.50 ppm, **b**: 3.37 ppm, **c**: 3.52 ppm, **d**: 3.52 ppm)。ポリケタイド鎖 **3-4** から誘導した **3-6** では、**3-6a** と同じ 3.50 ppm にシグナルが観測されたことから、その相対配置を決定した。

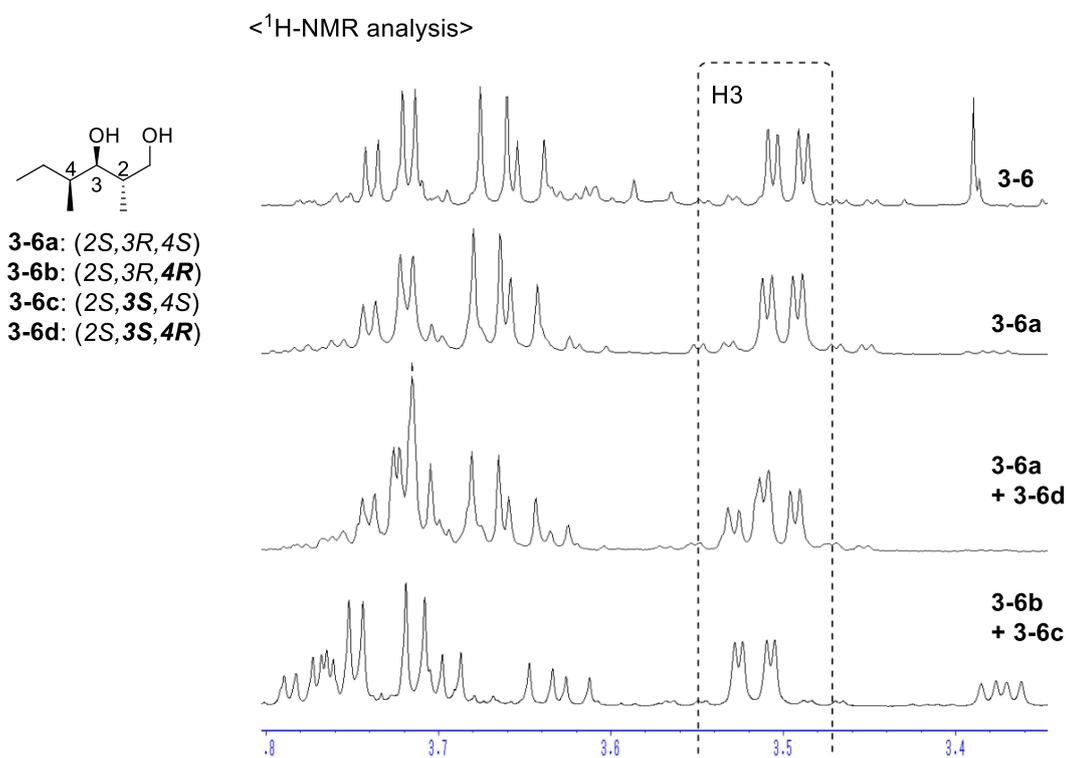


図 3-2-11. **3-6**, **3-6a-d** の ¹H-NMR 分析結果

次いで、絶対立体配置を決定するため、**3-6a** についてキラル試薬による誘導体化を行った。本研究では、**3-6a** に対して *S* 体 *R* 体のキラル試薬を作用させ、**3-6a-S** と **3-6a-R** を合成した。このうち、**3-6a-R** は **3-6a'-S** のエナンチオマーであるため、クロマトグラム上で同じ挙動を示す。この特徴を利用すれば、**3-6a** (2*S*,3*R*,4*S*) のエナンチオマー **3-6a'** (2*R*,3*S*,4*R*) を合成することなく、分解産物の絶対配置を決定できる。

キラル試薬としては、当初、モッシャー法で使われる MTPA を用いた。しかしながら、誘導体が分離しなかったため、脂肪族鎖状アルコールの分離を促進するキラル試薬である

M α NP acid を用いた [22]。3-6a に(S)-M α NP acid / (R)-M α NP acid を作用させ、3-6a-S, 3-6a-R を合成した。合成した 3-6a-S/R を UPLC-MS 分析に供したところ、両化合物は良好に分離した。続いて 3-4 より誘導した 3-6 について(S)-M α NP acid を作用させ、3-6-S を合成した。LC-MS で分析した結果、3-6-S は 3-6a-S と保持時間が一致したことから、3-6 の絶対立体配置を (2S,3R,4S) と決定した。

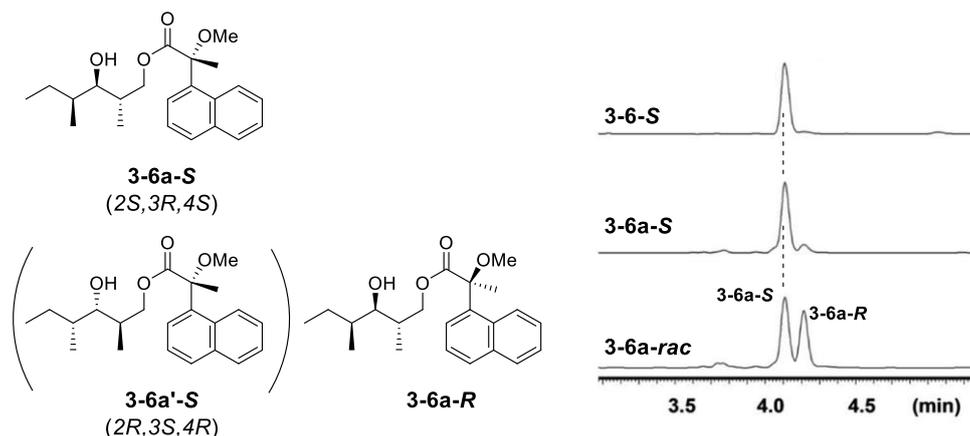


図 3-2-12. 3-6-S, 3-6a-S/rac の UPLC-MS 分析結果

【3-7 の合成と立体配置の決定】

次いで、3-7a を合成した。市販の methyl (S)-3-hydroxy-2-methylpropanoate から文献既知の変換により、3-10 を合成した [23]。オレフィン 3-10 について、ワッカー酸化によって 3-11a/b を合成した (3-11a:3-11b = 1:1)。3-11a/b を分離精製し、それぞれ 12%, 11% の収率で取得した。続いて、3-11a のカルボニル基を NaBH₄ によって第二級アルコール 3-12a へ変換した後、TBAF で TBDPS 基を除去することで、目的の 3-7a を 54% の収率で合成した。ジアステレオマー 3-7b は、3-11b から上述したスキームに従って合成した。

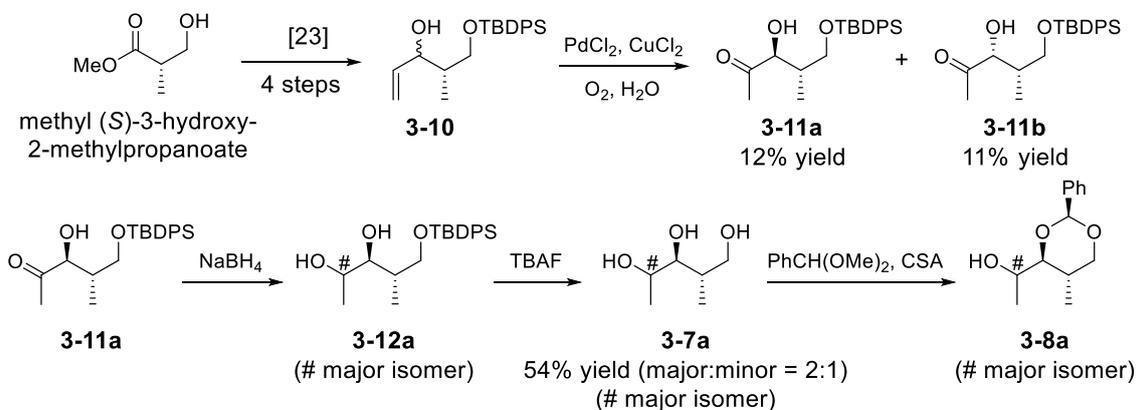


図 3-2-13. 分解生成物標品 3-7a の合成

合成した **3-7a/b** は LC-MS での検出ができなかったため、1,3-ジオール部位にベンジリデンアセタールをかけて **3-8a/b** へ変換した。ベンジリデンアセタール **3-8a/b** は、適切な条件設定を行うことで分離した。次いで、**3-4** より誘導した **3-8** を UPLC 分析に供した結果、**3-8a** と保持時間が一致したことから、**3-7** の相対配置を明らかにできた。

次に、**3-8a** について、先述した **3-6** と同様に (*S*)-M α NP acid、(*R*)-M α NP acid を作用させ、**3-8a-S/R** を合成した。両者は、UPLC で良好に分離した。分解生成物より誘導した **3-8** についても、(*S*)-M α NP acid を作用させ **3-8-S** へ変換した後、LC-MS 分析に供した。その結果、**3-8-S** は **3-8a-S** と保持時間が一致したことから、**3-7** の絶対立体配置を (*2S,3S*) と決定した。

以上の結果より、**3-4** の絶対立体配置を (*4S,5S,8S,9S,13S,16S,17R,18S*) と決定した。

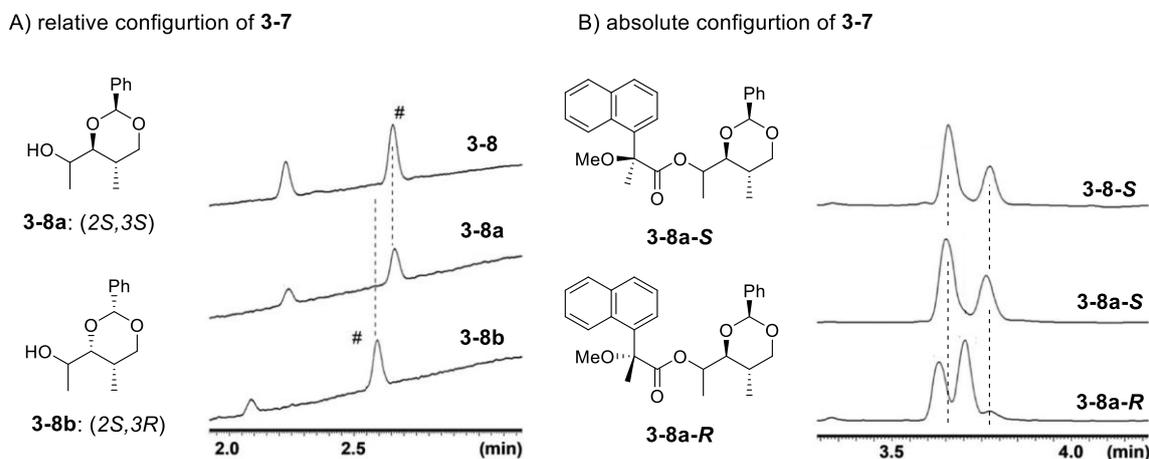


図 3-2-14. 分解生成物 **3-7** の絶対立体配置の決定

3-3. phomenoic acid・ACR-toxin 生合成における HR-PKS の立体制御

3-3-1. phomenoic acid 生合成遺伝子クラスターの異種発現

Prophialotide A (**3-4**)の異宿主発現と絶対立体配置の決定に成功したことから、続いて *phom* 遺伝子の異種発現を行い、**3-2** 生合成中間体の単離・構造決定を試みた。前節 3-2-2 において、ポリケタイド骨格合成に必須な *phiaABC* と高い相同性を示した *phomABC* を pDP801、pDP201 にそれぞれ導入した。構築したプラスミドをプロトプラスト-PEG 法にて麴菌に導入し、形質転換体 AO-*phomABC*, AO-*phomAB*, AO-*phomAC* を得た。得られた形質転換体を、MPY 液体培地で培養し、代謝産物を抽出した。粗抽出物を LC-MS で解析したところ、AO-*phomABC* において野生株 (WT) には見られない新たなピーク **3-13** が確認された。化合物を単離し、HR-MS 分析により分子式を C₃₄H₅₆O₆ と決定した。その分子式から、本化合物は天然物としても単離されている phomenolactone の C20 位デオキシ体であると推測された。¹H-NMR スペクトルを phomenoic acid methyl ester [12]と比較したとこ

ろ、オレフィンプロトン (δ_{H} : 5.80, 5.65, 5.63, 5.52, 5.48, 5.00)、オキシメチンプロトン (δ_{H} : 4.10, 4.05, 4.05, 3.65)、アリル位のメチルプロトン (δ_{H} : 1.72)に相当するシグナルが良い一致を示した。また、20位のヒドロキシメチル基に由来するシグナル (δ_{H} : 4.09, 4.22)が消失し、新たにアリル位のメチル基に相当するシグナル (δ_{H} : 1.72)が観測されたことから、推定構造の妥当性が支持された。各種 2D-NMR 解析から、最終的にその平面構造を決定した。prophomenolactone (**3-13**)は **3-2** が持つすべての酸素官能基とメチル基をもつことから、これらの置換基は PhomA と PhomB によって導入されることがわかった。

3-2 はカルボン酸であるが、形質転換体より単離した **3-13** はカルボン酸ではなくラクトンであった。上述した **3-1** と同様の機構でポリケタイド鎖が生成されると考えるならば、*phom* 遺伝子の異種発現でも、NRPS 様酵素により触媒される加水分解反応によってカルボン酸として生成されると推定できる。実際、形質転換体の培養条件を変化させた場合に、カルボン酸に相当する分子量をもつピークが観測されている。しかしながら、同条件で培養しても、単離・精製の過程でカルボン酸は消失して **3-13** のみを得られた。ラクトン誘導体は天然物としても単離されていることから、絶対立体配置の決定は **3-13** を用いることにした。

また、炭素鎖伸長過程において、非酵素的なラクトン化による切り出しも想定された。そこで、NRPS 様酵素遺伝子 *phomC* を除いた AO-*phomAB* の代謝産物を分析したが、**3-13** は観測されなかった。また、先の実験とは異なり、*trans-ER* を除いた AO-*phomAC* では、末端に二重結合が残った化合物は観測されなかった。先述した **3-4** の場合でも *phiaB* を除いた際には生産量が著しく減少したことを考慮すると、下流の反応を触媒するドメインが二重結合の有無を認識していることが示唆された。HR-PKS の生合成において *trans-ER* が存在せず、エノイル還元が触媒されない場合に、天然物と異なる構造が得られる場合がいくつか報告されている。lovastatin 生合成においては、*trans-ER* (LovC)非存在条件での HR-PKS (LovB)の反応で、ヘキサケチドピロン、ヘプタケチドピロンが生産される [24]。aspyridone 生合成では、*trans-ER* (ApdC)非存在下において生成される中間体が下流の NRPS に受容されないために α -ピロンとして切り出される [25]。

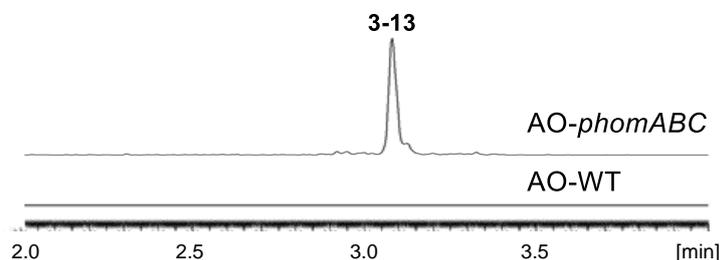
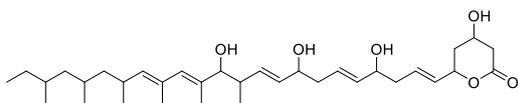
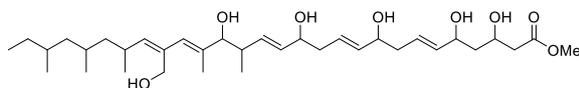


図 3-3-1. 麴菌形質転換体より抽出した代謝産物の UPLC-MS 分析結果 (ESI+ m/z 583)



propromenolactone (**3-13**)



phomenoic acid methyl ester

3-13 (methanol-d ₄)		
	δ _c	δ _H (multiplicity, J in Hz)
1	173.8	-
2	43.3	2.43 (dd, 15.1, 8.2), 2.51 (dd, 15.1, 5.4)
3	67.4	4.10 (m)
4	44.9	1.60 (m), 1.71 (m)
5	71.7	4.21 (q, 7.0)
6	136.3	5.48 (m)
7	129.1	5.65 (m)
8	41.5	2.25 (m)
9	73.6	4.05 (m)
10	136.3	5.52 (m)
11	128.7	5.65 (m)
12	41.3	2.25 (m)
13	73.3	4.05 (m)
14	134.1	5.52 (m)
15	135.9	5.63 (m)
16	41.5	2.32 (m)
17	83.7	3.65 (d, 8.7)
18	136.6	-
19	132.9	5.80 (s)
20	132.0	-
21	137.7	5.0 (d, 9.6)
22	31.3	2.58 (m)
23	46.7	0.95 (m), 1.20 (m)
24	29.4	1.50 (m)
25	46.5	1.02 (m), 1.28 (m)
26	32.8	1.41 (m)
27	30.5	1.08 (m), 1.32 (m)
28	11.6	0.85 (m)
16-Me	17.8	0.87 (m)
18-Me	13.0	1.72 (s)
20-Me	17.4	1.72 (s)
22-Me	22.3	0.93 (d, 6.5)
24-Me	20.7	0.85 (m)
26-Me	20.1	0.82 (d, 6.6)

phomenoic acid methyl ester (CDCl ₃)		
	δ _c	δ _H (multiplicity, J in Hz)#
1	172.9	-
2	42.0	2.56 (d, 14.5), 2.40 (dd, 14.5, 8.0)
3	67.4	4.27 (m)
4	42.6	1.58 (ddd, 14.0, 8.5, 4.5), 1.78 (ddd, 14.5, 8.5, 4.5)
5	72.4	4.05-4.15 (m)
6	136.1	5.43*
7	129.8	5.56 (dt, 15.5, 7.0)
8	40.5	2.20 (m)
9	72.8	4.05-4.15 (m)
10	135.5	5.45*
11	129.4	5.50 (dt, 15.5, 7.0)
12	40.1	2.20 (m)
13	72.4	4.05-4.15 (m)
14	134.3	5.42 (dd, 15.5, 7.0)
15	136.0	5.70 (dd, 15.5, 6.0)
16	40.9	2.31 (ddq, 7.0, 6.0, 6.5)
17	82.7	3.69 (d, 7.0)
18	139.4	-
19	129.6	5.84 (s)
20	133.9	-
21	137.9	5.06 (d, 10.0)
22	30.1	2.62 (m)
23	45.2	0.77-0.88 (m)
24	28.3	0.77-0.88 (m)
25	45.5	0.77-0.88 (m)
26	31.6	0.77-0.88 (m)
27	29.4	0.77-0.88 (m)
28	11.3	0.77-0.88 (m)
16-Me	20.1	coalescence
18-Me	11.9	1.68 (s)
20-CH ₂ OH	60.5	4.09 (d, 11.0), 4.22 (d, 11.0)
22-Me	22.5	0.77-0.88 (m)
24-Me	19.8	0.77-0.88 (m)
26-Me	17.6	0.77-0.88 (m)

#: ¹H-NMR spectrum of per(dimethyl-t-butylsilyl)phomenoic acid methyl ester

*: exchangeable

図 3-3-2. propromenolactone (**3-13**)と phomenoic acid methyl ester の ¹H-NMR スペクトル

3-3-2. propromenolactone の絶対立体配置

propromenolactone (**3-13**)についても **3-4** と同様の工程によって絶対立体配置を決定した。はじめに、AO-*phomABC* より取得した **3-13** についてオゾン酸化および還元を行い、分解生成物 (**3-7**, **3-14**, **3-15**, **3-16**)を合成した。次いで、対応する標品を合成し、LC-MS 分析における保持時間の比較によって、相対立体配置・絶対立体配置を段階的に決めた。

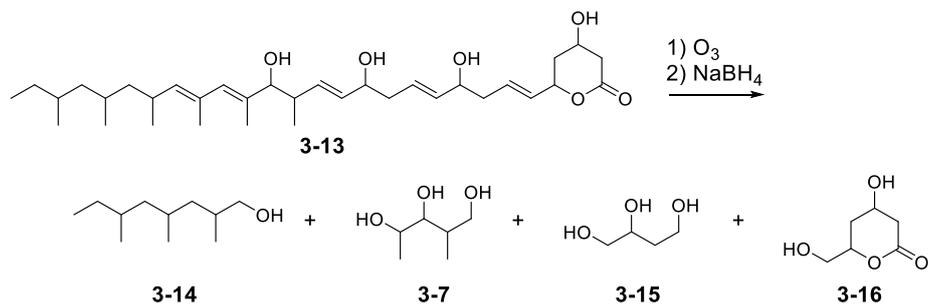


図 3-3-3. prophenolactone (**3-13**)のオゾン分解反応

【3-7 の合成と立体配置の決定】

分解産物 **3-7** の絶対立体配置は、上述した手法で行うことで (**2S,3S**)であると決定した。

【3-15 の合成と立体配置の決定】

3-15 は、**3-7** と同様の手法で絶対配置を決めた。すなわち、市販の **3-15a** をベンジリデンアセタール **3-17a** へと変換後、M α NP acid を作用させ、**3-17a-S/R** を合成した。ポリケタイド **3-13** から誘導した **3-17-S** と **3-17a-S/R** を LC-MS で分析した結果、**3-17-S** は **3-17a-S** と保持時間が一致した。この結果より、**3-15** は **S** 体であることがわかった。

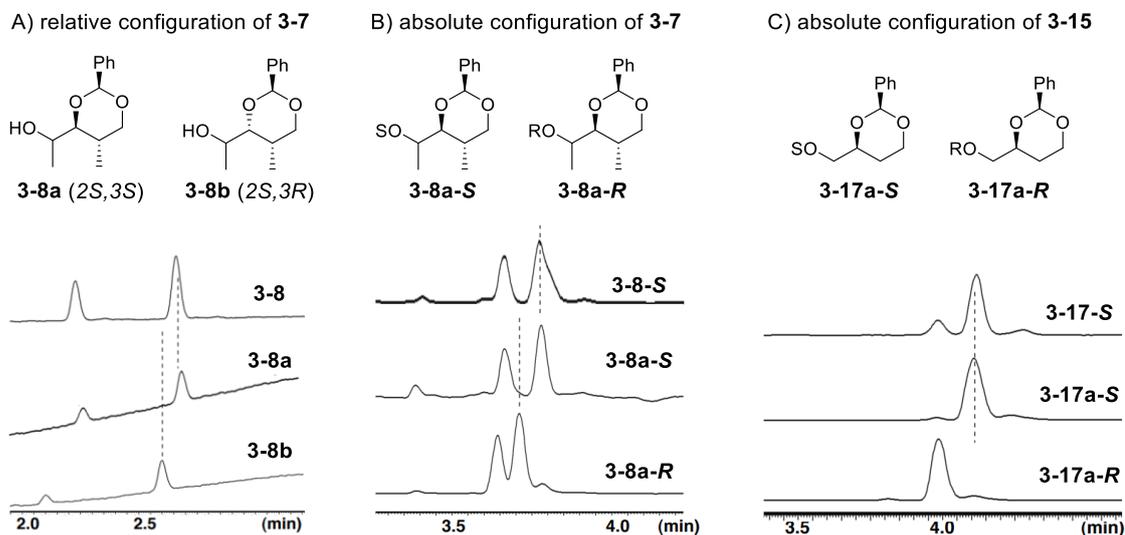


図 3-3-4. 分解生成物と合成標品の UPLC-MS 分析結果

A) **3-7** の相対立体配置、B) **3-7** の絶対立体配置、C) **3-15** の絶対立体配置

【3-14 の合成と立体配置の決定】

3-14 については、4 種のキラル体 **3-14a-d** とラセミ体 **3-14e** を合成した。キラル体 **3-14a-d** は、共同研究を行っている北京大学 Tao Ye 教授に合成していただいた。ラセミ体 **3-14e** は、市販の 2-methylbutylaldehyde から文献既知の方法により合成した **3-18** から 4 工程で合成した [26]。すなわち、**3-18** に対して、AZADOL によってアルデヒドへ変換した後、Wittig 試薬を作用させ、エステル **3-19** を 27%の収率で合成した。続いて、**3-19** を DIBALH によってアルコールへ変換した後、Pd/C を触媒とした接触還元により、目的の **3-14e** を 33%の収率で合成した。

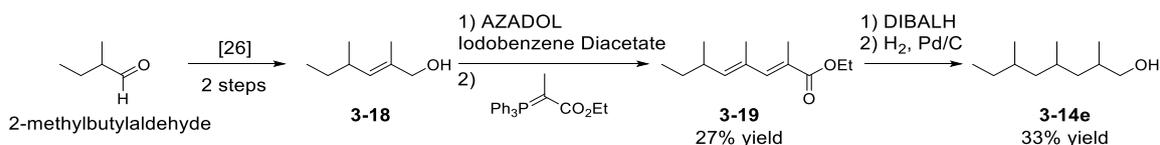
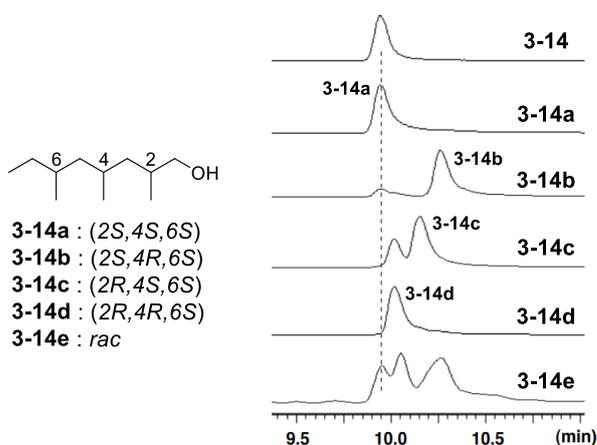


図 3-3-5. 分解生成物標品 **3-14e** の合成

合成した **3-14a-e** のキラル GC-MS 分析の結果、ジアステレオマーが分離されていることがわかった。ポリケタイド **3-13** より誘導した **3-14** は (2*S*,4*S*,6*S*)の標品 **3-14a** と同じ保持時間であったことから、**3-14** の相対配置を決定した。続いて、**3-14a** に M α NP acid を作用させ **3-14a-S/R** を合成した。UPLC-MS 分析において、**3-14a-S/R** はクロマトグラム上で分離し、分解生成物より調製した **3-14-S** は **3-14a-S** と保持時間が一致した。したがって、**3-14** の絶対立体配置を (2*S*,4*S*,6*S*)と決定した。また、後に行ったキラル HPLC によってラセミ体 **3-14e** が分離する条件が見つかり、分解生成物 **3-14** が **3-14a** と保持時間が一致したことから、この絶対立体配置が支持された。

A) relative configuration of **3-14**



B) absolute configuration of **3-14**

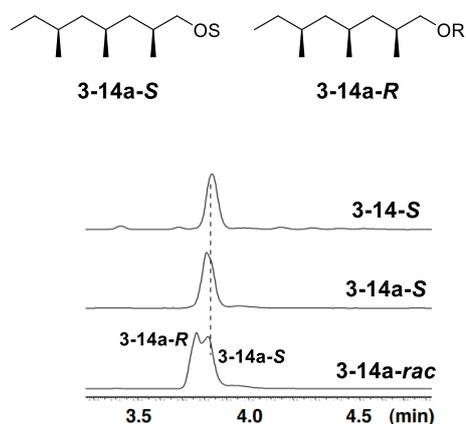


図 3-3-6. **3-14** の相対立体配置・絶対立体配置の決定

A) **3-14** と **3-14a-e** のキラル GC-MS 分析、B) **3-14-S**, **3-14a-S/rac** の UPLC-MS 分析

【3-16 の合成と立体配置の決定】

ラクトン **3-16** について、2 種のジアステレオマー (**3-16a/b**) を **3-14a-d** と同様に共同研究で合成していただいた。合成した **3-16a/b** に (*S*)-M α NP acid を作用させ、**3-16a/b-S** を合成し、UPLC-MS 分析に供したところ、**3-16a/b-S** が分離して検出されることを確認した。次いで、分解生成物より調製した **3-16-S** を UPLC-MS で分析すると、**3-16a-S** と保持時間が一致したことから、**3-16** の相対立体配置を決定した。また、絶対立体配置を決定するために、**3-16-S** と **3-16a-S/R** との保持時間を比較すると、**3-16-S** と **3-16a-S** の保持時間が完全に一致した。以上の結果から、**3-16** の絶対立体配置を (*3R,5S*) と決定した。

以上の実験で解明した各分解生成物の絶対立体配置より、**3-13** の絶対立体配置を (*3R,5S,9S,13S,16S,17S,22S,24S,26S*) と決定した。

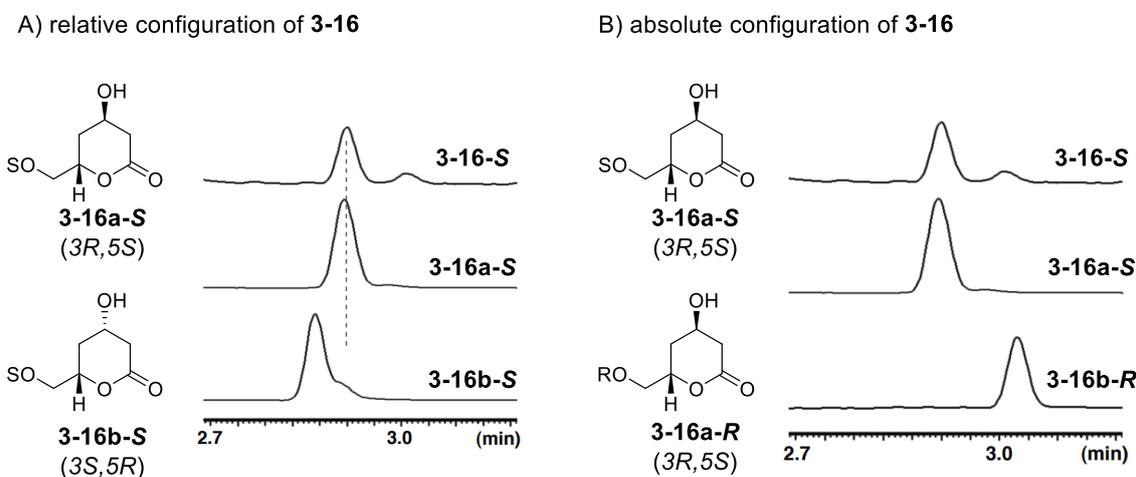


図 3-3-7. 分解生成物と合成標品の UPLC-MS 分析結果 A) 相対立体配置、B) 絶対立体配置

3-3-3. ACR-toxin 生合成遺伝子の異種発現

HR-PKS の立体制御について、さらなる知見を得るために ACRTS2 の異種発現を研究室の小谷が行った [27]。本論文で述べる立体配置制御則を理解する上でも重要な実験結果であるため、簡単に記載する。

ACRTS2 は、秋光らにより、ACR-toxin (**3-3**) の生合成に関与する遺伝子として、遺伝子破壊実験により同定された HR-PKS である [28]。ACRTS2 は、上述した PhiaA (55% identity) や PhomA (68%) と中程度の相同性を示すことから、類似した機能を持つと考えられた。この推定は、ACR-toxin が, phialotide や phomenoic acid と同様、ポリヒドロキシ化合物であることとよく一致する。ただし、phialotide や phomenoic acid と異なり、**3-3** では二重結合が還元されずにそのまま残っていることから、二重結合の還元反応を担う trans-ER はポリケタイド鎖の構築に必要ないと予想された。そこで、ACRTS2 遺伝子のみを pDP801 へ導入した。構築したプラスミドを麹菌へ導入し、形質転換体 AO-ACRTS2 を得た。形質転換体を MPY 液体培地で培養し、粗抽出物を LC-MS で分析した結果、野生株に見られない新

たなピーク **3-20** が確認された。単離構造決定の結果、NMR データと旋光度が既報のデータとよく一致したことから、本化合物は生産菌でも **3-3** の脱炭酸産物として観測されている compound A (**3-20**)であることがわかった [13]。以上の結果より、*phiaABC/phomABC* の異種発現から予想されたように、**ACRTS2** の単独発現により、類似の部分構造を有する **3-20** を取得した[27]。**ACR-toxin** の絶対立体配置は不斉全合成により明らかにされていることから、**ACRTS2** の立体選択性を議論できる状況となった [29]。なお、**3-3** から **3-20** への脱炭酸機構は図 3-3-9 のように考えられる。

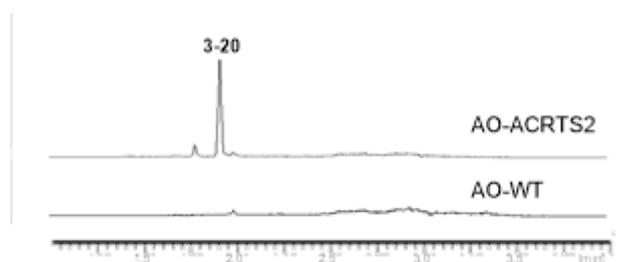


図 3-3-8. AO-ACRTS2 より抽出した代謝産物の UPLC-MS 分析結果 (ESI⁺, *m/z* 293)

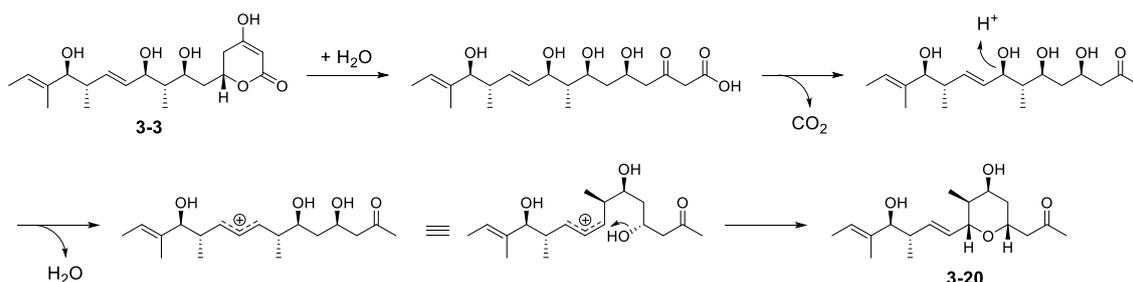


図 3-3-9. ACR-toxin (**3-3**)の非酵素的脱炭酸反応による **3-20** の生成機構

3-4. 立体配置制御則

3-4-1. 立体配置制御則の提唱

HR-PKS の異種発現により単離した 3 種の化合物の絶対立体配置を明らかにできたことから、各ドメインの立体選択性を議論できる状況となった。本博士論文では、立体化学に関する議論を簡略化するため、ポリケタイド鎖の伸長方向に着目し、近傍に位置する他の置換基の絶対配置を考慮しない ^oR/^oS モデルを新たに定義した。この定義にしたがって、3 種の化合物に導入された置換基の絶対立体配置を議論する。KR ドメインによって導入される水酸基は、すべての化合物において ^oR 配置であった。MT/ER ドメインによって導入されるメチル基は、周辺の化学構造により明確に区別できる。隣接する炭素に水酸基が存在する場合、MT ドメインで新たに導入されたメチル基と判断でき、その絶対立体配置は全ての場合において ^oR 配置である。一方、隣接する炭素上に水酸基が存在しない場合、ER ドメインの作用を受けたメチル基であると判断でき、その絶対立体配置は ^oS 配置であった。

この結果を、HR-PKS の反応にあてはめると、機能解析に成功した 3 種の HR-PKS に共通する立体選択性を次のように説明できる (図 3-4-2)。すなわち、KS ドメインによる縮合によって Int-A が形成した後、MT ドメインが $^{\circ}R$ 配置のメチル基を導入すると Int-B が生成される。次いで、KR ドメインによって Int-B が還元され、 $^{\circ}R$ 配置の水酸基をもつ Int-C が生成する。このヒドロキシチオエステルは DH ドメインの作用により、*syn*-脱離が触媒され *E*-オレフィンをもつ Int-D が生成される。この α -keto- α -Me-チオエステルを経由して *E*-オレフィンに至る一連の反応の立体化学は、マルチモジュラー型 PKS における反応機構と同じである。マルチモジュラー型 PKS では、 $^{\circ}S$ 配置の水酸基が導入されるケースもあるが、その場合にも *syn* 脱離が進行するため、生成する二重結合の幾何異性は *Z* 体となる。これより、二重結合の幾何異性は、Int-C の β 位炭素の絶対立体配置と密接に関連していることがわかる。最後に、*trans*-ER が *E*-オレフィンを立体選択的に還元し、 $^{\circ}S$ 配置のメチル基をもつ Int-E が生成する。PhiaA、PhomA、ACRTS2 と同様の立体選択性が、squalenolide 生合成における HR-PKS (SQTKS) においても報告されているが [10]、機能的に関連性のある HR-PKS の選択性を網羅的に解析したのは本研究が最初の例である [30]。

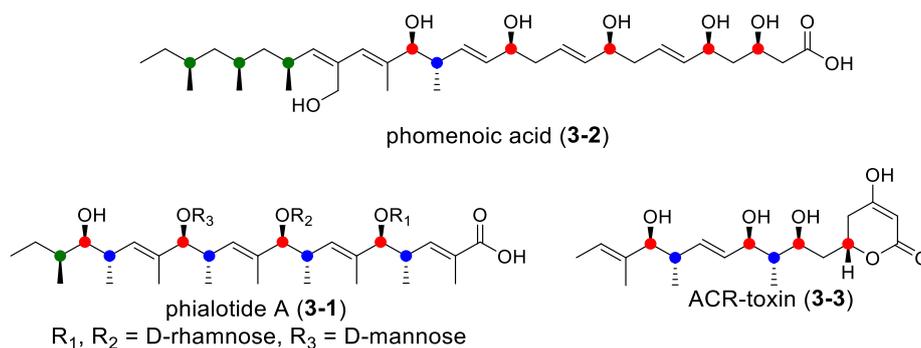


図 3-4-1. 本章で明らかにした 3-1, 3-2 の絶対立体配置と 3-3 の絶対立体配置

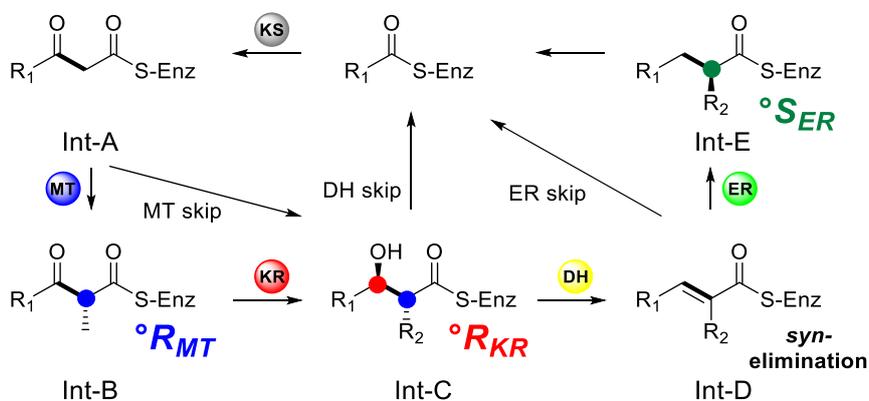


図 3-4-2. HR-PKS における立体配置制御則

3-4-2. ポリヒドロキシポリケタイドの分類

HR-PKS の分子系統解析を行うと、PMA (PhiaA, PhomA, ACRTS2)、TML (ThmA, ValA)、PSL (AkmlA, CimlA)に対応する 3 つの明確なクレードが見出された。上述した実験で機能解析した PhiaA などは、全て PMA クレードに分類された。各クレードにおいて、機能解析された HR-PKS が与えるポリケタイド鎖は、全て、ポリヒドロキシポリケタイドであった。また、PMA クレードに分類された HR-PKS の周辺遺伝子を精査したところ、上述した加水分解を触媒する NRPS 様酵素遺伝子が多く保存されていた。この結果より、1) 機能解析に成功した PhiaA、PhomA、ACRTS2 が系統的に関連性を示すこと、2) 構造が類似する天然物の生合成に関与する HR-PKS は系統樹上で近縁のクレードに分類されることがわかった。各グループの HR-PKS に構築されるポリケタイド鎖の構造について、以下にまとめる。

PMA グループ：

Phialotide (**3-1**)や **3-2** のようなカルボン酸を末端にもつ鎖状ポリケタイドが分類される。そのポリケタイド鎖の伸長反応には、独立して機能する trans-ER を必要とする。**3-1** や **3-2** のポリケタイド鎖の加水分解反応は NRPS 様酵素によって触媒される。また、特殊な例として、**3-3** のように分子内反応によってポリケタイド鎖が解離するため、切り出し酵素が不要なものも存在する。

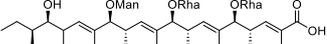
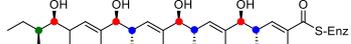
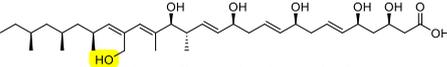
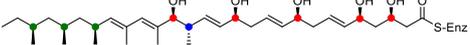
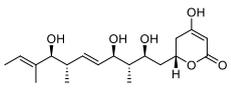
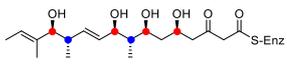
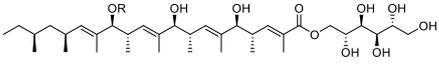
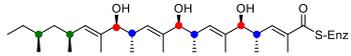
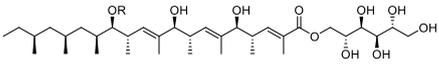
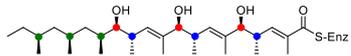
TML グループ：

Thermolide に代表されるマクロラクタムファミリーのポリケタイドである[31]。このグループには、metacridamide [32]、georatusin [33]、valactamide [34]が含まれる。これらは、ポリヒドロキシポリケタイドとアミノ酸から構成されている。PMA グループとは異なり、PKS を構成する ER ドメインが活性型であり、ポリケタイド鎖の伸長反応に関与する。このグループに特徴的なマクロラクタム部位は、縮合、アデニル化、チオール化、末端縮合ドメインからなる NRPS によって形成される。

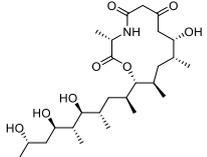
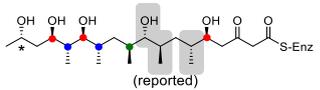
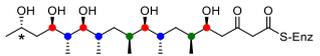
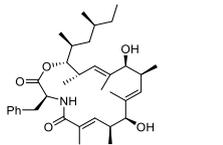
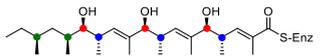
PSL グループ：

Phaenospelide A に代表されるマクロラクトンファミリーのポリケタイドである[35]。他のグループと異なり、C-メチル化を触媒する MT ドメインを持っていない。この特徴的なドメイン構成は、本グループに分類される decastrictine C1 [36]や AKML A、CIML A [37]が分岐メチル基を持たない化学構造の特徴とも一致する。また、PMA、TML グループとは異なり、独立した TE によって特徴的なマクロ環化反応が触媒される。

A) PMA group

Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
 <p>phialotide A [<i>Pseudophialophora</i> sp.] PhiaA+PhiaB</p>		This study
 <p>phomenoic acid [<i>Leptosphaeria maculans</i>] PhomA+PhomB</p>		This study
 <p>ACR-toxin [<i>Alternaria alternata</i>] ACRTS2</p>		NMR, CD, X-ray Asymmetric synthesis
 <p>TMC-171C [<i>Clonostachys rosea</i>]</p>		X-ray methanolysis
 <p>TMC-151C [<i>Clonostachys rosea</i>]</p>		X-ray methanolysis

B) TML group

Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
 <p>thermolide (reported structure) [<i>Talaromyces thermophilus</i> NRRL 2155] ThmA</p>	 <p>(reported)</p>  <p>(proposed by synthetic study)</p>	This study (macrolactam moiety)
 <p>metacridamide A [<i>Metarhizium acridum</i>] MetA (putative)</p>		X-ray

C) PSL group

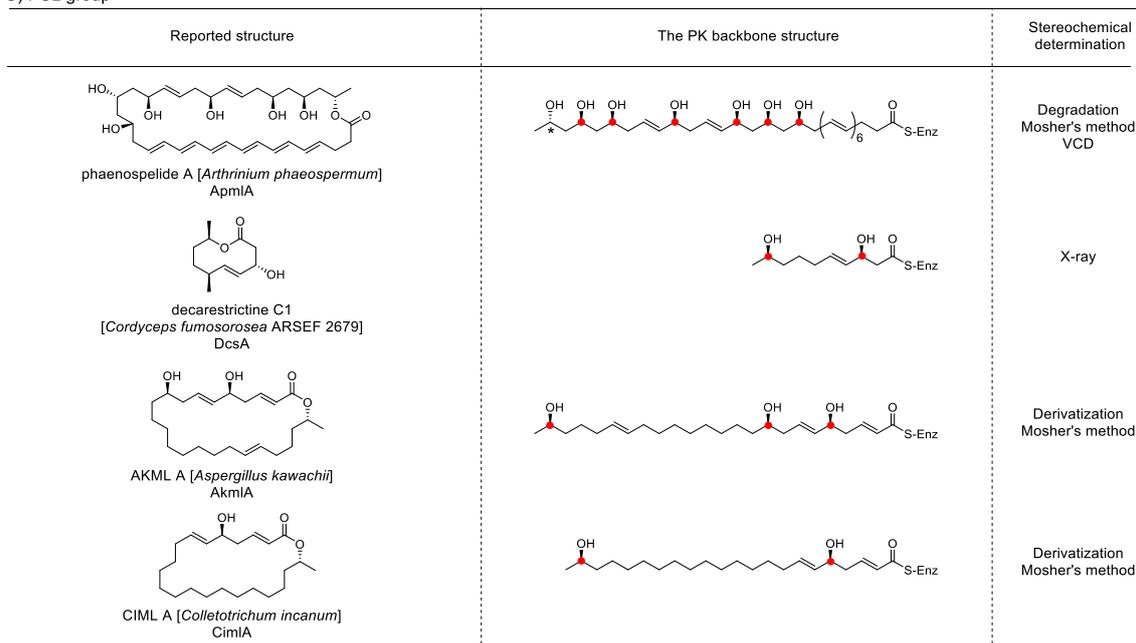


図 3-4-3. ポリヒドロキシポリケタイドと対応するポリケタイド鎖の構造

A) PMA グループ、B) TML グループ、C) PSL グループ

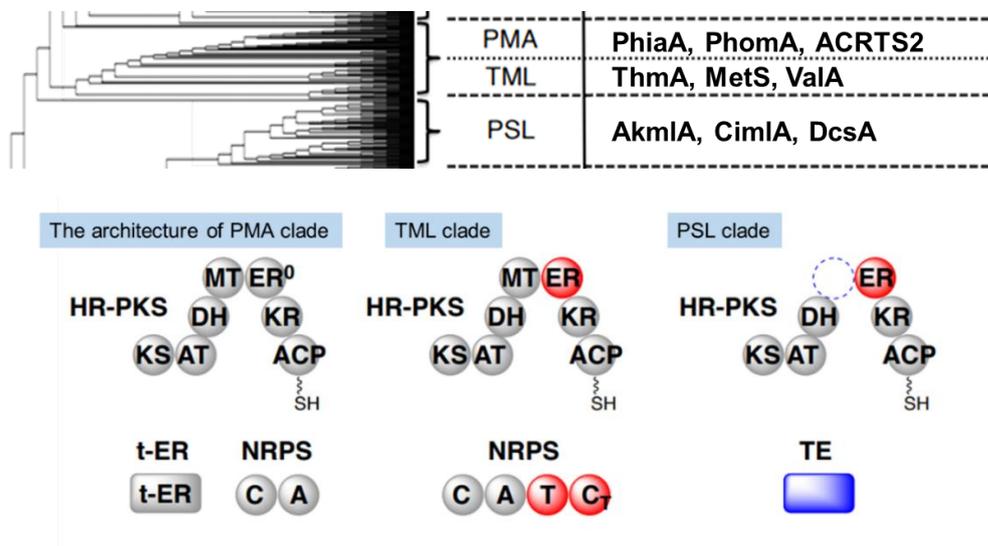


図 3-4-4. ポリヒドロキシポリケタイドを合成する HR-PKS の系統樹解析、ドメイン構成

3-4-3. ポリヒドロキシポリケタイドの立体配置制御について

前述した 3 グループのポリヒドロキシポリケタイドについて、本章で提唱した立体配置制御則 ($^{\circ}R_{MT}$, $^{\circ}R_{KR}$, $^{\circ}S_{ER}$)が適用可能か検証した。この検証には、X 線結晶構造解析や全合成など、信頼性の高い手法で絶対立体配置が明確に決められている化合物を用いた。その結果、多くのポリヒドロキシポリケタイドで規則と一致する立体配置を持つことがわかった。ま

た、検証の過程で制御則とは一致しない天然物を見つけ、計算化学的手法とモデルの合成により、報告されている構造の不備を指摘することに成功した。この結果から、立体配置制御則が天然物の構造予測や報告されている構造の妥当性検証に利用できることを示すことができた。以下、各グループについて具体例を示す。

A. PMA グループ

PMA グループのポリケタイド鎖は、前述した **3-4**、**3-13**、**3-3** のように共通して $^{\circ}R_{MT}$ 、 $^{\circ}R_{KR}$ 、 $^{\circ}S_{ER}$ 配置の水酸基およびメチル基が HR-PKS / trans-ER によって導入される。X 線結晶構造解析によって絶対立体配置が決まっている構造類縁体 TMC-171C にある置換基についても、規則から予測される絶対立体配置をもつ [15]。また、上述した分子系統解析では、PMA クレードに *Xylaria* 種から見つかる機能未知の HR-PKS が分類される。これらの HR-PKS が *Xylaria* 種から単離されている **3-2** の構造類縁体である cubensic acid や malaysic acid、berteric acid、cameronic acid の生合成に関与すると仮定すると、提唱した立体配置制御則を適用することで、これらの絶対立体配置を予測できる [14,38]。これにより、cubensic acid では、考え得る 1024 通りの可能性 (不斉中心が 10 か所あるため)の中から、合理的に推定される構造をただ一つに絞り込むことができた。同様の手法は、類縁体にも適用できる。こうした化学構造の推定は、全合成によって絶対立体配置を決める際に有効であると考えられる。

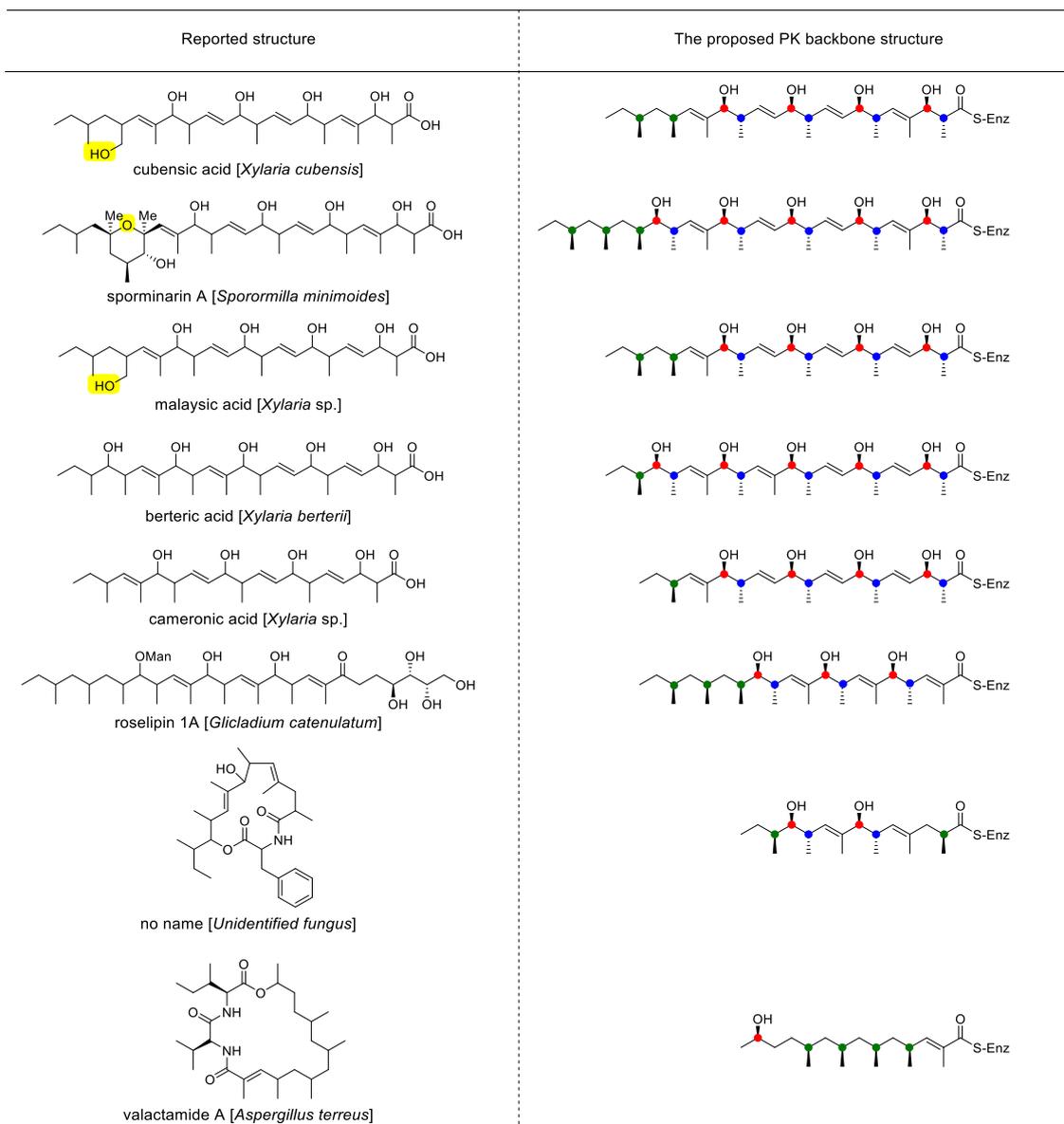


図 3-4-5. 立体配置制御則によって予想されるポリケタイド鎖の絶対立体配置

B. TML・PSL グループ

PMA グループで提唱した立体配置制御則が TML・PSL グループにおいても適用できるか調べるため、絶対立体配置が決まっている天然物の立体配置を調べた。その結果、X 線結晶構造解析によって絶対立体配置が決められている metacridamide (TML) や decastrictine C1 (PSL)、誘導體化とモッシャー法によって絶対立体配置が決められている AKMLA (PSL) や CIML A (PSL) でも提唱した規則と一致する立体配置を有していることがわかった [32,36,37]。したがって、この規則がポリヒドロキシポリケタイドにおいて適用できることが示された。

一方で、thermolide 類では、環内にある 5 つの不斉炭素原子の絶対立体配置が

(2*S*,8*S*,9*R*,11*R*,12*S*)と報告されているが、このうち 9,11,12 位の立体配置が提唱した規則に一致しない [31]。この立体配置の妥当性を、1) 計算化学的手法、2) モデル化合物の合成によって検証することにした。前者は、弘前大学 橋本 勝教授、後者は北京大学 Tao Ye 教授との共同研究である。橋本教授は、マクロ環上の絶対立体配置を再検討するために、側鎖をイソプロピル基で単純化したモデル化合物について、密度汎関数 (DFT)法による ^{13}C -NMR 化学シフト計算を行った。予測構造が百分率 (%)で示される DP4 解析の結果、16 種のジアステレオマーのうち、報告された絶対立体配置をもつモデル化合物 B がわずか 0.3%であったのに対し、提唱した規則に一致するモデル化合物 A が 87.2%と高い値を示したことから、規則に従った立体配置がより確からしいことがわかった。

この計算結果を受けて、Ye 教授のグループでは、モデル化合物 A を合成した。合成したモデル化合物 A の環内炭素の ^{13}C -NMR 化学シフト値は、論文に報告されている 18-O-Ac-pTML の ^{13}C -NMR 化学シフト値とよく一致しており、各炭素における化学シフトの実測値と報告された値の差はわずか 0.7 ppm であった。この結果より、thermolide のマクロ環部分の構造は、本研究で提案する立体化学制御則から推定される構造が妥当であることが強く示唆された。これは、立体配置制御則が、報告されている天然物の構造妥当性を検証する上で有効であることを示す好例となった。

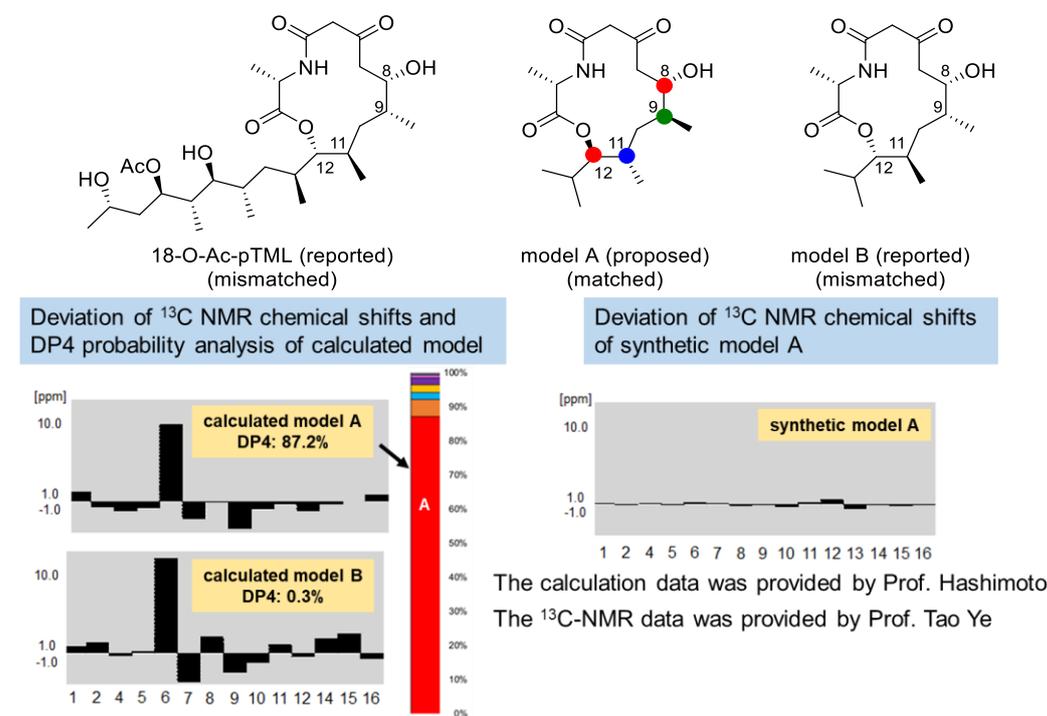


図 3-4-6. 立体配置制御則に基づいた thermolide の構造妥当性検証 A) 提唱された構造とモデル化合物の構造 B) DFT 計算によるモデル化合物 A,B の ^{13}C -NMR スペクトルと報告された値の差、DP4 解析の結果 C) 合成品 A の ^{13}C -NMR スペクトルと報告された値の差

3-4-4. 立体配置制御則の適用範囲の検証

A. 絶対立体配置が報告されているポリケタイド天然物

糸状菌 HR-PKS が生産するポリケタイド天然物には、ポリヒドロキシポリケタイド以外にも、squalenolone (SQTKS)や、lovastatin (LovB/LovF)、radicicol (Rdc5)など多様な構造を持つものが知られている。このうち、HR-PKS によって導入される置換基の絶対立体配置が明らかにされている化合物、すなわち、1) HR-PKS の機能解析が行われており、ポリケタイド鎖の化学構造が明らかになっている、2) 全合成や X 線結晶構造解析によって、ポリケタイド骨格の絶対立体配置が決まっている、に該当する化合物を図 3-4-7 にまとめた。水酸基とメチル基の置換した不斉炭素原子に着目すると、その絶対配置は提唱した規則($^{\circ}R_{MT}$ 、 $^{\circ}R_{KR}$ 、 $^{\circ}S_{ER}$)を適用したものと一致することがわかった。これらの HR-PKS は分子系統樹において、PMA/TML/PSL クレードとは異なるクレードを形成し、幅広く分布していた。PMA/TML/PSL クレードと同様に、同じクレードに分類される PKS が同じ立体選択性で反応を触媒するのであれば、提唱した規則が糸状菌由来 HR-PKS に対して広く適用できる可能性が示唆された。実際、HR-PKS は同定されていないものの、絶対立体配置が決められている糸状菌ポリケタイドの構造を見ると(図 3-4-8)、制御則と一致する絶対配置を持っていることがわかる。制御則と矛盾する立体配置を持つ天然物については、後述する。

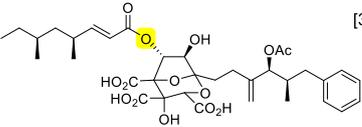
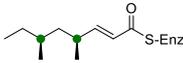
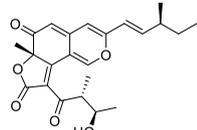
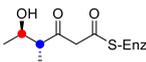
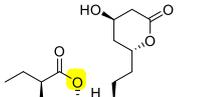
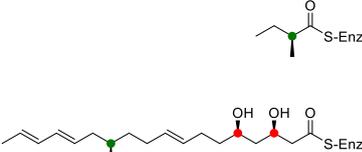
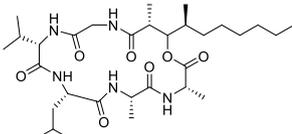
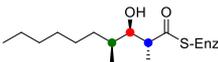
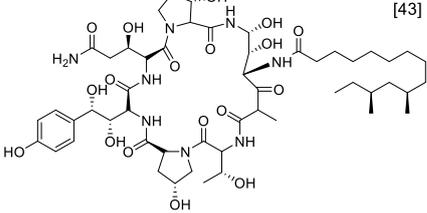
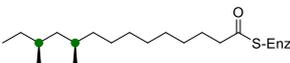
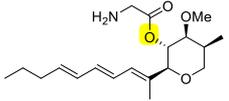
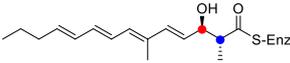
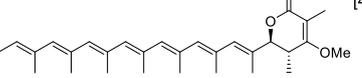
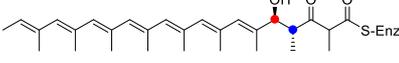
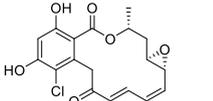
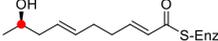
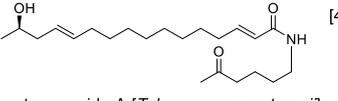
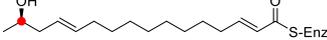
Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
 <p>[39] squalstatin [<i>Phoma</i> sp.] SQTKS</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[40] chaetoviridin H [<i>Chaetomium globosum</i>] CazF</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[24,41] lovastatin [<i>Aspergillus terreus</i>] LovF+LovB</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[42] emicellamide A [<i>Aspergillus nidulans</i>] EasB</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[43] pneumocandin B0 [<i>Glarea lozoyensis</i>] GLPKS4</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[44] restricticin [<i>Scopulariopsis</i> sp.] Rstn3</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[45] preshimalactone [<i>Emericella varicolor</i>] GF10 ShmA</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[46] radicicol [<i>Monosporium bonorden</i>] Rdc5</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[47] wortmanamide A [<i>Talaromyces wortmanii</i>] TwnB</p>		Mosher's method

図 3-4-7. 絶対立体配置が明確に決められている天然物と対応する炭素鎖の構造・HR-PKS

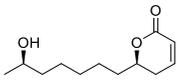
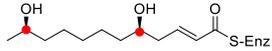
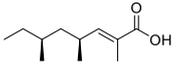
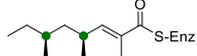
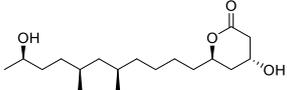
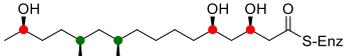
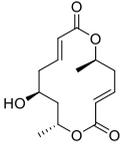
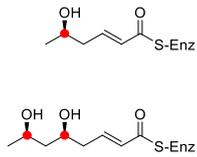
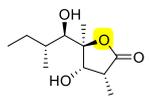
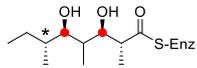
Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
<p>[48]</p>  <p>gamahonolide A [<i>Epichloe typhina</i>]</p>		Asymmetric synthesis
<p>[49]</p>  <p>xylarinic acid A [<i>Xylaria polymorpha</i>]</p>		Asymmetric synthesis
<p>[50]</p>  <p>penicitide A [<i>Penicillium chrysogenum</i> QEN-24S]</p>		Asymmetric synthesis
<p>[51]</p>  <p>colletol [<i>Colletotrichum capsici</i>]</p>		Asymmetric synthesis
<p>[26]</p>  <p>xylariolide A [<i>Xylaria</i> sp. NCY2]</p>		Asymmetric synthesis

図 3-4-8. 絶対立体配置が明確に決められている天然物と炭素鎖の構造 (HR-PKS 未同定)

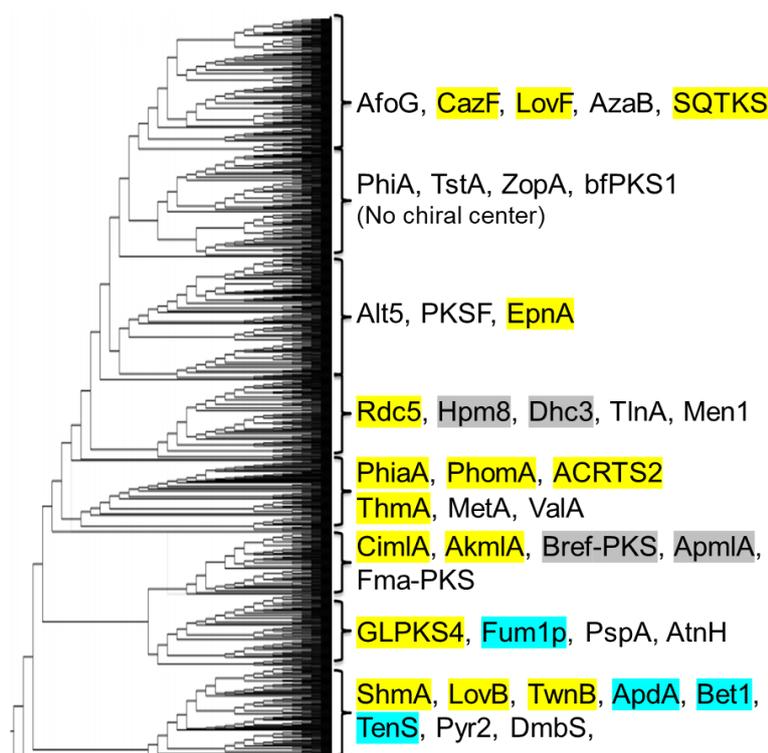
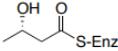
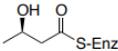


図 3-4-9. HR-PKS の分子系統樹，黄色：規則に一致、灰色：*R* 配置のメチル基を導入する ER ドメインを有する、水色：メチル末端に規則と一致しない立体配置をもつ

B. KR ドメインの選択性

提唱した制御則の妥当性を別の視点から検証すべく、KR ドメインの機能に着目したインフォマティクス解析を行った。バクテリア由来の PKS においては、KR ドメインによる還元反応の立体選択性を制御するアミノ酸残基が特定されている。すなわち、*S* 配置の水酸基を与える *A*-type の KR ドメインでは、モチーフ領域 2 にトリプトファンが保存されており、*R* 配置の水酸基を与える *B*-type の KR ドメインでは、モチーフ領域 1 に LDD モチーフが保存されている[52]。この知見をもとに、糸状菌 HR-PKS における KR ドメインのモチーフ解析を行った。その結果、哺乳類の FAS に加えて、PMA、TML、PSL クレードの HR-PKS が *B*-type の KR に見られる特徴的なモチーフを持つことがわかった。また、SQTKS や CazF、LovB、LovF、GLPKS4、EasB のように代表的な HR-PKS が *R* 配置の水酸基を与える *B*-type であることがわかった (図 3-4-10)。これらの結果は、多くの HR-PKS がポリケタイド鎖の構築過程で、*R* 配置の水酸基を形成することを示唆している。上述したように、*R* 配置の水酸基を持つ中間体からは *E*-オレフィンを生成するが、この幾何異性是对応する天然物にある二重結合の幾何異性とよく一致する。実際、Cox らは、SQTKS の DH ドメインが $^{\circ}R_{KR}$ ヒドロキシチオエステルの *syn*-脱離を触媒し、*E*-オレフィンを生成していることを *in vitro* 実験によって示している [10]。

KR type	Product	Fingerprint
A		1: No LDD 2: W
B		1: LDD 2: No W

1: LDD motif

Clade	Product	Fingerprint
Bacterial A type KR	A_ery2	ARVSVHACDVSSREPVELVHGLIE--QGDVVRGVVHAAGLPQQVAINDMDEAAFDVEVVA
	A_sor6	ARVTFAACDVADRSVATLLEQLDA--GGPQVSAVFHAGGIEPHAPLAATSMEDLAEVVS
	A_pik5	ARVTIAACDVADPHAMRTLLDAIPA--ETPL-TAVVHTAGAGGGDPLDVTGPEDIARILG
Bacterial B type KR	B_ave1	IHLTITTCDSNPDQLQLLNTIPP--QHPL-TTVIHTAGELDEATLNLTPQLNNVLR
	B_ave7	AEVRIACDVGERREVVRLLLEGVPA--GCPL-TGVVHAAGVLDDEATIASLTPERLGTVFA
	B_ave9	AEVRIACDVGERREVVRLLLEGVPA--GCPL-TGVVHAAGVLDDEATIASLTPERLGTVFA
FAS	B_mFAS_rat	IHVLVSTSNVSSLEGARALIAEATK---LGPVGGVFNLAMVLRDAMLENQTPPELFDQVVK
	B_mFAS_pig	VQVLVSTSNASSLDGARSLLITEATQ---LGPVGGVFNLAMVLRDAVLENQTPPEFFQDVS
	B_2Vz8_mFAS	VQVLVSTSNASSLDGARSLLITEATQ---LGPVGGVFNLAMVLRDAVLENQTPPEFFQDVS
PMA Clade linear PK	B_PhiaA	VTIRAPPCDVGSRDSLVAALLESV-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNASYEDWVINTT
	B_ACRTS2	VCVRAVACNVGDRDELQNALESV-K--DLPAIRGVVHSAI LSLDKLPFNASYEDWVINTT
	B_KZL71667.1	VCVKAFACNVGRNEVNVVVESI-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNASYEDWVINTT
	B_PhomA	VCVKIFSCNVGRDELAEVVEAI-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNASYEDWVINTT
	B_EFQ87497.1	VCVKIFSCNVGRNELAEIVEAI-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNASYEDWVINTT
	B_ALP31875.1	ITVRALACDVGRDELGALEDI-A--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYQDWTITR
	B_TMC_PKS	VTVRAYACDVGSKSDLQVVESI-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_CubeA	IRVRAMACDVGSREALANVLDNI-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_RZR69500.1	VTVRALACDVGSREQVNVVVDISI-Q--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_APX43987.1	VCVRALACDVGSKEELSQLNSI-R--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_THY13897.1	VHVEAFACDVGSPEQLQDIVDVIGK--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_THW243815.1	VHVEAFACDVGSPEQLQDIVDVIGK--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_THW23325.1	VHVEAFACDVGSPEQLQDIVDVIGK--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
TML Clade macrolactam	B_ThmA	VSIRAIACDVGKREDDVNAIQAI-Q--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_007815837.1	AQMRAISCDVGSRAELQRALDSI-R--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_KID86000.1	VQMRAISCDVGSRAELQRALDSI-Q--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_RGP66594.1	IQVRAVTCVGSRESLSSALDVI-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
PSL Clade macrolactone	B_ValA	IQVRAIACDVSRVSLSTALHAV-K--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_TVY55645.1	IHVRAIACDVASREDLGAALDTI-N--DLPPVGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_Akm1A	CHVDQVTGDI TSLDVRRAFTT---A---SLPVIGVIGQAMVLRDMSFNMTDFEFRQPIT
	B_Cim1A	CNVFESQGLTNI SDVRRASFN---A---SLPVGVIGQAMVLRDRMFMTAQAQFREP IA
	B_Apm1A	CQIDLLRGDITKVEDVRRVFAE---T---TVPVAGIIGQAMVLRDRPFANMTVEEYHAAAA
	B_GAP86891.1	CAVYPVQGDVACIEDVQRAFTV---S---GVPVGVIGQAMVLRDRIFSSMTLDEYHKVLS
	B_RDA93594.1	CHADLIRGDVSSLEDVRRAPRE---A---TKPIGGVIGAMVLRDPAPDSISHDDYLAVIQ
	B_RAQ60072.1	CHIHVCRGDVSRILDVQQAFKQ---A---PVPVIGVIGQAMVLRDRPYELMTIKEFHESIE
	B_KAB8076222.1	CKVHVCRGDVSRI LDVRRAPFR---A---PAPVIGVIGQAMVLRDRPYELMTIDYHQSI E
	B_SMQ52978.1	TRVVLVQGDVARYTDVGRCLKA---A---GSPVIRGVVHSAI LSLDKLPFNATYEDWQIVTG
	B_KUM61888.1	CEIDLDSGDVSI EDDVEKAPRQ---T---TVPVAGIIGQAMVLRDRPFSSMSVDEYHGALA
	B_Bref-PKS	CTITLGGQDVSKADDVRRVIKQ---S---PVPVIGVIGQAMVLRDRVFTDMSIEEYHAAVD
	B_KXX83260.1	AKVDLVRGDVSVLEDDVRRVFKS---A---SVPVIGVIGQAMVLRDKVFSMQIEEYHGAVA
B_PQE04373.1	CTVIEAKGDAGDLDFVRSVFRSA---R---PKRIAGVIGQAMVLRDKPYEMMTSHDYHTAIH	
Other Clade	B_DcsA	CEIVEAKGDVADETFVRKIFQE---A---SPAISGVIIGQAMVLRDKPYEIMTHEEYHAAIH
	B_Mpm1A	CKVYEARGDVANLADVKKAFAAA-P---GVPVGGIIGQSMVLRDKPYEAMTVKEYYHDCIA
	B_RDI42230.1	CQIQEAKADVSNVSDVQRAFKE---A---AVPIGGVIGQAMVLRDKPFEVMTVEEYHTTIS
	B_LovB	GRVTVLSMDVTSQNSVEAGLAKL-KDLHLPPVGGIAGPLVLDQVMLNMMELPMMEMVIN
	B_CazF	CRVVAISCDVASEQSI TRALDRCKNEELPPVIRGVIGQAMVLRDKSILEQMTLDDWQTAIR
	B_afOG	CRVAAISCDVADRADLDRAIAA-ASELGFPHVGVIGQAMVLRDQSIIEQMSIADWNAAIK
	B_SQTKS	CVSVVDCDISNKTQVESTMLRLKE--EKLPVIRGVHAGMVLQDSVFEHMTLEDYNTATR
	B_LovF	CTVSVQACDVADSEQLAALQOCRAE-EMPPVIRGVIGQAMVLRDKDALVSMQMTADGFHAALR
	B_bfPKS1	ATVAVYSCDVSKSEQLAELVEESSQ--IMPVIRGVVIGQAMVLRDVLLEKMTLADYKAVTC
	B_Rdc5	TRVQVYLGDVSEASFRGAMEQCSR--ELPPVGVIGQAMVLRDVFPEKMYDDWTTGLR
	B_DHC3	AVVKYQADIANEDAFLSANQQCAA--DLPPVIGVIGQAMVLRDVLPEKMSYEDWGTGTR
	B_Cla2	LDFRVYRGDVSNEESFLDAMKLCSS--DLPPVIGVIGQAMVLRDVLPEKMTHEQWTIPLR
	B_Hpm8	IQVKAYRGDIASEASFLQAMEQCSQ--DLPPVGVIGQAMVLRDVFPEKMSYEDWTVVPG
B_Fum1p	CTAQAVRGDVLNLADVELAMASAPP---GKPIRGVIGQSMVLRDKPFADMSLEDWDTAVK	

Bacterial A type KR	A_ery2	AKAGGAVHLDEL-C---SD--AELFLLFSSGAGVWSSARQGYAAGNAFLDAFARHRRGR
	A_sor6	GKVQGARHLHDL-L---GSRPLDAFVLFSSGAVVWGGQQGGYAAANAFDLALAEQRRSL
	A_pik5	AKTSGAEVLDDL-L---RGTPLDFAFVLYSSNAGVWSSGSGQGVYAAANAHLDALAARRR
Bacterial B type KR	B_ave1	IHLTIITTCDTSNPDQLQQLLNTIPP--QHPL-TTVIHTAGILDDATLTNLTPTQLNNVLR
	B_ave7	AEVRIVACDVGERREVRRLLEGVPA--GCPL-TGVVHAAGVLDDATIASLTPERLGTVFA
	B_ave9	AEVRIVACDVGERREVRRLLEGVPA--GCPL-TGVVHAAGVLDDATIASLTPERLGTVFA
FAS	B_mFAS_rat	PKYNGTLNLDRA-T-REACPELDYFVAFSSVSCGRGNAGQSNYGFANSTMERICEQRRHD
	B_mFAS_pig	PKYSGTANLDRV-T-REACPELDYFVIFSSVSCGRGNAGQANYGFANSAMERICEKRRHD
	B_2VZ8_mFAS	PKYSGTANLDRV-T-REACPELDYFVIFSSVSCGRGNAGQANYGFANSAMERICEKRRHD
PMA Clade linear PK	B_PhiaA	PRVDAAWYLHEL-----LPKNLDFVGLGSLGDSGNGGQAIYAGTAVVYHDWAKWRSAT
	B_ACRTS2	PRVAGAWNLDDL-----LPTDLDFVALSSFNGDTGHTGQAIYAGTAGFYNAFSQYRNNR
	B_KZL71667.1	PRVKGAWNLHEL-----MPADLDFVALSSFNGDTGNMGQAIYAGTA-----HRNSL
	B_PhomA	PRVKGAWNLHEL-----MPDNLDFVALSSFNGDTGNLQAIYAGTAGFYNAFSQYRNSR
	B_EFQ87497.1	PRVKGAWNLHEL-----MPNDLDFVALSSFNGDTGNLQAIYAGTAGFYNAFSKYRNV
	B_ALP31875.1	PRVQGAWNLDAL-----LPKDMDFVALGSLGDTGNGGQAIYAGTAAFYDAFTQYRLAK
	B_TMC_PKS	PRIQGAWNLDL-----LP-DLDFPILGSLFLGDTGNIGQSIIYGGTAAFYSPARYRNAR
	B_CubeA	PRIQGAWNLHEL-----LPNDLDFPILGSLFLGDTGNAGQAIYATTAFFDPAFYRYRNAR
	B_RZR69500.1	PRVQGAWNLDEL-----MPDDLDFPILGSLFLGDTGNGGQAIYAGTAAFYDAFAQYRNAR
	B_APX43987.1	PRVQGAWNLDDL-----MPGDLDFPILGSLFLGDTGNEGQGIYAGTAVFYDAFTRYRNAK
	B_THY13897.1	PRVRGAWNLHNC-----FPEGLDFPILGSLFLGDTGNVQAIYAGTAAFYDGFQYRNAR
B_THZ43815.1	PRVRGAWNLHNC-----FPEGLDFPILGSLFLGDTGNVQAIYAGTAAFYDGFQYRNAR	
B_THW23325.1	PRVRGAWNLHNC-----FPEGLDFPILGSLFLGDTGNVQAIYAGTAAFYDGFQYRNAR	
TML Clade macrolactam	B_ThmA	PRIKGAWNLHEL-----LPNDLDFVLLSTFLAGSGNIGQSIIYSATASFYDSFAEYRNAR
	B_007815837.1	PRAQGAWNLHHL-----LPE-LDFFVILSSLLGDMGNIGQAIYAGTATFPDAPARYRNAR
	B_KID86000.1	PRAQGAWNLHDL-----LPD-LDFFVILSSLLGDTGNIGQAIYAGTATFPDAPARYRNAR
PSL Clade macrolactone	B_RGP66594.1	PKINAAWNHLHL-----IPN-LDFFVALASGANVVGNGVQSIYQCTSSFLDAPAQWRSSK
	B_ValA	PKIDAAWHLHEL-----LPG-LDFFVALSSGIGIVGNVQSIYGGSSSTFLDAPAQYRARQ
	B_TVY55645.1	PKIDAAWHLHEL-----LPT-LDFFVALASGTGVVGNIGQSIYSGTSTFLDAPVQYRTRQ
	B_AkmlA	PKVAGTWNLHHA-S-LELSTSLDFFTLSSVSGLVGQGLQANYAAGNTFLDSFAAYRLQK
	B_CimlA	PKYDGTWNLHNV-S-LEQQQLDFPVLSSISGLVGLQANYAAGNTFLDAPAFAYRLQK
	B_ApmlA	CKIQGTWNLHNC-A-QEAQAPLDFFTLSSISSVLGNPAQGNYSAGCSFQDAPSSYRQEL
	B_GAP86891.1	AKVEGTWNLHNV-S-LEQNLDLDFFTLSSISGLCGTKGQANYAANTFLDAPASYRQNM
	B_RDA93594.1	PKVAGTWNLHNV-A-LEMRELDFFTLSSLIGFAGHNAMANYAANAFLDGPAFYRRGL
	B_RAQ60072.1	GKVQGTWNLHNV-S-IESRSELDFFTLSSISSVVGTPGQANYAANAFDLSFAAHRSSM
	B_KAB8076222.1	GKVQGTWNLHNV-S-VEKGLPLDFFTLSSISSVVGSPGQANYAANAFDLSFAAYRRSM
	B_SMQ52978.1	SKVQGAWNLHRA-A-EELGSLDFFFTLSSISGLIGQKQANYAAGNAFLDALAEHRKAR
Other Clade	B_KUM61888.1	CKVQGTWNLHNA-A-ENLGLQDFFTLSSISGVVGQKQVNYAAGNAFLDSPAAYRRRL
	B_Bref-PKS	CKVAGTWNHNA-L-IEENMKVEFTLSSVSGVVGQKQANYAANAFDLDAFAIYRHN
	B_KXX83260.1	CKVPTWNLHNV-A-QEGLQLSFTLSSVSGVVGQKQANYAANAFDLSFAAYRQSL
	B_PQE04373.1	AKIAGTWNLHNAQ-LEQSQPLDFFTLSSISGVVGNKQQANYAANTFLDSPATYRQGL
	B_DcsA	AKIQGTWALHRA-S-LDQPKNLDFFTLSSISGIVGKQGSNYAANTFLDSPAYYRQSV
	B_MpmlA	CKVAGTWNLHKA-S-LALTQPLDFFTLSSISGVVGNKQQANYAANTFLDAPAFAYRRRQ
	B_RDL42230.1	NKVQGTWNLHKA-A-IEHNLHDLDFFTLSSISGVVQKQQANYAANAFDLDAFARYRQL
	B_LovB	PKVEGVRILHEKFSPTSSNPLDFVVFSSIVAVMGNPQANYSAANCYLQALAQQRVAS
	B_CazF	PKVAGSWNLHNS---FTQRGSLDFVMLSSLSLILGLASQANYAAGGSYQDALARWRQAS
	B_afog	PKVAGTRNLHDR---FSQRNSLDFVMLSSLSAILGWASQASYAAGGTYQDALARWRCSK
	B_SQTKS	PKVAGSWNLHSA---LSD-CDLDFPILSSLAGVSGSASQANYTAGGAYQDALATYRRSR
Other Clade	B_LovF	PKVQGSWNLHRI---AS---DVFVFMVLSLVGMGGAGQANYAAGAFQDALAEHRMAH
	B_bfPKS1	PKIQGTWNLHNV---LP--KDLDFFIMLSSVSGIIGNASQAAAYAGNAFMDAFAAYRNSL
	B_Rdc5	PKVQGTWNLHTF---FDKDRPLDFMIFPSSIAGVFGNPSQAQYAGNTYQDSLAKYRRDR
	B_DHC3	PKIQGTLSLHRY---FSATRPLDFFLICSSISGIFGYAGQTAANYAANTFQDALAQHRRNQ
	B_Cla2	PKIQGTWNLHNY---FDESRLDFMVFCSSTSGIHGYPSSQSYAAGNTYQDTLAAAYRRH
	B_Hpm8	PKVQGSWNLHNY---FSDERPLDFMVICSSSSGIIYGYPSQAQYAGNTYQDALAHYRRSQ
	B_Fumlp	PKVHGTWNLHLA-----APKDLDFFFATGSISSGSGFTPGQANYAAGNTYLTALFEHRRAL

図 3-4-10 マルチモジュラー型 PKS、FAS、HR-PKS 内、KR ドメインのアライメント結果

C. ER ドメインの選択性

E-オレフィンを形成できるように MT、KR、DH ドメインの立体選択性が厳密に制御されていたことは対照的に、ER ドメインによる還元反応は、MT/KR/DH とは独立して作用することが知られている。上述した既知天然物の構造を見ると、ER には *S* 配置のメチル基を与えるものが多いが、fumonisin B1 や betaenone、scyphostatin のように *R* 配置のメチル基だけをもつ天然物も知られている (図 3-4-11)。この場合のように、全ての立体配置が規則と異なる HR-PKS は、特殊な例として本項で扱う。ER ドメインによる還元反応の選択性の違いは、mFAS やバクテリアのマルチモジュラー型 PKS にも見られ、ポリケタイド鎖の構造多様性を創出する要因の一つとなっている。構造多様性に応じた多彩な生物活性が報告されていることを考慮すると、生物は、多様性構築に寄与する機能を進化する過程で保存してきたとも考えられる。

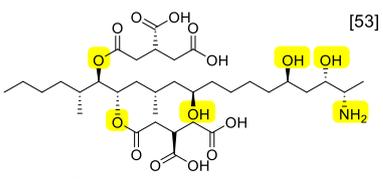
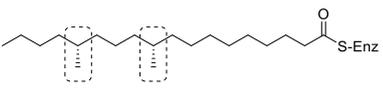
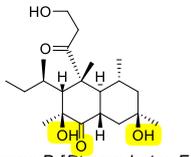
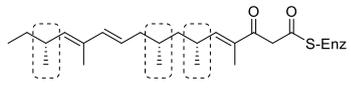
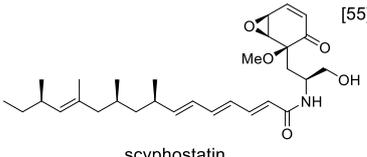
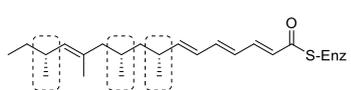
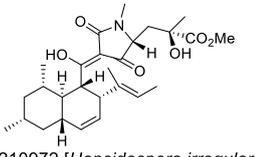
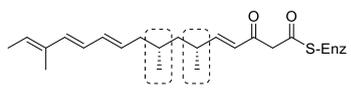
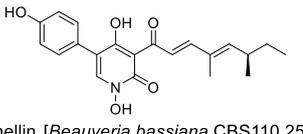
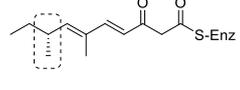
Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
<p>[53]</p>  <p>fumonisin B1 [<i>Fusarium verticillioides</i> Nirenberg] Fum1p</p>		Asymmetric synthesis
<p>[54]</p>  <p>betaenone B [<i>Phoma betae</i> Fr.] Bet1+Bet3</p>		Asymmetric synthesis
<p>[55]</p>  <p>scyphostatin [<i>Trichopeziza mollissima</i> SANK 13892]</p>		Asymmetric synthesis
<p>[56]</p>  <p>Sch210972 [<i>Hapsidospora irregularis</i>] TasS+TasC</p>		X-ray
<p>[57]</p>  <p>Tenellin [<i>Beauveria bassiana</i> CBS110.25] TenS+TenC</p>		X-ray

図 3-4-11. ER ドメインにより *R* 配置のメチル基が導入されるポリケタイド天然物の構造

3-4-5. 立体配置制御則の例外

先述した絶対立体配置が明確に決まっているポリケタイド天然物では、限定的であるが提唱した規則に立体配置が一致しない例がいくつか見つかった。ここで例示した天然物は、以下に示すいずれかのケースに該当する。

- 1) 一つの炭素骨格上に同一の置換基が導入されており、それによって生じた不斉炭素の絶対立体配置が一部異なる。
- 2) 一つの炭素骨格上に *R* 配置の水酸基から生成する *E*-オレフィンと、*S* 配置の水酸基が導入されている。

A. KR ドメインの選択性

Phaenospelide A は PSL タイプのポリケタイドであるが、メチル末端の水酸基のみ規則に反して *S* 配置である。残りのすべての水酸基が *R* 配置であることを考えると、ポリケタイド生合成の最初のラウンドにおいてのみ規則に一致しない反応が起きていると考えられる。同様の事例は、resorcylic acid lactone や構造的に類似した hypothemycin、dehydrocurvularin、monecerin でもみられる (図 3-4-12 A)。

B. DH ドメインの選択性

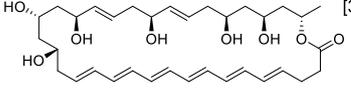
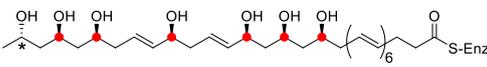
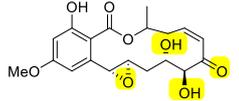
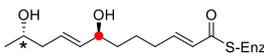
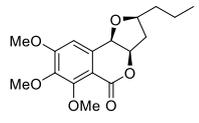
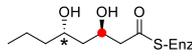
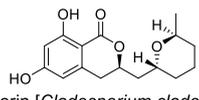
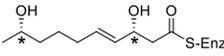
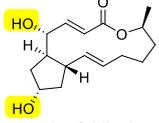
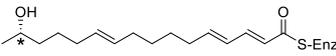
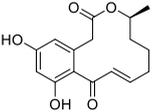
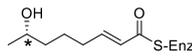
Fusarin 生合成における HR-PKS (Fus1) の DH ドメインはメチル末端に *E*-オレフィンを与えるが、同じ DH ドメインは *E* 体のテトラエンを合成する [63] (図 3-4-12 B)。一般に、ポリケタイド生合成中に *S* 配置の水酸基を有するヒドロキシチオエステルの脱水反応が *syn*-脱離によって進行することで *Z*-オレフィンが合成されることを考えると、fusarin に見られたメチル末端の *Z*-オレフィンは、KR ドメインによって導入された *S* 配置の水酸基を介して生合成されると思われる [63]。同様の *Z*-オレフィン形成は、アミノアシル化生成物の生合成でも報告されている [64]。

C. ER ドメインの選択性

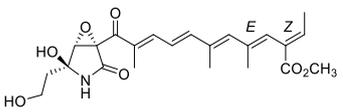
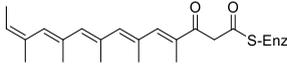
Atpenin や aspyridone の生合成における *trans*-ER は、ポリケタイド生合成の最初のラウンドで *R* 配置のメチル基を生成するが、後のステップでは *S* 配置のメチル基を生成している (図 3-4-12 C)。

上述した例では、規則に反する不斉中心はメチル末端に位置している。また、例外的な機能をもつ *ApmlA* や *Hpm8* などは系統樹上で特定のクレードのみに属していることがわかった。したがって、例外が見つまっている周辺のクレードに属する HR-PKS が生産するポリケタイド鎖の立体配置に注意すれば、本章で提唱した規則は、糸状菌ポリケタイド天然物の絶対立体配置の予測に広く適用可能であると考えられる。

A) exception of KR domain

Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
<p>[35]</p>  <p>phaenospelide A [<i>Arthrinium phaenospermum</i>] ApmIA</p>		<p>Degradation Mosher's method VCD</p>
<p>[46,58]</p>  <p>hypothemycin [<i>Hypomyces trichothecoides</i>] Hpm8</p>		<p>X-ray</p>
<p>[59]</p>  <p>monocerin [<i>Dreschlera monoceras</i>]</p>		<p>Asymmetric synthesis</p>
<p>[60]</p>  <p>cladosporin [<i>Cladosporium cladosporioides</i>] Cla2</p>		<p>Asymmetric synthesis</p>
<p>[61]</p>  <p>brefeldin A [<i>Eupenicillium brefeldianum</i> ATCC 58665] Bref-PKS</p>		<p>Asymmetric synthesis</p>
<p>[62]</p>  <p>dehydrocurvularin [<i>Alternaria zinniae</i>] Dhc3</p>		<p>Asymmetric synthesis</p>

B) exception of DH domain

Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
 <p>fusarin C [<i>Fusarium verticillioides</i>] Fus1</p>		<p>NMR DFT calculation</p>

C) exception of ER domain

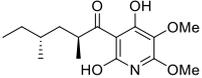
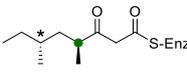
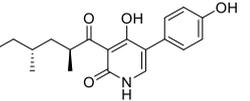
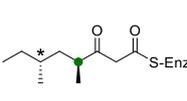
Reported structure	The PK backbone structure	Stereochemical determination
 <p>[65] atpenin B [<i>Penicillium</i> sp. FO-125] ApnA+ApnE</p>		Asymmetric synthesis
 <p>[25,66] aspyridone A [<i>Aspergillus nidulans</i>] ApdA+ApdC</p>		X-ray

図 3-4-12 .メチル末端において制御則に一致しない立体配置がみられるポリケタイド天然物の構造 A) KR ドメインが $^{\circ}\text{S}$ 配置の水酸基を導入する例、B) DH ドメインが Z -オレフィンを与える例、C) ER ドメインが $^{\circ}\text{R}$ 配置のメチル基を導入する例

3-5. まとめ

本研究では、ポリケタイド鎖伸長反応の立体選択性について議論するため、a) 直鎖ポリヒドロキシポリケタイドを与える HR-PKS の異種発現、b) 単離したポリヒドロキシポリケタイドの絶対立体配置の決定に基づく立体配置制御則の提唱、c) 環状ポリヒドロキシポリケタイドにおける制御則の検証、d) 制御則の適用範囲の拡大という戦略に則って、研究を進めた。

標的とした 3-1、3-2、3-3 のような直鎖ポリヒドロキシポリケタイドは、水酸基やメチル基、二重結合が多数存在するため、立体配置制御について知見を得る上で、良い研究対象であると考えた。また、これらの化合物は、ポリケタイド鎖上に二重結合が適度な間隔で配置されるため、オゾン分解によって不斉中心の少ない分解生成物を取得し、合成標品との比較によって絶対立体配置を決められると考えた。これらのポリケタイド鎖の構築には、巨大酵素 HR-PKS に加えて、二重結合の還元反応を担う trans-ER と加水分解反応を担う NRPS 様酵素が必要であったが、当研究室で開発ゲノム編集を用いた麴菌異種発現系を使うことで、3 種の PKS の機能を短期間で解析できた。この過程で、当初の目的であった HR-PKS の立体配置制御機構の解明に加えて、N 末端 C ドメインが触媒する加水分解によるポリケタイド鎖の切り出しを初めて明らかにすることができた。

また、既知天然物の構造、HR-PKS の分子系統解析、モチーフ解析などから、提唱した制御則は、糸状菌由来ポリケタイド鎖に共通する特徴であることを明らかにした。本制御則は、平面構造のみが決まっている天然物の絶対立体配置の決定に役立つ。例えば、cubensic acid には 10 の不斉中心が存在し、合計 1024 通りの立体配置が考えられるが、規則を用いると 1 種類の立体異性体のみ予測することができ、全合成によって絶対立体配置を決める場合に、1 種類を優先して考えることができる。また、水酸基や二重結合がある場合には、モッシュー法やオゾン分解によって比較的絶対立体配置の決定は容易であるが、ポリケタイド鎖上

に独立して存在するメチル基については、その絶対立体配置を決めることは難しい。こうした場合、制御則による立体配置の予測は有効な手法であると考えられる。また、規則に反する機能を有する HR-PKS もみつかったが、これらの HR-PKS は特定のクレードおよび位置に限定的にみられる例外であることがわかった。

以上、第 3 章では、麴菌により 3 種のポリヒドロキシポリケタイドの異種生産を行い、絶対立体配置を決定し、比較することで、HR-PKS における立体配置制御の規則を提唱した。規則の適用範囲を段階的に検証した結果、糸状菌 HR-PKS において汎用的に適用できることがわかった。

参考文献

- [1]: A. W. Alberts, J. Chen, G. Kuron, V. Hunt, J. Huff, C. Hoffman, J. Rothrock, M. Lopez, H. Joshua, E. Harris, A. Patchett, R. Monaghan, S. Currie, E. Stapley, G. Alberts-Schonberg, O. Hensens, J. Hirshfield, K. Hoogsteen, J. Liesch, and J. Springer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*, 7, 3957.
- [2]: H. Svarstad, H. C. Bugge, S. S. Dhillon, *Biodivers. Conserv.* **1969**, *9*, 1521.
- [3]: Y. Kono, J. M. Daly, *Bioorg. Chem.* **1979**, *8*, 391.
- [4]: K. Sargeant, A. Sheridan, J. O'Kelly, and R. B. A. Carnaghan, *Nature*, **1961**, *192*, 1096.
- [5]: W. C. A. Gelderblom, K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vlegaar, N. P. J. Kriek, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1806.
- [6]: Hopwood, D. A., *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 7, 2465.
- [7]: A. L. Edwards, T. Matsui, T. M. Weiss, C. Khosla, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2229.
- [8]: R. J. Cox, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2010.
- [9]: Y.-H. Chooi, Y. Tang, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 9933.
- [10]: a) J. D. BuQLock, T. J. Simpson in *Biosynthesis*, Vol. 6 (Eds.: J. D. BuQLock), Royal Society of Chemistry, London, **1980**, pp. 1 – 39, b) E. Liddle, A. Scott, L.-C. Han, D. Ivison, T. J. Simpson, C. L. Willis, R. J. Cox, *Chem. Commun.* **2017**, *53*, 1727. c) D. M. Roberts, C. Bartel, A. Scott, D. Ivison, T. J. Simpson, R. J. Cox, *Chem. Sci.* **2017**, *8*, 1116.
- [11]: A. Yagi, R. Uchida, K. Kobayashi, H. Tomoda, *J. Antibiot.* **2020**, *73*, 211.
- [12]: a) M. Devys, J. P. F8r8zou, R. S. Topgi, M. Barbier, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1984**, 2133. b) M. Devys, R. S. Topgi, J.-P. F8r8zou, L. Quaino, J.-F. Bousquet, A. Kollmann, M. Barbier, *Phytochemistry*, **1986**, *25*, 531.
- [13]: a) J. M. Gardner, Y. Kono, J. H. Tatum, Y. Suzuki, S. Takeuchi, *Phytochemistry*, **1985**, *24*, 2861. b) J. M. Gardner, Y. Kono, J. H. Tatum, Y. Suzuki, S. Takeuchi, *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 1235.
- [14]: R. L. Edwards, D. J. Maitland, A. J. S. Whalley, *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1991**, 1411.

- [15]: J. Kohno, Y. Asai, M. Nishio, M. Sakurai, K. Kawano, H. Hiramatsu, N. Kameda, N. Kishi, T. Okuda, S. Komatsubara, *J. Antibiot.* **1999**, *52*, 1114.
- [16]: C. E. Elliott, D. L. Callahan, D. Schwenk, M. Nett, D. Hoffmeister, B. J. Howlett, *Fungal Genet. Biol.* **2013**, *53*, 50.
- [17]: R. D. Sgssmuth, A. Mainz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 3770.
- [18]: S. Dekimpe, J. Masschelein, *Nat. Prod. Rep.*, **2021**, *38*, 1910.
- [19]: R. F. Little, C. Hertweck, *Nat. Prod. Rep.*, **2022**, *39*, 163.
- [20]: A. Kotani, Master thesis, Hokkaido University, **2021**
- [21]: W. R. Roush, A. D. Palkowitz, K. Ando, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6348.
- [22]: a) Y. Kasai, J. Naito, S. Kuwahara, M. Watanabe, A. Ichikawa, N. Harada, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.* **2004**, *62*, 1114. b) N. Harada, *Molecules*, **2016**, *21*, 1328.
- [23]: A. P. Pulis, P. Fackler, V. K. Aggarwal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4382.
- [24]: S. M. Ma, J. W.-H. Li, J. W. Choi, H. Zhou, K. K. M. Lee, V. A. Moorthie, X. Xie, J. T. Kealey, N. A. Da Silva, J. C. Vederas, Y. Tang, *Science*, **2009**, *326*, 589.
- [25]: W. Xu, X. Cai, M. E. Jung, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 39, 13604.
- [26]: J. M. Botubol, A. J. Macías-Sánchez, I. G. Collado, R. Hernández-Galán, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2420.
- [27]: A. Kotani, T. Ozaki, J. Takino, S. Mochizuki, K. Akimitsu, A. Minami, H. Oikawa, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **2022**, *86*, *3*, 287–293.
- [28]: Y. Izumi, K. Ohtani, Y. Miyamoto, A. Masunaka, T. Fukumoto, K. Gomi, Y. Tada, K. Ichimura, T. L. Peever, K. Akimitsu, *Mol. Plant Microbe. Interact.*, **2012**, *25*, 1419.
- [29]: F. W. Lichtenthaler, J. Dinges, Y. Fukuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1991**, *30*, 1339.
- [30]: J. Takino, A. Kotani, T. Ozaki, W. Peng, J. Yu, Y. Guo, S. Mochizuki, K. Akimitsu, M. Hashimoto, T. Ye, A. Minami, H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2021**, *60*, 23403.
- [31]: a) J.-P. Guo, C.-Y. Zhu, C.-P. Zhang, Y.-S. Chu, Y.-L. Wang, J.-X. Zhang, D.-K. Wu, K.-Q. Zhang, X.-M. Niu, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 20306. b) J.-M. Zhang, H.-H. Wang, X. Liu, C.-H. Hu, Y. Zou, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 1957.
- [32]: S. B. Krasnoff, U. Englich, P. G. Miller, M. L. Shuler, R. P. Glahn, B. G. G. Donzelli, D. M. Gibson, *J. Nat. Prod.* **2012**, *75*, 175.
- [33]: Y.-M. Shi, C. Richter, V. L. Challinor, P. Grgn, A. G. del Rio, M. Kaiser, A. Schgffler, M. Piepenbring, H. Schwalbe, H. B. Bode, *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1563.
- [34]: K. D. Clevenger, J. W. Bok, R. Ye, G. P. Miley, M. H. Verdán, T. Velk, C. Chen, K. Yang, M. T. Robey, P. Gao, M. Lamprecht, P. M. Thomas, M. N. Islam, J. M. Palmer, C. C. Wu, N. P. Keller, N. L. Kelleher, *Nat. Chem. Biol.* **2017**, *13*, 895.
- [35]: Y. Morishita, H. Zhang, T. Taniguchi, K. Mori, T. Asai, *Org. Lett.* **2019**, *21*, 4788.

- [36]: D.-W. Gao, C. S. Jamieson, G. Wang, Y. Yan, J. Zhou, K. N. Houk, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 80.
- [37]: Y. Morishita, Y. Aoki, M. Ito, D. Hagiwara, K. Torimaru, D. Morita, T. Kuroda, H. Fukano, Y. Hoshino, M. Suzuki, T. Taniguchi, K. Mori, T. Asai, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 5876.
- [38]: M. O. Adeboya, R. L. Edwards, T. Laessoe, D. J. Maitland, *J. Chem. Res. Synop.* **1995**, *9*, 356.
- [39]: a) R. J. Cox, F. Glod, D. Hurley, C. M. Lazarus, T. P. Nicholson, B. A. M. Rudd, T. J. Simpson, B. Wilkinson, Y. Zhang, *Chem. Commun.* **2004**, 2260. b) K. C. Nicolaou, E. W. Yue, S. I. Greca, A. Nadin, Z. Yang, J. E. Leresche, T. Tsuru, Y. Naniwa, F. de Riccardis, *Chem. Eur. J.* **1995**, *1*, 467.
- [40]: a) J. M. Winter, M. Sato, S. Sugimoto, G. Chiou, N. K. Garg, Y. Tang, K. Watanabe, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 17900. b) M. Makrrougras, R. Coffinier, S. Oger, A. Chevalier, C. Sabot, X. Franck, *Org. Lett.* **2017**, *19*, 4146.
- [41]: J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, C. R. Hutchinson, *Science* **1999**, *284*, 1368.
- [42]: a) Y. -M. Chiang, E. Szewczyk, T. Nayak, A. D. Davidson, J. F. Snachez, H. -C. Lo, H. Wen-Yueh, H. Simityan, E. Kuo, A. Praseuth, K. Watanabe, B. R. Oakley, C. C. C. Wang, *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 527. b) S. Ghosh, T. K. Pradhan, *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 3697.
- [43]: a) Y. Li, N. Lan, L. Xu, Q. Yue, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *102*, 9881. b) W. R. Leonard, K. M. Belyk, D. R. Bender, D. A. Conlon, D. L. Hughes, P. J. Reider, *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4201.
- [44]: a) N. Liu, E. D. Abramyan, W. Cheng, B. Perlatti, C. J. B. Harvey, G. F. Bills, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 6043. b) S. Jendrzewski, P. Ermann, *Tetrahedron Lett.* **1993**, *34*, 615.
- [45]: a) I. Fujii, M. Hashimoto, K. Konishi, A. Unezawa, H. Sakuraba, K. Suzuki, H. Tsushima, M. Iwasaki, S. Yoshida, A. Kudo, R. Fujita, A. Hichiwa, K. Saito, T. Asano, J. Ishikawa, D. Wakana, Y. Goda, A. Watanabe, M. watanabe, Y. Masumoto, J. Kanazawa, H. Sato, M. Uchiyama. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 8464. b) V. Sofiyev, G. Navarro, D. Trauner, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 149.
- [46]: a) C. R. Reeves, Z. Hu, R. Reid, J. T. Kealey, *Appl. Environ. Microbiol.* **2008**, *74*, 5121. b) R. M. Garbaccio, S. J. Stachel, D. K. Baeschlin, S. J. Danishefsky, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10903.
- [47]: T. Hai, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 1271.
- [48]: G. Sabitha, K. P. Reddy, S. P. Reddy, J. S. Yadav, *Tetrahedron Lett.* **2014**, *55*, 3227.
- [49]: Y. Schmidt, K. Lehr, L. Colas, B. Breit, *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 7071.
- [50]: D. Saha, S. Guchhait, R. K. Goswami, *Org. Lett.* **2020**, *22*, 745.

- [51]: G. V. M. Sharma, A. V. S. Raja Rao, V. S. Murthy, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 4117.
- [52]: a) A. Baerga-Ortiz, B. Popovic, A. P. Siskos, H. M. OQHare, D. Spiteller, M. G. Williams, N. Campillo, J. B. Spencer, P. F. Leadlay, *Chem. Biol.* **2006**, *13*, 277. b) A. T. Keatinge-Clay, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 141.
- [53]: a) F. Yu, X. Zhu, L. Du, *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *248*, 257. b) C. L. Pereira, Y. –H. Chen, F. E. McDonald, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 6066.
- [54]: a) T. Ugai, A. Minami, R. Fujii, M. Tanaka, K. Gomi, H. Oikawa, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1878. b) S. Miki, Y. Sato, H. Tabuchi, H. Oikawa, A. Ichihara, S. Sakamura, *J. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1990** 1228.
- [55]: E. Pitsinos, N. Athinaios, Z. Xu, G. Wang, E. Negishi, *Chem. Commun.* **2010**, *46*, 2200.
- [56]: a) T. B. Kakule, S. Zhang, J. Zhan, E. W. Schmidt, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 2295. b) M. Sato, F. Yagishita, T. Mino, N. Uchiyama, A. Patel, Y. –H. Chooi, Y. Goda, W. Xu, H. Noguchi, T. Yamamoto, K. Hotta, K. N. Houk, Y. Tang, K. Watanabe, *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 2294.
- [57]: a) L. M. Hallo, J. W. Marshall, A. A. Yakasai, Z. Song, C. P. Butts, M. P. Crump, M. Heneghan, A. M. Bailey, T. J. Simpson, C. M. Lazarus, R. J. Cox, *ChemBioChem*, **2008**, *9*, 585. b) A. A. Yakasai, J. Davison, Z. Wasil, L. M. Halo, C. P. Butts, C. M. Lazarus, A. M. Bailey, T. J. Simpson, R. J. Cox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 10990.
- [58]: a) H. Zhou, Z. GAo, K. Qiao, J. Wang, J. C. Vederas, Y. Tang, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, *8*, 331. b) T. Agatsuma, A. Takahashi, C. Kabuto, S. Nozoe, *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 373.
- [59]: A. K. Ghosh, D. S. Lee, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 6191.
- [60]: R. V. K. Cochrane, R. Sanichar, G. R. Lambkin, B. Reiz, W. Xu, Y. Tang, J. C. Vederas, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 664.
- [61]: a) A. O. Zabala, Y. –H. Chooi, M. S. Choi, H. –C. Lin, Y. Tang, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 1576. b) Y. Wu, J. Gao, *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1533.
- [62]: R. V. K. Cochrane, Z. Gao, G. R. Lambkin, W. Xu, J. M. Winter, S. L. Marcus, Y. Tang, J. C. Vederas, *ChemBioChem*, **2015**, *16*, 2479. b) S. R. Allu, S. Banne, J. Jiang, N. Qi, J. Guo, Y. He, *J. Org. Chem.* **2019**, *84*, 7227.
- [63]: E.-M. Niehaus, K. Kleigrew, P. Wiemann, L. Studt, C. M. K. Sieber, L. R. Connolly, M. Freitag, U. Ggldener, B. Tudzynski, H.-U. Humpf, *Chem. Biol.* **2013**, *20*, 1055.
- [64]: M.-C. Tang, C. R. Fischer, J. V. Chari, D. Tan, S. Suresh, A. Chu, M. Miranda, J. Smith, Z. Zhang, N. K. Garg, R. P. St. Onge, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 8198.
- [65]: a) U. Bat-Erdene, D. Kanayama, D. Tan, W. C. Turner, K. N. Houk, M. Ohashi, Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2020**, *142*, 8550. b) M. Ohtawa, S. Ogihara, K. Sugiyama, K. Shiomi, Y. Harigaya, T. Nagamitsu, S. Omura, *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 289.
- [66]: Z. Wasil, K. A. K. Pahirulzaman, C. Butts, T. J. Simpson, C. M. Lazarus, R. J. Cox, *Chem. Sci.* **2013**, *4*, 3845.

第4章 実験項

4-1. Chapter 2

4-1-1. General

All reagents commercially supplied were used as received. Column chromatography was carried out on 60 N silica gel (Kanto Chemicals). Optical rotations were recorded on JASCO P-2200 digital polarimeter. ¹H- and ²H-NMR spectra were recorded on Bruker DRX-500 or Bruker AMX-500 spectrometer (500 MHz for ¹H-NMR). NMR spectra were recorded in CDCl₃ (99.8 atom% enriched, Kanto), CD₃OD (99.8 atom% enriched, TCI), or CHCl₃ (Kanto). ¹H chemical shifts were reported in δ value based on residual chloroform (7.26 ppm) and methanol (3.34 ppm) as a reference. GC-MS and UPLC analyses were conducted with an MS-2010 (Shimadzu) and a Waters ACQUITY UPLC, respectively.

Oligonucleotides for polymerase chain reactions (PCRs) were purchased from Hokkaido System Science Co., Ltd. PCRs were performed with a BioRad S1000 thermal cycler. 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.

Compound **2-2**, **2-3**, **2-4** were synthesized according to the literature procedures [1, 2].

4-1-2. Strain

Escherichia coli HST08 was used for cloning and following standard recombinant DNA techniques. *E. coli* BL21-Gold (DE3) was used for protein expression. *Botrytis cinerea* MAFF 306914 (NARO genebank, Japan) was used for extraction of genomic DNA. Sequences of *bcABA1*, *bcABA2*, *bcABA3* and *bcABA4* from MAFF 306914 are nearly identical to those of strain B05.10. A fungal host strain used in this study was *A. oryzae* NSAR1, a quadruple auxotrophic mutant (*niaD*⁻, *sC*⁻, Δ *argB*, *adeA*⁻), for fungal expression.

4-1-3. Genomic DNA preparation.

Genomic DNA of *B. cinerea* MAFF 306914 was extracted according to the following method ; the mycelia of fungus were collected and dried using paper towel. The dried mycelia were frozen in liquid nitrogen and crushed by SK-mill (Tokken). To the frozen powder was added extraction buffer (400 mM of Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM of NaCl, 20 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 1% of sodium dodecyl sulfate) and the suspension was kept at room temperature for 5 min. To the suspension was added phenol:chloroform solution and the mixture was vortexed for 2 sec. After incubation at 65 °C for 60 min, the reaction mixture was centrifuged at 12000 rpm for 5 min. The supernatant

was then treated with RNase at 37 °C for 90 min. To the reaction mixture was then added phenol: chloroform solution. After being vortexed for 2 sec, the mixture was centrifuged at 12000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to a new centrifuge tube and re-extracted twice with phenol: chloroform solution followed by chloroform. To the final supernatant was added cold-isopropanol and CH₃COONa solution and genomic DNA was recovered by centrifugation at 12000 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.

4-1-4. Construction of *E. coli* expression plasmids.

Previous mRNA analysis showed that the *bcABA3* has no intron. Therefore, it was amplified from genomic DNA of *B. cinerea* MAFF 306914 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 *NdeI* site of pColdI using In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories) to construct expression plasmid pColdI-*bcABA3*. The sequence *bcABA3* from MAFF 306914 was identical to that of B05.10. This plasmid was introduced into *E. coli* BL21-Gold (DE3) for overexpression. The transformant was 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. Harvested cells were resuspended in disruption buffer (25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 5 mM imidazole, 5 mM MgCl₂) and disrupted by sonication. After centrifugation, the supernatant was applied to a Ni-NTA column to purify the BcABA3.

4-1-5. BcABA3 Assays (*in vitro*).

Typical conditions are as follows; a reaction mixture (100 μL of Tris-HCl buffer (pH 7.4)) containing 130 μM of FPP, 0.5 mM of EDTA, 5 μM of MgCl₂, 2 mM of DTT, 2 μg (0.4 μM) of BcABA3 was incubated at 30 °C for 1 hr. The reaction was quenched by the addition of Hexane (50 μL) and the resultant mixture was vortexed. The supernatant was directly analyzed by a GC-MS QP2010 apparatus (Shimadzu, Kyoto, Japan) with a HP-5 MS capillary column (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm film thickness: J&W Scientific, Folsom, CA). Each sample was injected onto the column at 100 °C in the split less mode. After isothermal hold at 100°C for 3 min, the column temperature was increased by 14°C min⁻¹ to 268°C. The flow rate of the helium carrier gas was 0.66 mLmin⁻¹.

4-1-6. Construction of *A. oryzae* expression plasmids.

The *bcABA1-bcABA4* were amplified from genomic DNA of *B. cinerea* MAFF 306914 with

primer set as shown in Supplemental Table 4-1-1. PCR reactions were performed with the KOD-Plus-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site of pTAex3 [3], pUSA2 [4], or pAdeA2 [5] using In-Fusion Advantage PCR cloning kit (Clontech Laboratories) or NEBuilder HiFi DNA Assembly cloning kit (NEW ENGLAND BioLabs) to construct expression plasmids pAdeA2-*bcABA3*. Other plasmids, pTAex3-*bcABA1*, pTAex3-*bcABA2* and pUSA2-*bcABA24* were constructed in our previous study [6].

4-1-7. Transformation of *Aspergillus oryzae*

Transformation of *A. oryzae* NSAR1 (1.0×10^8 cells) was performed by the protoplast-polyethylene glycol method reported previously to construct following transformants [6]; AO-*bcABA1* (plasmids used in the transformation; pTAex3-*bcABA1*), AO-*bcABA2* (pTAex3-*bcABA2*), AO-*bcABA124* (pTAex3-*bcABA1* and pUSA2-*bcABA24*) and AO-*bcABA1234* (pTAex3-*bcABA1*, pUSA2-*bcABA24* and pAdeA2-*bcABA3*). AO is an abbreviation of *Aspergillus oryzae* and AO-*bcABA*x means a transformant harboring *bcABA*x gene.

4-1-8. Analysis of the metabolites.

Mycelia of AO-*bcABA1234* was inoculated into MPY (maltose-peptone-yeast extract: 3% maltose, 1% polypeptone, 0.5% yeast extract) medium containing appropriate nutrients (0.925% (NH₄)₂SO₄, 0.15% methionine, 0.01% adenine, 0.06% arginine) medium (2 mL) in 10 mL test tube. Each culture was incubated at 30 °C for 2 days. The fermentation broth was soaked in acetone (2.5 mL) for 12 hr. After filtration, the filtrate was concentrated in vacuo. The residual water was adjusted to pH 1.0 and then extracted with EtOAc, and the organic layers were concentrated in vacuo. These crude extracts were directly analyzed by a UPLC-MS equipped with a ACQUITY UPLC BEH C10 (φ2,1 x 50 mm) at the following conditions (**condition 1**: flow rate; 0.7 mL/min, solvent system; acetonitrile in H₂O containing 0.1% of formic acid, 0-1 min: 10%; 1-3 min: a linear gradient 10%-95%; 3-5 min: 95 %)

4-1-9. Biotransformations

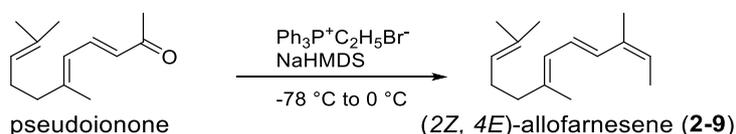
Mycelia of the transformant (AO-*bcABA1*, AO-*bcABA2*, or AO-*bcABA124*) were inoculated into 5 mL of MPY medium in 20 mL Erlenmeyer flask. After 2 d incubation at 30°C, substrate (100 µg, methanol solution) was then administered to the culture broth. After an additional 6 h incubation at 30 °C, the mycelia were collected by filtration and soaked in acetone (10 mL). The organic layer was then concentrated in vacuo. The residual water was adjusted to pH 1.0 and then extracted with EtOAc, and the organic layers were concentrated in vacuo. The crude extracts were directly analyzed by a UPLC-MS apparatus according to **condition 1**.

4-1-10. Isolation of biosynthetic intermediates

α -ionylideneethane (2-2); Mycelia of AO-*bcABA3* were inoculated into a solid medium containing polished rice (20 g) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30°C for 7 days. After extraction with hexane, the organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated *in vacuo*. Purification of the residue by silica gel column chromatography (hexane) gave **2-2** (4.0 mg from 0.2 kg of rice medium). [α]_D + 254.6° (c 0.50, CHCl₃); FIHR-MS: calcd. for C₁₅H₂₄ [M]⁺: 204.1878, found: 204.1884. The ¹H-NMR data are in good agreement with the reported data [1].

α -ionylideneacetic acid (2-3); The crude extracts of the biotransformation experiment of **2-2** (4.6 mg) using AO-*bcABA1* were purified with silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/5) followed by further purification utilizing HPLC equipped with Wakosil-II 5C18 (ϕ 4.6 mm x 250 mm) at the following conditions (λ = 210 nm, flow rate; 1.0 mL/min, solvent system; acetonitrile in H₂O containing 0.1% of trifluoroacetic acid, 0–1 min: a linear gradient 90%–100%; 10–20 min: 100%) to afford **2-3** (1.9 mg). [α]_D + 179.7° (c 0.16, EtOH). [lit. [α]_D + 450.3° (c 0.6, EtOH)] [7]. ESI-HR-MS: calcd. for C₁₅H₂₁O₂ [M-H]⁻: 233.1547, found: 233.1549. The ¹H-NMR data are in good agreement with the reported data [2].

4-1-11. Synthesis of allofarnesene (2-9)



To a suspension of ethyltriphenylphosphonium bromide (446 mg, 1.3 mmol) in 10 mL of dry THF was added potassium tert-butoxide (1.0 M solution in THF, 1.06 mL, 1.12 mmol) at -78°C. After stirring for 1 h, to the solution was added pseudo-ionone (154 mg, 0.8 mmol) at -78°C and the mixture was stirred at 0°C for 1 h. The mixture was quenched with sat. NH₄Cl (3 mL) and then extracted with Et₂O. The combined organic layers were washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel column chromatography (hexane) to afford isomeric mixtures of **2-9** (46.3 mg, 30%). This method was previously described [1].

4-1-12. BcABA3 Assays (*in vivo*).

The transformant EC-*bcABA3* was grown at 37 °C at an OD₆₀₀ of ~0.6 in 500 mL flask in the

presence of fosmidomycin (5.5 μM). After cooling at 4 $^{\circ}\text{C}$, isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (0.1 mM) was added to the culture. After incubation at 16 $^{\circ}\text{C}$ for 17 h, the cells were harvested by centrifugation at 4000 rpm. Harvested cells were resuspended in 100 mM of phosphate buffer (pH 7.4). To the cell suspension was added β -farnesene or allofarnesene (1 μg) at 16 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min. During those periods, the volatile organic compounds were extracted by a SPME fiber (50/30 μm DVB/CAR/PDMS, Stableflex, 24Ga, Manual Holder), which was conditioned by inserting it into the GC injector to prevent contamination. After extraction, the fiber was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and then inserted into the injection port to analyze the sample.

4-1-13. Kinetics assay of BcABA3.

Kinetics assay of BcABA3 was performed by the procedure previously described [8].

The enzymatic activity was assayed in 25 mM HEPES buffer (pH 8.0) containing 20 mM MgCl_2 and FPP in a total volume of 100 μL . The concentration of FPP was varied at 2.25, 4.5, 9, 18, 36, 72, 108, 144 μM . The reaction was initiated by adding 0.5 μg (0.1 μM) of BcABA3 and incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min. The reaction mixture was extracted with 50 μL of hexane and 2 μL of the crude sample was used for GC-MS analysis. K_m -constants were determined from Lineweaver-Burk plots and k_{cat} -values were estimated from the protein concentration.

4-1-14. Enzymatic synthesis of deuterium labeled α -ionylideneethane (2-2)

Labeling of the unit 3 (or unit 2 and 3)

Typical conditions are as follows; a reaction mixture (100 μl of Tris-HCl buffer (pH 7.4)) containing 5 (10) μg of labeled-IPP, 5 mM of MgCl_2 , 0.5 mM of EDTA, 2 mM of DTT, 5 μg of GPP (DMAPP), 2 μg of FPP synthase and 2 μg of BcABA3 was incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$. After 1 h, the reaction mixture was extracted with hexane (50 μL) and the crude extract was directly used for the analysis with MS-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan), using a HP-5 MS capillary column (0.32 mm \times 30 m, 0.25 μm film thickness: J&W Scientific, Folsom, CA, USA).

Each sample was injected onto the column at 100 $^{\circ}\text{C}$ in the split less mode. After isothermal hold at 100 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min, the column temperature was increased by 14 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1} to 268 $^{\circ}\text{C}$. The flow rate of the helium carrier gas was 0.66 mLmin^{-1} .

Labeling of the unit 2

Typical conditions are as follows; A reaction mixture (100 μl of Tris-HCl buffer (pH 7.4))

containing 5 µg of labeled-IPP, 5 mM of MgCl₂, 0.5 mM of EDTA, 2 mM of DTT, 5 µg of DMAPP, and 2 µg of GPP synthase was incubated at 30 °C. After 1 h, the reaction mixture was filtrated by utilizing the Amicon Ultra centrifugal filter (Merck Millipore, Billerica, MA, USA). To the filtrate was added 5 µg of non-labeled IPP, 2 µg of FPP synthase, and 2 µg of BcABA3 and the reaction mixture was incubated at 30 °C. The reaction mixture was extracted with hexane and the crude extract was directly used for the analysis with MS-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) according to the same procedure described above. These procedures were previously described [9].

4-1-15. BcABA3 (mutant) cloning and analysis of metabolites.

Mutations were introduced into pCold-*bcABA3* by PCR using the respective primers described in the Table 4-1-2, according to the manufacture's protocol for the Prime STAR Mutagenesis Basal Kit (Takara). The following plasmids were constructed in this study; pColdI-*bcABA3_W198A, F199A, R200A, R202A, D203A, D205A, R209A, F210A, Y242A, D243A, F247A, Y248A, K249A, H250A, R251A, E253A, E255A, R311A, R312A, Y313A, R314A, F315A, E317A, E318A, N319A*

These plasmids were separately introduced into *E. coli* BL21-Gold (DE3) for overexpression. The transformant was grown at 37 °C at an OD₆₀₀ of ~0.6 in 100 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 volatile organic compounds were extracted by a SPME fiber (50/30um DVB/CAR/PDMS. Stableflex, 24Ga, Manual Holder), which was conditioned by inserting it into the GC injector to prevent contamination. After extraction, the fiber was pulled into the needle sheath and the SPME device was removed from the vial and then inserted into the injection port to analyze the sample.

Table 4-1-1. Oligonucleotides used for construction of expression plasmids.

Insert	Sequence 5'-3'	Size Vector
<i>bcABA1</i>	F: CAAGCTCCGGAATTC ATGTCTAATTCTATATTG	1769 bp
	R: TACCGAGCTCGAATTC CCTATTTGTATTCTGTTC	pTAex3
<i>bcABA2</i>	F: AATTCGAGCTCGGTAC ATGCTGCTTAGCATTAAAG	1810 bp
	R: CTACTACAGATCCCCGG CTATCTAGGAACCTCTTTTAAC	pUSA2
linker	F: AGAGGTTCTAGATAGCCGGGGATCTGTAGTAGCTC	860 bp
	R: ATGTTGAGAGGACATTGCGGCCGCTAGCTCAAATC	pUSA2

<i>bcABA4</i>	F: TGAGCTAGCGGCCGCA ATGTCCTCTCAACCATTC	840 bp
	R: CTACCCGGGTCAC TAGCTAACATCTCCATCCGCC	pUSA2
<i>bcABA3-AO</i>	F: ATCGATTTGAGCTAGC ATGCAGCAAGTTATTACTCAA	1323 bp
	R: TAGTGCGGCCGCTAGC TCAAACCTGGAACCTCAAATG	pAdeA2
<i>bcABA3-EC</i>	F: ATATCGAAGGTAGGC ATATGCAGCAAGTTATTAC	1323 bp
	R: GGGTACCGAGCTCCATATG TCAAACCTGGAACCTCAAATG	pColdI

Table 4-1-2. Oligonucleotides used for mutation of BcABA3

Mutant	Sequence 5'-3'
W198A	F: AGACAC GCG TTCCGCATGCGGGATTGT
	R: GCGGA ACGCG TGTCTCGGTGATTGCGC
F199A	F: CACTGG GCG CGCATGCGGGATTGTGA
	R: CATGCG GCGCC AGTGTCTCGGTGATT
R200A	F: TGGTTC GCG ATGCGGGATTGTGATGCA
	R: CCGCAT GCG GAACCAAGTGTCTCGGTGA
R202A	F: CGCAT GCGG ATTGTGATGCACTGGCC
	R: ACAAT CGCC ATGCGGAACCAAGTGTCT
D203A	F: ATGCGG GCG TGTGATGCACTGGCCAGA
	R: ATCACAC GCCC GCATGCGGAACCAAGTG
D205A	F: GATTGT GCGG CACTGGCCAGATTCACG
	R: CAGTG CCGCA CAATCCCGCATGCGGAA
R209A	F: CTGGCC GCG TTACGATTGCCTCGGCT
	R: CGTGA ACGCG GGCCAGTGCATCACAATC
F210A	F: GCCAG AGCG ACGATTGCCTCGGCTCT
	R: AATCGT CGCT CTGGCCAGTGCATCAC
Y242A	F: ACTCT GCGG ATGCAGTGGCTTTCTA
	R: TGCAT CCGCC CAGAGTGTCTCCAATTT
D243A	F: CTGTAT GCGG CAGTGGCTTTCTACAAA
	R: CACTG CCGC ATACAGAGTGTCTCCAAT
F247A	F: GTGGCT GCG TACAAACATCGTGCTGA
	R: TTTGT ACGCG AGCCACTGCATCATACA
Y248A	F: GCTTT GCG GAAACATCGTGCTGAAGG
	R: ATGTTT CGCG GAAAGCCACTGCATCAT

K249A	F: TTCTAC GCGC ATCGTGCTGAAGGTGAG
	R: ACGAT GCGC GTAGAAAGCCACTGCATC
H250A	F: TACAA GCGC GCTGCTGAAGGTGAGACA
	R: AGCAC GCGC TTTGTAGAAAGCCACTGC
R251A	F: AAACAT GCGG GCTGAAGGTGAGACAAAC
	R: TTCAG C GCGC ATGTTTGTAGAAAGCCAC
E253A	F: CGTGCT GCGG GTGAGACAAACAGCACA
	R: CTCAC C GCGC AGCACGATGTTTGTAGAA
E255A	F: GAAGGT GCGA CAAACAGCACATTTGCC
	R: GTTTGT C GCGC ACCTTCAGCACGATGTTT
R311A	F: ATGAT GCGC GTTACCGATTCGTTGAA
	R: GTAAC GCGC CATCATCATGTGTATAGG
R312A	F: ATGCG C GCGT ACCGATTCGTTGAAGAG
	R: TCGGT A C GCGC GCATCATCATGTGTAT
Y313A	F: CGCCGT GCGC GATTTCGTTGAAGAGAA
	R: GAATC GCGC ACGGCGCATCATCATGT
R314A	F: CGTTAC GCGT TCGTTGAAGAGAATTTG
	R: AACGA A C GCGT AACGGCGCATCATCAT
F315A	F: TACCG A GCGG TGAAGAGAATTTGAC
	R: TTCA A C GCGT TCGGTAACGGCGCATCA
E317A	F: TTCGTT GCGG GAGAATTTGACAATTGGC
	R: ATTCT C GCA ACGAACCGGTAACGGCG
E318A	F: GTTGA A GCGA AATTTGACAATTGGCAAG
	R: CAAATT C GCT TTCAACGAACCGGTAACG
N319A	F: GAAGAG GCGT TGACAATTGGCAAGTC
	R: TGTCA A C GCT CCTTCAACGAATCGGT

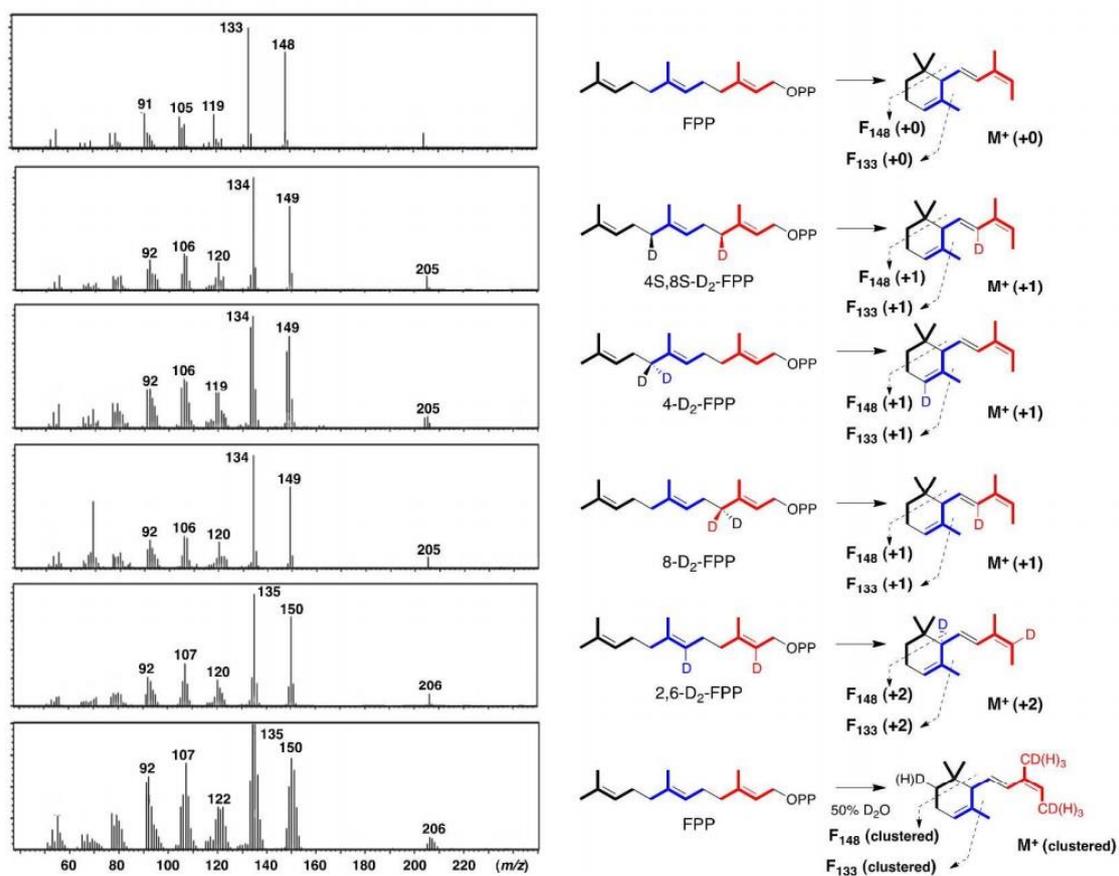


Figure 4-1-1. EI-MS spectra of BcABA3 enzymatic products using deuterium labelled FPP

4-2. Chapter 3 [Synthetic study on standards]

4-2-1. General.

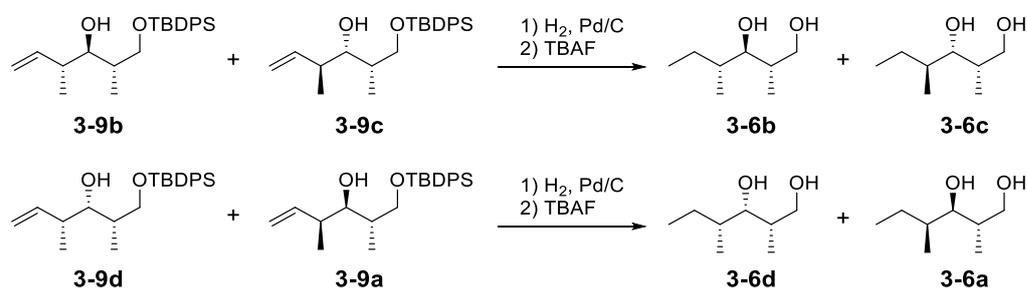
All reactions were conducted in flame-dried or oven-dried glassware under an atmosphere of dry nitrogen or argon. Oxygen and/or moisture sensitive solids and liquids were transferred appropriately. Concentration of solutions in vacuo was accomplished using a rotary evaporator fitted with a water aspirator. All reaction solvents were purified before use: Tetrahydrofuran was distilled from sodium. Toluene was distilled over molten sodium metal. Dichloromethane, dimethylformamide, diethylamine, triethylamine and diisopropylethylamine were distilled from CaH₂. Methanol was distilled from Mg/I₂. Flash column chromatography was performed using the indicated solvents on E. Qingdao silica gel 60 (230 – 400 mesh ASTM). TLC was carried out using pre-coated sheets (Qingdao silica gel 60-F250, 0.2 mm). Compounds were visualized with UV light, iodine, p-anisaldehyde stain, ceric ammonium molybdate stain, or phosphomolybdic acid in EtOH. ¹H NMR spectra were recorded on Bruker Avance 300, Avance 400, Avance 500, or DRX-500 spectrometers. Chemical shifts were reported in parts per million (ppm), relative to either a tetramethylsilane (TMS) internal standard or the signals due to the solvent. The following abbreviations are used to describe spin multiplicity: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, qn = quintet, m = multiplet, br = broad, dd = doublet of doublets, dt = doublet of triplets, dq = doublet of quartets, ddd = doublet of doublet of doublets; other combinations are derived from those listed above. Coupling constants (J) are reported in Hertz (Hz) for corresponding solutions, and chemical shifts are reported as parts per million (ppm) relative to residual CHCl₃ δ_H (7.26 ppm). ¹³C Nuclear magnetic resonance spectra were recorded using a 75 MHz, a 100 MHz or a 125 MHz spectrometer for corresponding solutions, and chemical shifts are reported as parts per million (ppm) relative to residual CDCl₃ δ_C (77.16 ppm). High resolution mass spectra were measured on ABI Q-star Elite. Optical rotations were recorded on a Rudolph AutoPol-I polarimeter or a JASCO P-2200 polarimeter. Data were reported as follow: optical rotation (c (g/100 mL), solvent).

4-2-2. Synthesis of fragments, 3-6a-3-6d

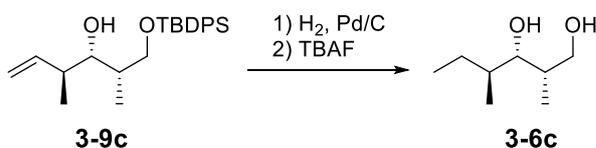


3-9a was synthesized according to the literature procedure [10]. **3-9a**: $[\alpha]_D^{22} = +2.3$ (c 1.0, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.66 – 7.70 (m, 4H), 7.37 – 7.46 (m, 6H), 5.85 (m, 1H), 4.98 – 5.02 (m, 2H), 3.82 (dd, J = 9.9, 4.8 Hz, 1H), 3.64 (dd, J = 10.4, 6.1 Hz, 1H), 3.49 (m,

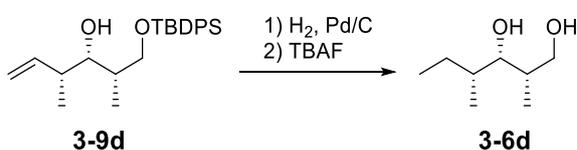
1H), 3.40 (d, J = 4.3 Hz, 1H), 2.33 (m, 1H), 1.83 (m, 1H), 1.06 (d, J = 6.5 HZ, 1H), 1.05 (s, 9H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, Acetone-d₆) δ 142.5, 135.8, 135.7, 130.0, 129.9, 127.9, 127.9, 114.2, 79.2, 68.6, 41.2, 37.1, 27.0, 19.3, 14.3, 13.3. To a solution of **3-9a** (7.3 mg, 0.02 mmol) in ethyl acetate (1 mL) was added Pd/C (1 mg) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 4 h under H₂ atmosphere. The mixture was filtrated through Celite and washed with ethyl acetate. The filtrate was concentrated in vacuo. The crude sample directly used for the following reaction. To a solution of the crude sample in THF (1 mL) was added 1M THF solution of TBAF (60 μL, 0.06 mmol) at room temperature for 1 h. The reaction mixture was directly concentrated in vacuo. The crude sample was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/10) to afford **3-6a** (2.0 mg, 0.014 mmol, 72%). **3-6a**: [α]_D²² = +7.92 (c 0.20, CH₂Cl₂); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.73 (dd, J = 10.7, 3.7 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 7.8, 10.7 Hz, 1H), 3.50 (dd, J = 8.9, 2.8 Hz, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.53 (m, 1H), 1.40 (m, 1H), 1.30 (m, 1H), 0.94 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 0.88 (d, J = 6.7 Hz, 3H), 0.82 (d, J = 6.9 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 80.24, 69.00, 37.57, 37.14, 26.88, 13.73, 12.05, 12.05. FIMS (m/z): calculated for C₈H₁₉O₂ [M+H]⁺ : 147.1385, found 147.1378.



A mixture of **3-9b** and **3-9c** and **3-9d** and **3-9a** were synthesized according to the literature procedures [10]. Diastereomeric alcohols, **3-9b** and **3-9c** were synthesized as a mixture via the similar procedures described above from a mixture of **3-9b** and **3-9c**. Similarly, **3-9d** was synthesized as a mixture of **3-9d** and **3-9a**. **3-9b** and **3-9c** (**3-9b**:**3-9c** = 1:2): [α]_D²³ = +1.60 (c 1.33, CH₂Cl₂); FIMS (m/z): calculated for C₈H₁₉O₂ [M+H]⁺ : 147.1385, found 147.1388. **3-9b**: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.78 (dd, J = 10.8, 3.6 Hz, 1H), 3.63 (dd, J = 10.8, 6.8 Hz, 1H), 3.37 (dd, J = 7.3, 4.3 Hz, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.59 (m, 1H), 1.14 (m, 1H), 0.92-0.94 (m, 6H), 0.90 (d, J = 7.1 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 75.2, 67.9, 37.6, 36.9, 22.6, 16.2, 14.4, 11.9.

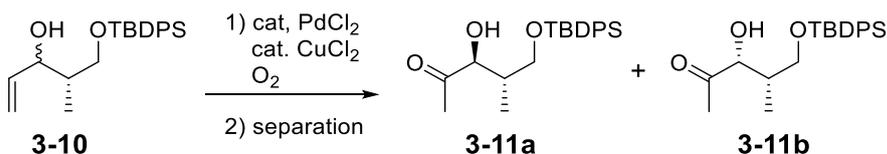


3-9c: $[\alpha]_D^{22} = -1.33$ (c 2.62, CH_2Cl_2); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 3.73 (dd, $J = 10.6, 4.1$ Hz, 1H), 3.67 (dd, $J = 10.6, 5.6$ Hz, 1H), 3.52 (dd, $J = 9.3, 2.1$ Hz, 1H), 1.82 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.46 (m, 1H), 1.14 (m, 1H), 0.92 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.90 (t, $J = 7.5$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 77.9, 68.0, 37.9, 36.2, 25.3, 15.0, 11.0, 8.9. FIMS (m/z): calculated for $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 147.1385, found 147.1388.



3-9d and **3-9a** (**3-9d**:**3-9a** = 1:2): $[\alpha]_D^{23} = +8.19$ (c 0.26, CH_2Cl_2); FIMS (m/z): calculated for $\text{C}_8\text{H}_{19}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 147.1385, found 147.1381. **3-9d:** $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 3.64-3.74 (m, 2H), 3.52 (dd, $J = 7.9, 3.2$ Hz, 1H), 1.23-1.65 (m, 3H), 1.10 (m, 1H), 0.98 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.97 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 78.3, 68.2, 38.0, 36.9, 26.0, 15.1, 11.5, 10.2.

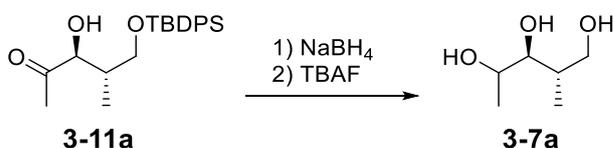
4-2-3. Synthesis of fragments 3-7a and 3-7b



3-10 was synthesized as a diastereomixture (d.r. = 1:1) according to the literature procedure [11]. **3-10:** $[\alpha]_D^{23} = +4.1$ (c 0.1, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.68-7.70 (m, 8H), 7.39-7.48 (m, 12H), 5.84 – 5.96 (m, 2H), 5.30 – 5.37 (m, 2H), 5.18 – 5.22 (m, 1H), 4.37 – 4.39 (m, 1H), 4.13 (t, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.82 (dd, $J = 10.2, 4.1$ Hz, 1H), 3.69 – 3.70 (m, 2H), 3.63 (m, 1h), 1.95 – 2.03 (m, 1H), 1.80-1.90 (m, 1H), 1.08 (s, 9H), 0.87 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 0.86 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 139.5, 138.7, 135.6, 135.6, 135.6, 135.5, 132.9, 132.8, 132.7, 129.8, 127.7, 115.7, 115.1, 77.7, 75.3, 68.4, 67.6, 39.9, 39.8, 26.8, 26.8, 19.0, 13.3, 11.0.

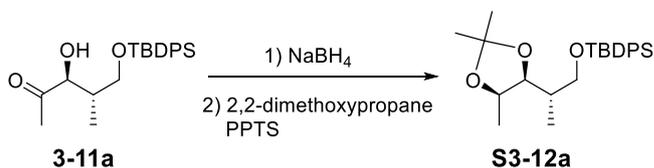
We basically follow the previous procedure in Wacker oxidation [12]. Briefly, PdCl_2 (25.0 mg,

0.14 mmol, 0.1 equiv.) and CuCl₂ (139.6 mg, 1.41 mmol, 1.0 equiv.) were dissolved in 1 mL of a 7: 1 (v/v) solution of DMF: H₂O. The suspension was stirred for 1 hr under O₂ atmosphere. To the suspension was added **3-10** (500 mg, 1.41 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 24 hr under O₂ atmosphere. The reaction was quenched by 1M HCl solution and extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated in vacuo. The residue was purified by column chromatography (hexane/ethyl acetate = 25) to afford **3-11a** (62.0 mg, 0.167 mmol, 12%) and **3-11b** (54.0 mg, 0.146 mmol, 11%). **3-11a** (anti): [α]_D²³ = +17.28 (c 0.77, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.62-7.64 (m, 4H), 7.38-7.44 (m, 6H), 3.84 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 3.60 (dd, J = 10.3, 9.5 Hz, 1H), 3.39 (dd, J = 10.3, 4.6 Hz, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.01 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 209.31, 135.77, 135.66, 133.34, 133.01, 129.91, 129.86, 127.87, 127.85, 79.73, 64.38, 39.21, 26.87, 25.93, 19.15, 15.05. **3-11b** (syn): [α]_D²³ = -9.31 (c 0.89, CHCl₃); ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.69-7.74 (m, 4H), 7.37-7.46 (m, 6H), 3.76 (dd, J = 9.9, 8.7 Hz, 1H), 3.63 (dd, J = 9.9, 5.6 Hz, 1H), 3.41 (d, J = 4.8 Hz, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.09 (s, 9H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 210.65, 135.76, 135.68, 133.84, 133.58, 129.88, 129.87, 127.87, 127.86, 76.96, 66.07, 38.67, 27.03, 25.51, 19.40, 9.18.

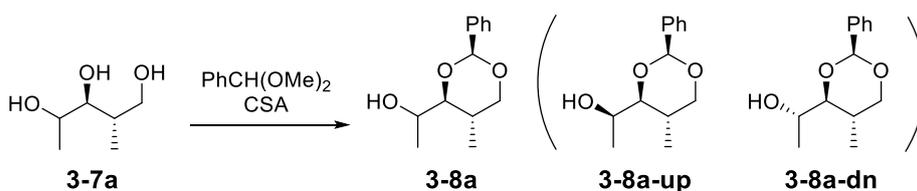


To a solution of **3-11a** (54.9 mg, 0.148 mmol) in MeOH (5 mL) was added NaBH₄ (56.0 mg) at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 2 hr at 0 °C. After addition of H₂O, the mixture was directly concentrated in vacuo. The residues were extracted with CH₂Cl₂, and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated in vacuo. The crude sample was directly used for the following reaction. To a solution of the crude sample in THF (2 mL) was added 1M THF solution of TBAF (346 μ L, 0.346 mmol) at room temperature. The reaction mixture was stirred for 30 min. The mixture was directly concentrated in vacuo. The crude sample was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 2/1) to afford **3-7a** (9.7 mg, 0.072 mmol, 54%, major: minor = 2:1). We basically used this mixture **3-7a** for further derivatization leading to **3-8a**. **3-7a**: [α]_D²³ = -1.21 (c 7.31, MeOH); FIMS (m/z): calculated for C₆H₁₅O₃ [M+H]⁺: 135.1021, found 135.1017. **3-7a** (major isomer): ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.89 (dq, J = 3.1, 6.2 Hz, 1H), 3.77 (dd, J = 3.7, 10.7 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 3.7, 10.7 Hz, 1H), 3.33 (dd, J = 3.0, 5.6 Hz, 1H), 1.88 (m, 1H), 1.24 (d, J = 7.0, 3H), 0.97 (d, J = 7.0 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 80.07, 68.49, 66.18, 37.57, 20.41, 14.87. **3-7a** (minor isomer): ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 3.93

(dq, $J = 4.1, 6.2$ Hz, 1H), 3.67 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.59 (dd, $J = 3.7, 7.3$ Hz, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.20 (d, $J = 7.0$, 3H), 0.86 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 79.36, 68.87, 66.99, 36.55, 16.69, 13.84.

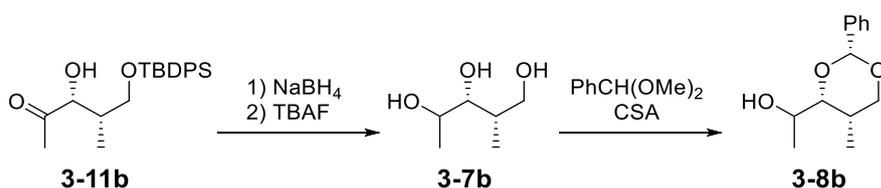


To determine the configuration at C4 position, the crude sample of NaBH_4 reduction was separately subjected to derivatization using 2,2-dimethoxypropane. To a solution of the crude sample (10.8 mg, 0.081 mmol) in dimethoxypropane (200 μL) was added pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS, 0.5 mg) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 1 hr. The reaction was quenched by sat. NaHCO_3 aq. and extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo. The crude sample (8.0 mg) was directly analyzed by NMR. Based on the NOE analysis, the major isomer was determined to be *R*. **3-12a** (major isomer): ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 7.66-7.70 (m, 4H), 7.36-7.44 (m, 6H), 3.95 (dq, $J = 8.0, 6.0$ Hz, 1H), 3.75 (dd, $J = 9.9, 4.7$ Hz, 1H), 3.66 (dd, $J = 9.9, 5.9$ Hz, 1H), 3.57 (dd, $J = 8.0, 7.5$ Hz, 1H), 1.86 (m, 1H), 1.30 (d, $J = 6.0$ Hz, 3H), 1.05 (s, 9H), 1.0 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 135.8, 129.7, 129.7, 127.8, 127.7, 107.6, 83.7, 75.3, 66.0, 39.0, 27.4, 19.5, 19.5, 13.7.



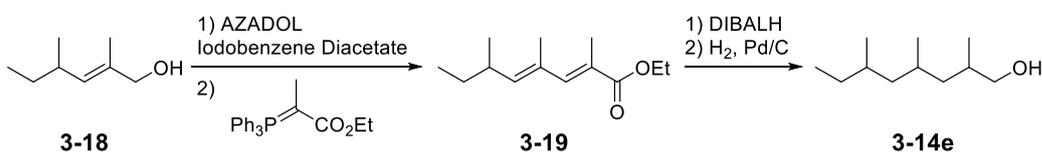
To a solution of **3-7a** (7.2 mg, 0.054 mmol) in CH_2Cl_2 (400 μL) was added PhCH(OMe)_2 (12.3 mg, 0.08 mmol) and CSA (0.6 mg, 0.003 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 2 hr. The reaction was quenched by sat. NaHCO_3 aq. and extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo. The crude sample was purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 5/1) to afford **3-8a** (4.5 mg, 0.020 mmol, 37%). We basically used this mixture for further derivatization leading to **3-8a-S**. However, for structure determination, we purified the major isomer **3-8a-up** by careful silica gel column chromatography and confirmed that **3-8a-up** has an 2,3-anti configuration. **3-8a-up**: $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -0.65$ (c 0.15, CHCl_3); FIMS (m/z): calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$: 222.1256, found 222.1255. **3-8a-up** (major isomer):

$[\alpha]_D^{23} = -0.65$ (c 0.15, CHCl_3); $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48-7.50 (m, 2H), 7.34-7.42 (m, 3H), 5.54 (s, 1H), 4.17 (dd, $J = 11.4, 5.0$ Hz, 1H), 3.95 (brt, $J = 6.8$ Hz, 1H), 3.53 (t, $J = 11.4$ Hz, 1H), 3.32 (dd, $J = 10.1, 1.7$ Hz, 1H), 2.28 (m, 1H), 1.33 (d, $J = 6.5$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 138.6, 129.0, 128.4, 126.1, 101.1, 85.9, 73.0, 66.4, 29.9, 20.6, 12.3. **3-8a-dn** (minor isomer): $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48-7.50 (m, 2H), 7.34-7.42 (m, 3H), 5.51 (s, 1H), 4.11 (dd, $J = 11.1, 4.7$ Hz, 1H), 3.98 (m, 1H), 3.65 (dd, $J = 10.3, 2.8$ Hz, 1H), 3.52 (t, $J = 11.1$ Hz, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.28 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ 138.6, 129.1, 128.5, 126.4, 101.6, 86.0, 73.1, 67.5, 30.9, 17.2, 12.0.



Diastereomeric alcohol **3-8b** was prepared from **3-11b** via the similar procedures described above. **3-8b** (4:1 mixture of two diastereomers): $[\alpha]_D^{23} = +8.19$ (c 0.35, MeOH); FIMS (m/z): calculated for $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{O}_3$ $[\text{M}]^+$: 222.1256, found 222.1248. **3-8b** (major): $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48-7.50 (m, 2H), 7.34-7.42 (m, 3H), 5.53 (s, 1H), 4.10 (dd, $J = 11.1, 2.3$ Hz, 1H), 4.06 (dd, $J = 11.1, 1.5$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.71 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.25 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.23 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H). **3-8b** (minor): $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48-7.50 (m, 2H), 7.34-7.42 (m, 3H), 5.52 (s, 1H), 4.30 (dd, $J = 11.9, 4.6$ Hz, 1H), 4.16 (dd, $J = 11.9, 5.8$ Hz, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.65 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H), 1.91 (m, 1H), 1.31 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H).

4-2-4. Synthesis of fragments, 3-14e

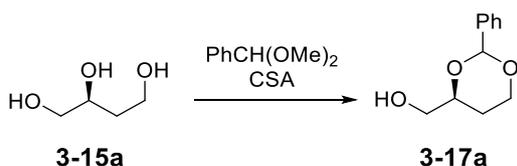


To a solution of **3-18** (709.2 mg, 55.3 mmol) [13] in CH_2Cl_2 (14 mL) was added 2-hydroxy-2-azaadamantane (AZDOL, 58.9 mg, 0.39 mmol) and iodobenzene diacetate (2.3 g, 7.3 mmol). The reaction was stirred at room temperature for 2 h. To the reaction mixture was added sat. NaHCO_3 and 20% Na_2SO_4 aq. and the mixture was stirred at r.t. for 20 min. The aqueous layer was then extracted with CH_2Cl_2 . The combined extracts were concentrated in vacuo to

afford crude extracts. This crude extracts passed through silica gel to afford partially purified sample, which was directly used for the following reaction. To a solution of the crude sample in CH₂Cl₂ (11 mL) was added ethyl 2-(triphenylphosphoranylidene)propionate (1.9 g, 1.5 eq.). The reaction was stirred at 40 °C for 12 h. The reaction mixture was diluted with hexane (10 mL) and the resultant precipitate was filtrated. The filtrate was concentrated in vacuo to afford crude extracts. The residue was purified by column chromatography (EtOAc/hexane =20:1) to give **3-19** (297.8 mg, 14.2 mmol, 27%). **3-19**: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.11 (s, 1H), 5.37 (d, J = 9.7 Hz, 1H), 4.20 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 2.38 (m, 1H), 2.00 (d, J = 1.3 Hz, 3H), 1.83 (d, J = 1.2 Hz, 3H), 1.24 – 1.42 (m, 2H), 1.30 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 3H), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, 3H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 169.4, 143.3, 142.9, 130.9, 125.3, 60.7, 34.7, 30.3, 20.5, 16.6, 14.5, 14.1, 12.1.

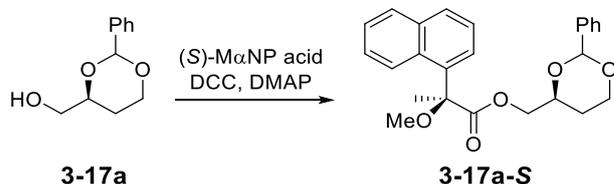
To a solution of **3-19** (297.8 mg, 14.2 mmol) in CH₂Cl₂ (4.7 mL) was added DIBALH (1M solution in toluene, 4.25 mL). The reaction was stirred at -78 °C for 30 min and then the temperature was gradually increased to r.t.. To the reaction mixture was then added methanol (2 mL) and sat. potassium sodium tartrate (10 mL) and the mixture was stirred for 3 hr. The organic layer was concentrated in vacuo to afford crude extracts. To a solution of the crude sample in MeOH (2 mL) was added Pd/C and the mixture was stirred under H₂ atmosphere at room temperature for 12 hr. The mixture was filtrated and the filtrate was concentrated in vacuo to afford a mixture of **3-14e** (83.5 mg, 4.7 mmol, 33%). The ¹H and ¹³C NMR data are in good agreement with the combined data of **3-14a-3-14d**.

4-2-5. Synthesis of fragments, **3-17a**



3-17a was prepared from commercially available **3-15a** via the similar procedures described above. **3-17a**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.49-7.51 (m, 2H), 7.34-7.40 (m, 3H), 5.55 (s, 1H), 4.30 (ddd, J = 11.5, 5.2, 1.1 Hz, 1H), 3.95-4.03 (m, 2H), 3.67 (m, 1H), 1.92 (m, 1H), 1.45 (m, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 138.5, 129.1, 128.4, 126.2, 101.4, 77.7, 66.7, 65.8, 26.9.

4-2-6. Esterification of alcohols with MaNP acid



To a solution of **3-17a** (8.8 mg) in CH₂Cl₂ (200 μL) was added (S)-2-methoxy-2-(1-naphthyl)propionic acid (MaNP acid) (16.7 mg, 0.073 mmol), DCC (32.7 mg, 0.159 mmol) and DMAP (33.2 mg, 0.272 mmol) and the reaction mixture was stirred at room temperature for 6 hr. The reaction mixture was concentrated in vacuo and the crude products were purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 6/1) to give **3-17a-S** (16.2 mg, 0.040 mmol, 88%). In a similar manner, alcohols **3-6**, **3-8**, **3-14**, **3-17**, and **3-16** were converted into the (S)-MaNP esters **3-6-S**, **3-8-S**, **3-14-S**, **3-17-S**, **3-16-S** and the (R)-MaNP esters **3-6-R**, **3-8-R**, **3-14-R**, **3-17-R**, **3-16-R**.

4-2-7. Analytical conditions

3-6 (GC-MS, chiral column): Column: Beta DEXTM 120 fused silica capillary column (0.25 mm × 30 m, 0.25 mm film thickness; SUPELCO) Conditions: 60°C for 1 min, 60 – 160°C (rate: 25°C/min), 160°C for 10 min at a flow rate of 0.59 mL/min (helium carrier gas).

3-6-S/R (UPLC-MS, non-chiral column): Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 column (130Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm; Waters) Conditions: 0 – 0.5 min = 20% B, 0.5 – 2.5 min = 20% – 50% B, 2.5 – 4.5 min = 50% B, 4.5 – 5.0 min = 50% - 100% B (A: H₂O+0.1% of formic acid, B: CH₃CN+0.1% of formic acid) at a flow rate of 0.7 mL/min.

3-8 (UPLC-MS, non-chiral column):

Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 column (130Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm; Waters) Conditions: 0 – 0.5 min = 20% B, 0.5 – 2.5 min = 20% – 30% B, 2.5 – 4.5 min = 30% B, 4.5 – 5.0 min = 30% – 100% B (A: H₂O+0.1% of formic acid, B: CH₃CN+0.1% of formic acid) at a flow rate of 0.7 mL/min.

3-8-S/R (UPLC-MS, non-chiral column):

Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 column (130Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 50 mm; Waters) Conditions: 0 – 0.5 min = 20% B, 0.5 – 2.5 min = 20% – 60% B, 2.5 – 4.5 min = 60% B, 4.5 – 5.0 min = 60% – 100% B (A: H₂O+0.1% of formic acid, B: CH₃CN+0.1% of formic acid) at

a flow rate of 0.7 mL/min.

3-14 (GC-MS, chiral column):

Column: Beta DEXTM 120 fused silica capillary column (0.25 mm × 30 m, 0.25 mm film thickness; SUPELCO) Conditions: 60°C for 1 min, 60 – 130°C (rate: 25°C/min), 130°C for 10 min at a flow rate of 0.59 mL/min (helium carrier gas).

3-14-S/R (UPLC-MS, non-chiral column):

Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 column (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 50 mm; Waters) Conditions: 0 – 0.5 min = 20% B, 0.5 – 1.5 min = 20% – 75% B, 1.5 – 4.5 min = 75% B, 4.5 – 5.0 min = 75% – 100% B (A: H₂O+0.1% of formic acid, B: CH₃CN+0.1% of formic acid) at a flow rate of 0.7 mL/min.

3-17-S/R ((UPLC-MS, non-chiral column):

Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 column (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 50 mm; Waters) Conditions: 0 – 0.5 min = 20% B, 0.5 – 2.5 min = 20% – 50% B, 2.5 – 4.5 min = 50% B, 4.5 – 5.0 min = 50% – 100% B (A: H₂O+0.1% of formic acid, B: CH₃CN+0.1% of formic acid) at a flow rate of 0.7 mL/min.

3-16-S/R (UPLC-MS, non-chiral column):

Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 column (130Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 50 mm; Waters) Conditions: 0 – 0.5 min = 20% B, 0.5 – 2.5 min = 20% – 30% B, 2.5 – 4.5 min = 30% B, 4.5 – 5.0 min = 30% – 100% B (A: H₂O+0.1% of formic acid, B: CH₃CN+0.1% of formic acid) at a flow rate of 0.7 mL/min.

4-3. Chapter 3 [Heterologous expression study]

4-3-1. 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-NMR spectra were recorded on Bruker DRX-500 or Bruker AMX-500 spectrometer (500 MHz for ¹H-NMR). NMR spectra were recorded in CDCl₃ (99.8 atom % enriched, Kanto) and CD₃OD (99.8 atom% enriched, Kanto). ¹H chemical shifts were reported in δ value based on residual CDCl₃ (7.26 ppm) and methanol (3.31 ppm) as references. ¹³C chemical shifts were reported in δ value based on chloroform (77.16 ppm) and methanol (49.0 ppm). 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. HPLC and UPLC analysis were conducted with a Shimadzu Prominence and a Waters ACQUITY UPLC, respectively. Oligonucleotides for polymerase chain reactions (PCRs) were purchased from Hokkaido System Science Co., Ltd. PCRs were performed with a BioRad S1000 thermal cycler.

4-3-2. Strain and culture conditions.

Escherichia coli HST08 was used for cloning and following standard recombinant DNA techniques. A fungal host strain used in this study was *A. oryzae* NSPID1 [14], a strain with a highly efficient gene-targeting background (*niaD*⁻, *sC*⁻, Δ *pyrG*, Δ *ligD*) for expression. *Pseudophialophora* sp. BF-0158, a phialotides producing strain, was used for genomic DNA and total RNA extraction.

4-3-3. Genomic DNA preparation.

Genomic DNA was extracted according to the following method: the mycelia of fungus were collected 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 (AR015-24, MX-307, TOMY) 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 (AR015-24, MX-307, TOMY) 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 (AR015-24, MX-307, TOMY) 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.

4-3-4. Genome sequencing and analysis.

Genome sequencing of *Pseudophialophora* sp. BF-0158 were performed by Hokkaido System Science Co., Ltd. (Hokkaido, Japan) with an Illumina HiSeq 2000 system. Sequence assembly was performed with Velvet44 version 1.2.08 (<http://www.ebi.ac.uk/~zerbino/velvet/>). Gene prediction was then performed with

BlastStation-Local (TM Software, Inc.) for the local BLAST search and 2ndFind (a Web-Based Support Tool to Find Secondary Metabolite Biosynthetic Gene Cluster, <http://biosyn.nih.gov/2ndfind/>) for the analysis of each contig.

4-3-5. Total RNA and cDNA preparation.

Pseudophialophora sp. BF-0158 was grown on Potato-Glucose (PG) medium for 3 days at 27 °C with agitation (170 rpm). Total RNA was extracted from each dried mycelia using TRIzol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and then treated with DNase I (TaKaRa) for reverse transcription. Complementary DNA (cDNA) was synthesized with PrimeScript™ II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara) using the oligo (dT) primer according to the manufacturer's instructions. The cDNA was used as a template of the PCR reactions for subcloning of each *phia* gene.

4-3-6. Construction of *A. oryzae* expression plasmids.

The *phiaA*, *phiaB*, *phiaC*, and *phiaD* were amplified from cDNA of *Pseudophialophora* sp. BF-0158 with primer set as shown in Table S2. The *phiaA* (ca. 8 kbp) was divided into two fragments (Fr1-Fr2) for the amplification. PCR reactions were performed with the KOD-FX-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site of pDP801 [15], pDP201 [16], to construct the following expression plasmids; pDP801::*phiaA*, pDP201::*phiaBCD*, pDP201::*phiaBC*, pDP201::*phiaCD*, and pDP201::*phiaBD*.

The *phomA*, *phomB*, and *phomC* were amplified from synthetic DNA (synthesized by JGI) with primer set as shown in Table 4-3-1. The *phomA* (ca. 8 kbp) was divided into three fragments (Fr1-Fr3) for the amplification. PCR reactions were performed with the KOD-FX-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site of pDP801 and pDP201, to construct the following expression plasmids; pDP801::*phomA*, and pDP201::*phomBC*.

The ACRTS2 were amplified from either genomic DNA of ACRTS2 producer or synthetic DNA (JGI) with primer set as shown in Table 4-3-1. The ACRTS2 (ca. 8 kbp) was divided into two fragments (Fr1-Fr2) for the amplification. PCR reactions were performed with the KOD-FX-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site of pDP801 [15] to construct the following expression plasmids; pDP801::ACRTS2.

Mutations of *phiaC* were introduced into a plasmid pDP201::*phiaBC* by PCR using respective primers described in Table 4-3-1 according to the manufacturer's protocol for the PrimeSTAR

Mutagenesis Basal Kit (Takara).

4-3-7. Transformation of *Aspergillus oryzae* (genome-editing method).

A spore suspension of *A. oryzae* NSPID1 (1.0×10^8 cells) was inoculated into CD (0.3% of NaNO_3 , 0.2% of KCl, 0.1% of K_2HPO_4 , 0.05% of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2% of dextrin, 0.002% of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15% of methionine, 0.9% of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.488% of uracil, 0.2% of uridine, 100 mL, pH 5.5) medium supplemented with appropriate nutrients. After 2 days incubation at 30 °C (200 rpm), mycelia was collected by filtration and washed with water. Protoplasting was performed using Yatalase (Takara; 5.0 mg mL^{-1}) in Solution 1 (0.8 mM of NaCl, 10 mM of NaH_2PO_4 , pH 6.0) at 30 °C for 2 h. Protoplasts were centrifuged at 800 g for 5 min and washed with 0.8 M of NaCl solution. Then, protoplasts were adjusted to 2.0×10^8 cells/mL by adding Solution 2 (0.8 M of NaCl, 10 mM of CaCl_2 , 10 mM of Tris-HCl, pH 8.0) and Solution 3 (40% (w/v) of PEG4000, 50 mM of CaCl_2 , 50 mM of Tris-HCl, pH 8.0) in 4/1 volume ratio. To the protoplast solution (200 μL) was added a cas9 plasmid (3 μg) and a donor plasmid (3 μg). The aliquot was incubated on ice for 20 min and then Solution 3 (1 mL) added to the aliquot. After 20 min incubation at room temperature, Solution 2 (10 mL) added to the mixtures and the mixture was centrifuged at 1,500 g for 5 min. After decantation, the residue was diluted with Solution 2 (500 μL) and the mixture (100 μL) was poured onto the CD agar plate (1.5%) supplemented with 4.65% of NaCl and then overlaid with the soft-top CD agar (0.61%) containing 21.75% of sorbitol. The plates were incubated at 30 °C for 3-7 days. The transformants constructed in this study is summarized as follows; AO-*phiaABCD*, AO-*phiaABC*, AO-*phiaAB*, AO-*phiaAC*, AO-*phomABC*, and AO-ACRTS2.

4-3-8. Extraction of metabolites.

Mycelia of *A. oryzae* transformants were inoculated into either a MPY medium or 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 3 days. After extraction with acetone, the extract was concentrated in vacuo to afford crude extracts. The residues were extracted with ethyl acetate. The combined organic layer was washed with brine, dried over Na_2SO_4 , and concentrated in vacuo.

4-3-9. Analysis of the metabolites.

The crude extracts were analyzed by a UPLC-MS apparatus (Waters) as follows; Column: ACQUITY UPLC® BEH C18 column (130Å, 1.7 μm , 2.1 mm \times 50 mm; waters) Conditions: 0 – 0.5 min = 20% B, 0.5 – 3.5 min = 20% – 100% B (A: $\text{H}_2\text{O} + 0.1\%$ of formic acid, B: $\text{CH}_3\text{CN} + 0.1\%$ of formic acid) at a flow rate of 0.7 mL/min.

4-3-10. Isolation of metabolites.

3-4; The crude extracts (528.9 mg) from AO-*phiaABCD* (1.0 L of MPY medium, 30 °C, 4 days) were purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate / methanol = 10/1) a followed by MPLC equipped with ODS column (condition is shown below) to give **3-4** (25.1 mg). MPLC condition: A: H₂O + 0.1% TFA, B: MeOH + 0.1% TFA, 0-3 min B; 80%, 3-18 min B; 80-100% [α]_D²² = +4.0 (c 0.22, MeOH); HRMS (*m/z*): calculated for C₂₉H₅₀O₆Na [M+Na]⁺: 517.3505, found 517.3508. The NMR data are summarized in Table 4-3-2.

3-5; The crude extracts (438.4 mg) from AO-*phiaACD* (1.0 L of MPY medium, 30 °C, 4 days) were purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate / methanol = 10/1) followed by MPLC equipped with ODS column (condition is shown below) to give **3-5** (2.3 m). MPLC condition: A: H₂O + 0.1% TFA, B: MeOH + 0.1% TFA, 0-3 min B; 80%, 3-18 min B; 80-100% [α]_D²³ = +18.7 (c 0.27, MeOH); HRMS (*m/z*): calculated for C₂₉H₄₈O₆Na [M+Na]⁺: 515.3349, found 515.3351. The NMR data are summarized in Table 4-3-2.

3-13; The crude extracts (420.3 mg) from AO-*phomABC* (1.0 L of MPY medium, 30 °C, 4 days) were purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate / methanol = 10/1) followed by MPLC equipped with ODS column (condition is shown below) to give **3-13** (2.2 mg). MPLC condition: A: H₂O + 0.1% TFA, B: MeOH + 0.1% TFA, 0-3 min B; 50%, 3-23 min B; 50-100% [α]_D²² = +16.9 (c 0.05, MeOH); HRMS (*m/z*): calculated for C₃₄H₅₆O₆Na [M+Na]⁺: 583.3969, found 583.3974. The NMR data are summarized in Table 4-3-3.

3-20; The crude extracts (342 mg) from AO-ACRTS2 (120 g of rice medium, 30 °C, 12 days) were purified by silica gel column chromatography (hexane/ethyl acetate = 1/10) followed by further purification utilizing HPLC equipped with reverse phase column Wakopak navi (10 mm x 250 mm) to give **3-20** (5.9 mg). The NMR data are in good agreement with the reported data [17]. [α]_D²² = +58 (c 0.07, MeOH) [lit. [α]_D²¹ +44 (c 0.22, MeOH)]; HRMS (*m/z*): calculated for C₁₈H₃₀O₄Na [M+Na]⁺: 333.2036, found 333.2036.

4-3-11. Ozonolysis of 3-4 and 3-13

Ozone was bubbled through a solution of **3-4** (24.5 mg, 0.05 mmol) in methanol/CH₂Cl₂ = 1/2 (2.5 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 (56.7 mg, 0.15 mmol). After 1 hour, the reaction was quenched with water (2.5 mL). The reaction mixture was concentrated in vacuo. The residues (about 2.5 mL water layer) was extracted with CH₂Cl₂ and the combined organic layer was washed with brine, dried over Na₂SO₄, and concentrated in vacuo to afford crude extracts including fragment **3-6** (12.4 mg). This crude sample was directly subjected to the ¹H-NMR and GC-MS analysis. The remaining water layer was

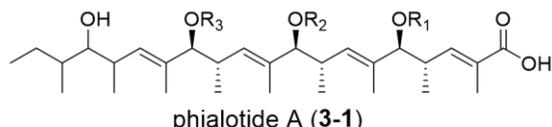
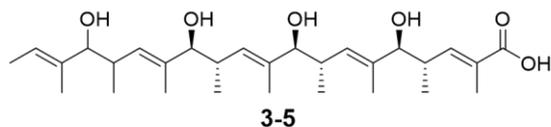
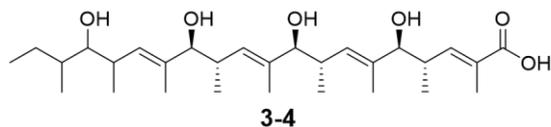
concentrated in vacuo to afford crude extracts including fragment **3-7**. The crude sample was partially purified by silica gel column chromatography (ethyl acetate) to afford fragment **3-7** (2.1 mg). These fragments were then subjected to derivatization as described above. Ozonolysis of **3-13** was employed in a similar manner to afford four fragments, **3-7**, **3-14**, **3-15**, and **3-16**. These fragments were then subjected to derivatization as described above.

Table 4-3-1. Oligonucleotides used for construction of expression plasmids.

Insert	Sequence 5'-3'	Size (kbp)
<i>phiaA-Fr1</i>	F: GGAATTCGAGCTCGGTACCCATGTCGCCTAACGACACCCC	3.5
	R: CCGAGTTCCTAAAGATGGGCCCCAAGCGTGTGGCTCTCTC	
<i>phiaA-Fr2</i>	F: GAGAGAGCCACACGCTTCGGGCCCATCTTTAGGAACTCGG	4.3
	R: ACGAGCTACTACAGATCCCCCTAAGAGGCCTCCTGCTTCT	
<i>phiaB</i>	F: GGAATTCGAGCTCGGTACCCATGCCCCACATTCTCACCAT	1.0
	R: TTCATCATCGGGTACGACCCCTAAATCTCAATCACAAGCT	
<i>phiaC</i>	F: CAGCTCGTCAAACCCATGTCGCCGGCATCCATCAC	3.2
	R: GGCTATCCTGTTACCTTAAGCCCTCAGCTGGGGTTGCTCTTCA	
<i>phiaD</i>	F: CTTGAGCAGACATCACCCCATGCCAACTGCTCTGGTAC	1.3
	R: ACGAGCTACTACAGATCCCCTCACGTCATGGCGGAGGGGT	
<i>phomA-Fr1</i>	F: GCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCATGGCGCAGGAACCGCGCAT	4.3
	R: GGACCAGTTGTCCGGCACGGTGGCGGAGGG	
<i>phomA-Fr2</i>	F: CCCTCCGCCACCGTGCCCGACAACCTGGTCC	2.4
	R: GGCTTCAGAGTCACATTCAAGGGCCGCAGGGC	
<i>phomA-Fr3</i>	F: GCCCTGCGGCCCTTGAATGTGACTCTGAAGCC	1.4
	R: CCTTCACGAGCTACTACAGATCCCCTCACTCTGCCTTTCTTTGTGATAA	
<i>phomB</i>	F: TCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCCTTAAGATGCCTTTTACCCTTACACT	1.0
	R: CATCGGGTACGACCCCTTAAGCTAGATTTTCGATAACCAGTTTTCC	
<i>phomC</i>	F: CAGCTCGTCAAACCCGCTAGCATGAAACCCAACCTACCCACCCACT	3.2
	R: GAGCTACTACAGATCCCCGCTAGCTTAGTTGTGGGGTTGACGGAGCCAC	
<i>phiaA-Fr1</i>	F: GGAATTCGAGCTCGGTACCCATGTCGCCTAACGACACCCC	3.5
	R: CCGAGTTCCTAAAGATGGGCCCCAAGCGTGTGGCTCTCTC	
<i>phiaA-Fr2</i>	F: GAGAGAGCCACACGCTTCGGGCCCATCTTTAGGAACTCGG	4.3
	R: ACGAGCTACTACAGATCCCCCTAAGAGGCCTCCTGCTTCT	
<i>phiaB</i>	F: GGAATTCGAGCTCGGTACCCATGCCCCACATTCTCACCAT	1.0

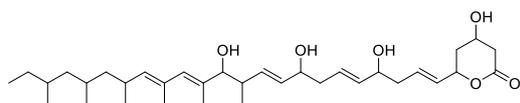
	R: TTCATCATCGGGTACGACCCCTAAATCTCAATCACAAGCT	
<i>phiaC</i>	F: CAGCTCGTCAAACCCATGTCGCCGGCATCCATCAC	3.2
	R: GGCTATCCTGTTACCTTAAGCCCTCAGCTGGGGTTGCTCTTCA	
<i>ACRS2-Fr1</i>	F: GCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCATGGAAAAGGATACTCCAGTCGCTA	4.0
	R: TGACTCCCATTCCGCAATGGGAGTAACTGGTCATCGGAACCTCTCCCAA	
<i>ACRS2-Fr2</i>	F: TTGGGAGAGTTCCGATGACCAGTTTACTCCATTGCGGAATGGGAGTCA	4.0
	R: CCTTCACGAGCTACTACAGATCCCCTTACCCTGCCTTCTCTGGGCTAGA	
<i>phiaC-AAxxxDG</i>	F: TTGGTCGTTAGTGCCGCTGCTGCCGTCACAGATTAT	3.2
	R: ATAATCTGTGACGGCAGCAGCGGCACTAACGACCAA	
<i>phiaC-HAxxxDG</i>	F: TTGGTCGTTAGTGCCCACGCTGCCGTCACAGATTAT	3.2
	R: ATAATCTGTGACGGCAGCGTGGGCACTAACGACCAA	
<i>phiaC-AHxxxDG</i>	F: TTGGTCGTTAGTGCCGCTCACGCCGTCACAGATTAT	3.2
	R: ATAATCTGTGACGGCGTGAGCGGCACTAACGACCAA	

Table 4-3-2. ^1H -, ^{13}C -NMR spectra of **3-4**, **3-5** and **3-1** [18]

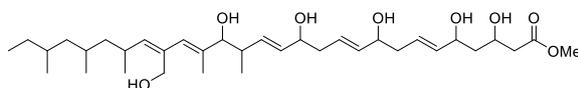


3-4 (methanol- d_4)			3-5 (methanol- d_4)			3-1 (methanol- d_4)		
	δ_{C}	δ_{H} (multiplicity, J in Hz)		δ_{C}	δ_{H} (multiplicity, J in Hz)		δ_{C}	δ_{H} (multiplicity, J in Hz)
1	171.9	-	1	171.3	-	1	171.7	-
2	128.9	-	2	129.0	-	2	129.2	-
3	147.6	6.78 (d, 9.8)	3	147.7	6.76 (d, 9.7)	3	147.3	6.65 (dd, 9.8, 1.5)
4	38.0	2.75 (m)	4	38.5	2.8 (m)	4	37.0	2.81 (m)
5	83.9	3.8 (d, 8.6)	5	82.0	4.04 (d, 10.1)	5	87.4	3.78 (d, 9.1)
6	137.1	-	6	134.0	-	6	132.1	-
7	133.6	5.33 (d, 9.3)	7	135.0	5.3 (m)	7	139.2	5.36 (dd, 9.2, 1.0)
8	37.0	2.65 (m)	8	38.0	2.75 (m)	8	35.4	2.75 (m)
9	84.3	3.7 (d, 6.7)	9	84.2	3.81 (d, 8.8)	9	88.3	3.73 (d, 9.7)
10	137.4	-	10	134.0	-	10	132.4	-
11	134.0	5.33 (d, 9.3)	11	135.0	5.30 (m)	11	139.1	5.26 (dd, 9.7, 1.0)
12	36.7	2.65 (m)	12	37.0	2.65 (m)	12	35.4	2.75 (m)
13	84.1	3.20 (m)	13	84.5	3.72 (d, 8.6)	13	90.4	3.75 (d, 9.7)
14	137.7	-	14	134.0	-	14	133.1	-
15	132.9	5.38 (d, 9.7)	15	138.0	5.30 (m)	15	136.6	5.46 (dd, 9.9, 1.0)
16	36.6	2.65 (m)	16	37.0	2.65 (m)	16	36.6	2.70 (m)
17	79.4	3.20 (m)	17	84.5	3.67 (d, 5.7)	17	79.4	3.24 (t, 5.3)
18	38.3	1.52 (m)	18	123.0	-	18	39.4	1.44 (m)
19	27.8	1.28 (m), 1.48 (m)	19	134.0	5.30 (m)	19	27.3	1.46 (m), 1.18 (m)
20	12	0.95 (t, 7.8)	20	12.0	1.70 (d, 7.2)	20	11.9	0.92 (t, 7.6)
2-Me	12.8	1.85 (s)	2-Me	12.8	1.90 (s)	2-Me	12.9	1.86 (d, 1.5)
4-Me	16.8	0.85 (d, 6.6)	4-Me	14.5	0.86 (m)	4-Me	16.8	0.87 (d, 7.1)
6-Me	11.2	1.68 (s)	6-Me	11.5	1.66 (s)	6-Me	10.8	1.63 (d, 1.0)
8-Me	17.8	0.82 (m)	8-Me	17.5	0.81 (m)	8-Me	17.8	0.81 (d, 6.9)
10-Me	11.4	1.68 (s)	10-Me	11.5	1.62 (s)	10-Me	11.0	1.60 (d, 1.0)
12-Me	17.7	0.8 (m)	12-Me	17.5	0.81 (m)	12-Me	17.4	0.78 (d, 7.2)
14-Me	11.6	1.68 (s)	14-Me	13.5	1.65 (s)	14-Me	10.8	1.62 (d, 1.0)
16-Me	18	0.95 (d, 7.8)	16-Me	14.5	0.92 (d, 7.0)	16-Me	18.3	0.98 (d, 7.1)
18-Me	13.5	0.95 (d, 7.8)	18-Me	12.0	1.70 (s)	18-Me	14.5	0.95 (d, 6.7)

Table 4-3-3. ¹H, ¹³C-NMR spectra of **3-13** and phomenoic acid methyl ester [19]



prophenolactone (**3-13**)



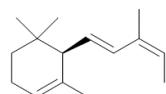
phomenoic acid methyl ester

3-13 (methanol-d₄)		
	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)
1	173.8	-
2	43.3	2.43 (dd, 15.1, 8.2), 2.51 (dd, 15.1, 5.4)
3	67.4	4.10 (m)
4	44.9	1.60 (m), 1.71 (m)
5	71.7	4.21 (q, 7.0)
6	136.3	5.48 (m)
7	129.1	5.65 (m)
8	41.5	2.25 (m)
9	73.6	4.05 (m)
10	136.3	5.52 (m)
11	128.7	5.65 (m)
12	41.3	2.25 (m)
13	73.3	4.05 (m)
14	134.1	5.52 (m)
15	135.9	5.63 (m)
16	41.5	2.32 (m)
17	83.7	3.65 (d, 8.7)
18	136.6	-
19	132.9	5.80 (s)
20	132.0	-
21	137.7	5.0 (d, 9.6)
22	31.3	2.58 (m)
23	46.7	0.95 (m), 1.20 (m)
24	29.4	1.50 (m)
25	46.5	1.02 (m), 1.28 (m)
26	32.8	1.41 (m)
27	30.5	1.08 (m), 1.32 (m)
28	11.6	0.85 (m)
16-Me	17.8	0.87 (m)
18-Me	13.0	1.72 (s)
20-Me	17.4	1.72 (s)
22-Me	22.3	0.93 (d, 6.5)
24-Me	20.7	0.85 (m)
26-Me	20.1	0.82 (d, 6.6)

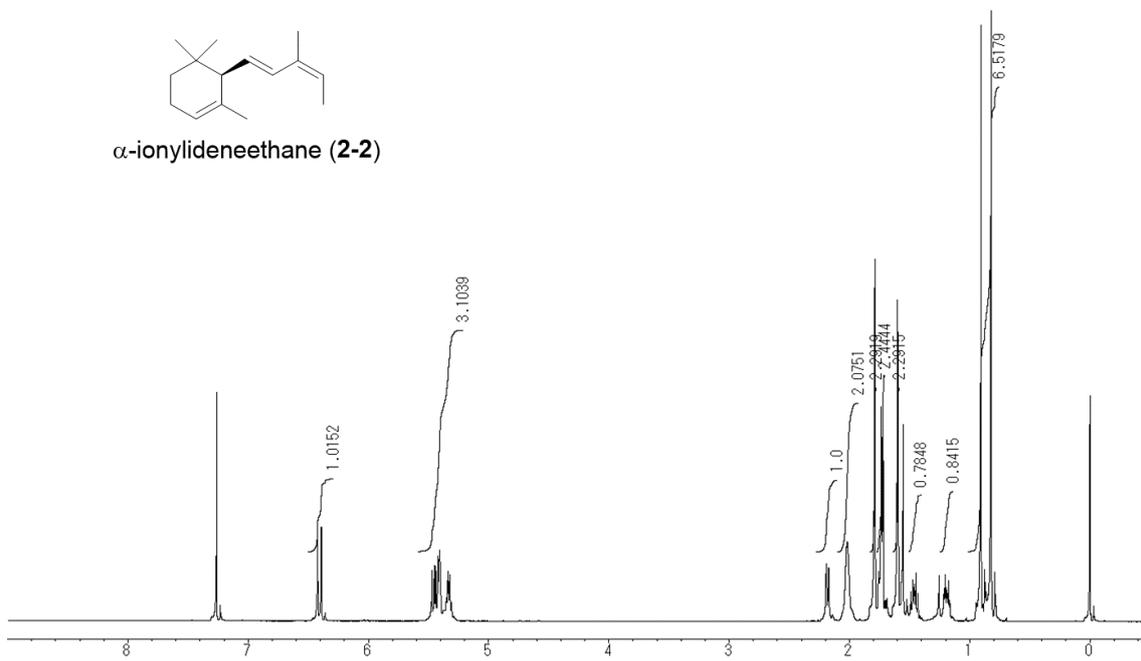
phomenoic acid methyl ester (CDCl₃)		
	δ_c	δ_H (multiplicity, J in Hz)#
1	172.9	-
2	42.0	2.56 (d, 14.5), 2.40 (dd, 14.5, 8.0)
3	67.4	4.27 (m)
4	42.6	1.58 (ddd, 14.0, 8.5, 4.5), 1.78 (ddd, 14.5, 8.5, 4.5)
5	72.4	4.05-4.15 (m)
6	136.1	5.43*
7	129.8	5.56 (dt, 15.5, 7.0)
8	40.5	2.20 (m)
9	72.8	4.05-4.15 (m)
10	135.5	5.45*
11	129.4	5.50 (dt, 15.5, 7.0)
12	40.1	2.20 (m)
13	72.4	4.05-4.15 (m)
14	134.3	5.42 (dd, 15.5, 7.0)
15	136.0	5.70 (dd, 15.5, 6.0)
16	40.9	2.31 (ddq, 7.0, 6.0, 6.5)
17	82.7	3.69 (d, 7.0)
18	139.4	-
19	129.6	5.84 (s)
20	133.9	-
21	137.9	5.06 (d, 10.0)
22	30.1	2.62 (m)
23	45.2	0.77-0.88 (m)
24	28.3	0.77-0.88 (m)
25	45.5	0.77-0.88 (m)
26	31.6	0.77-0.88 (m)
27	29.4	0.77-0.88 (m)
28	11.3	0.77-0.88 (m)
16-Me	20.1	coalescence
18-Me	11.9	1.68 (s)
20-CH ₂ OH	60.5	4.09 (d, 11.0), 4.22 (d, 11.0)
22-Me	22.5	0.77-0.88 (m)
24-Me	19.8	0.77-0.88 (m)
26-Me	17.6	0.77-0.88 (m)

#: ¹H-NMR spectrum of per(dimethyl-t-butylsilyl)phomenoic acid methyl ester

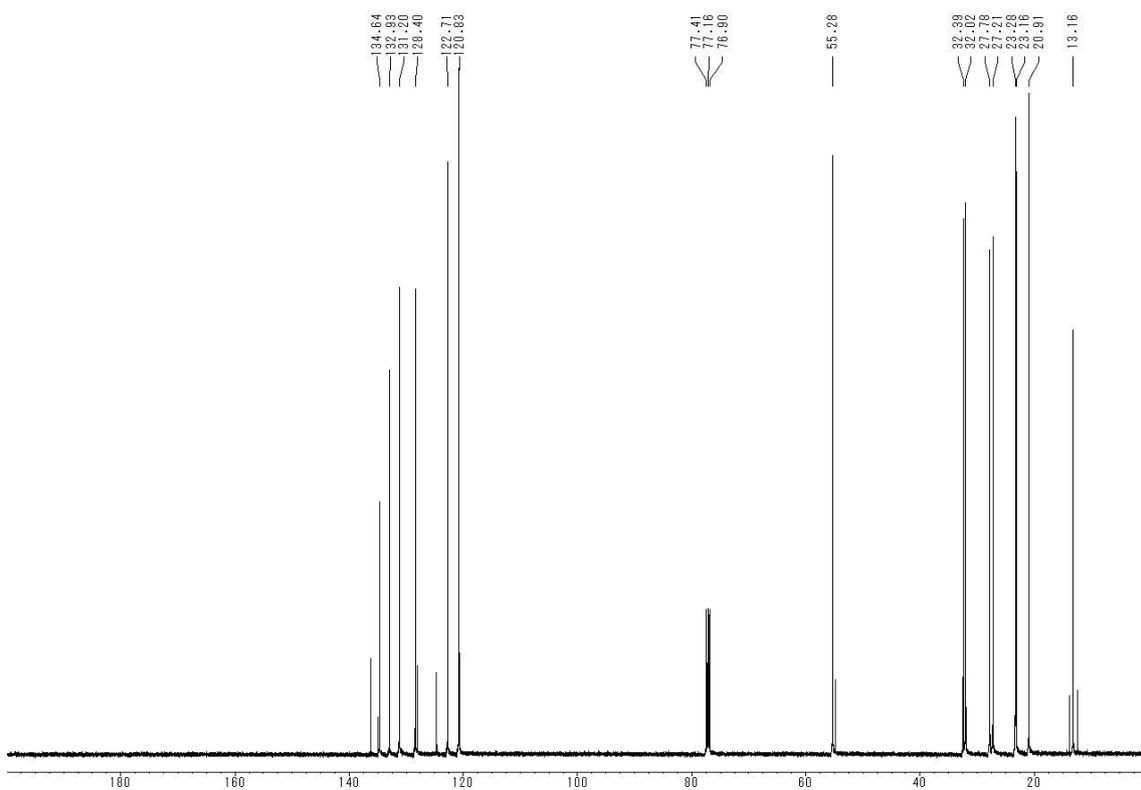
*: exchangeable



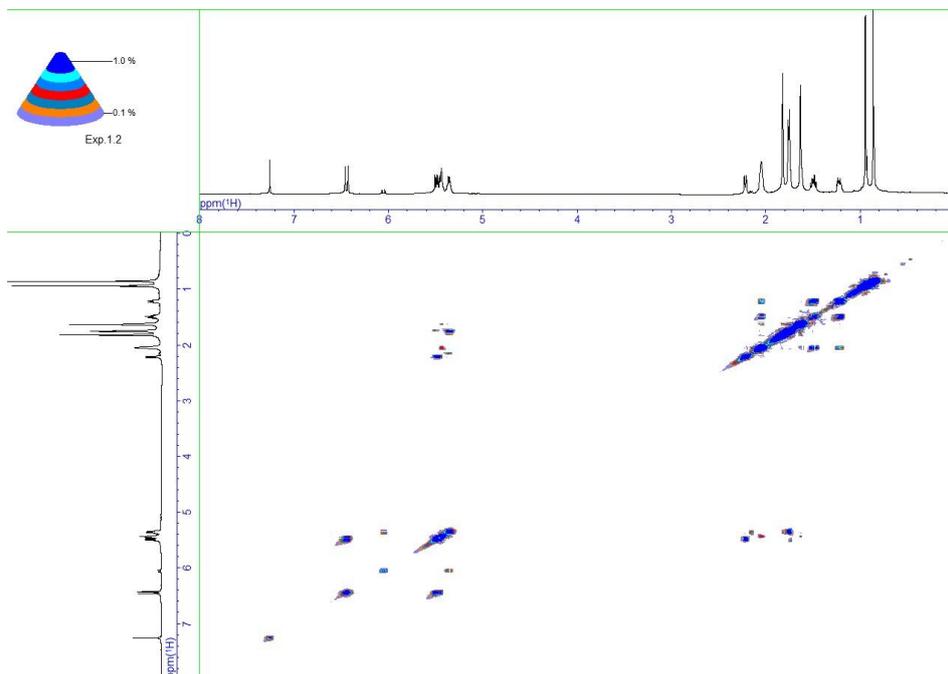
α -ionylideneethane (**2-2**)



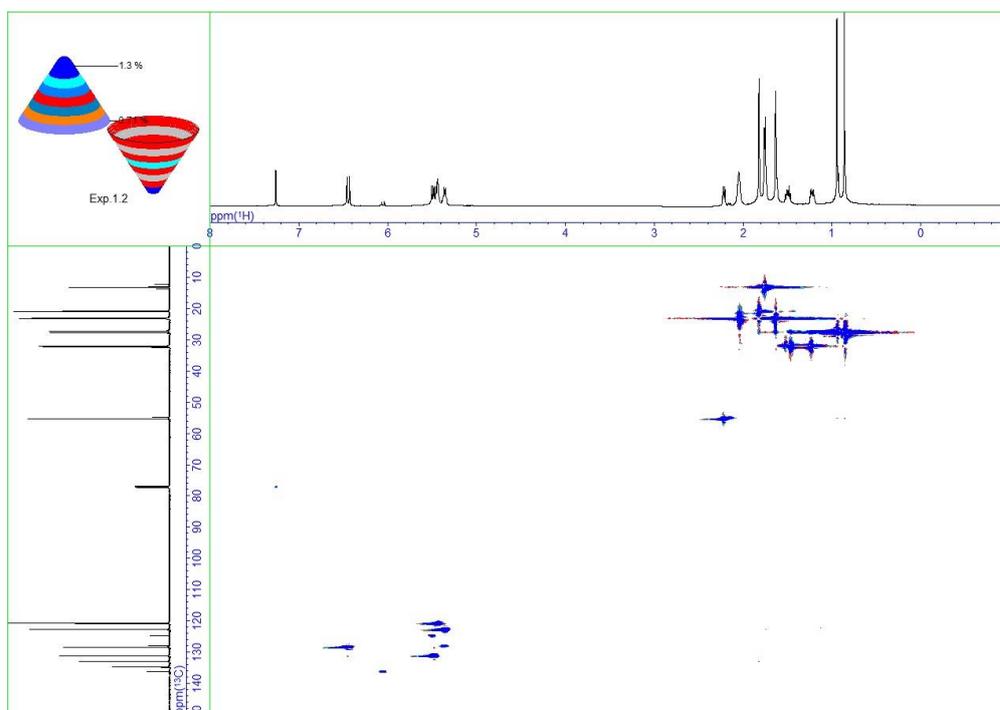
¹H-NMR spectrum of **2-2** (AO-*bcABA3*) (in CDCl₃, 500 MHz)



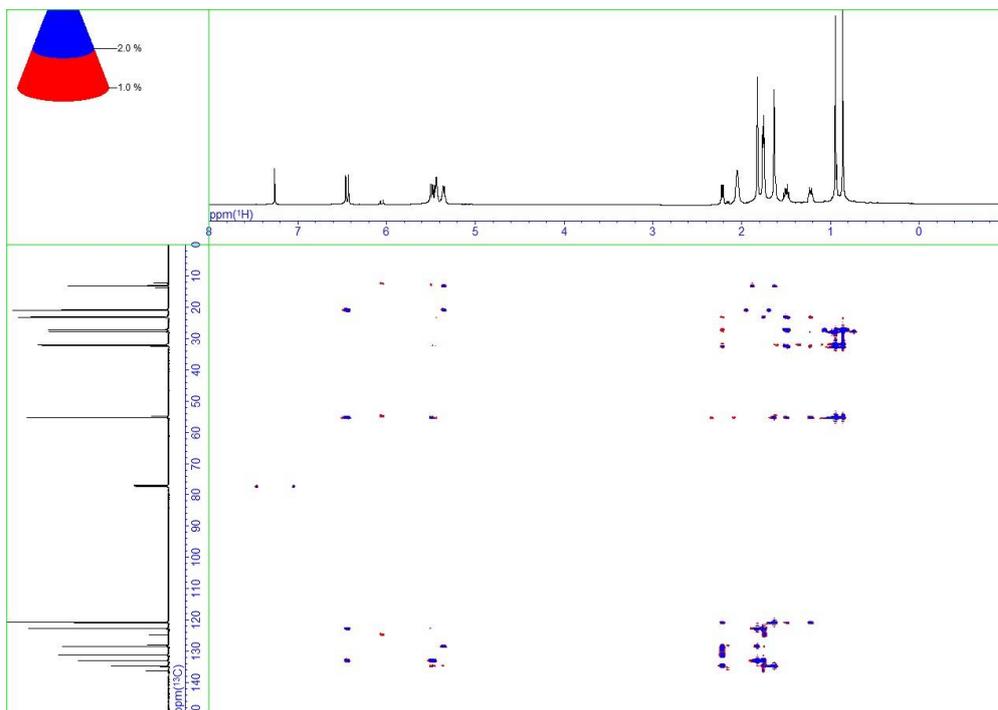
¹³C-NMR spectrum of **2-2** (AO-*bcABA3*) (in CDCl₃, 125 MHz)



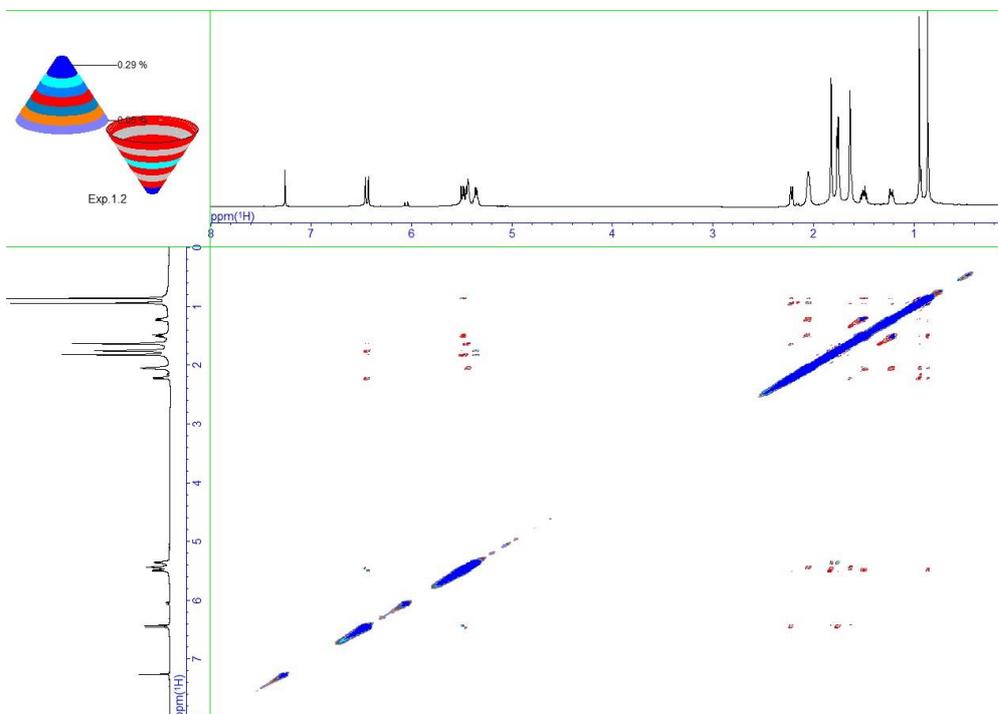
COSY spectrum of **2-2** (AO-*bcABA3*) (in CDCl_3)



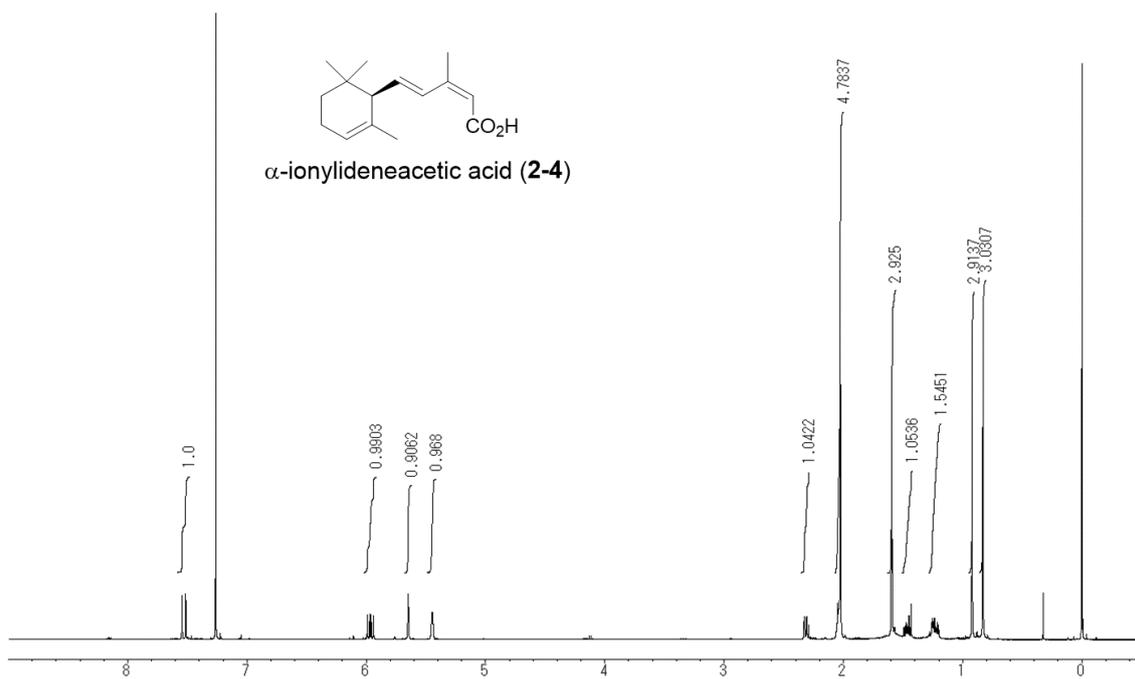
HSQC spectrum of **2-2** (AO-*bcABA3*) (in CDCl_3)



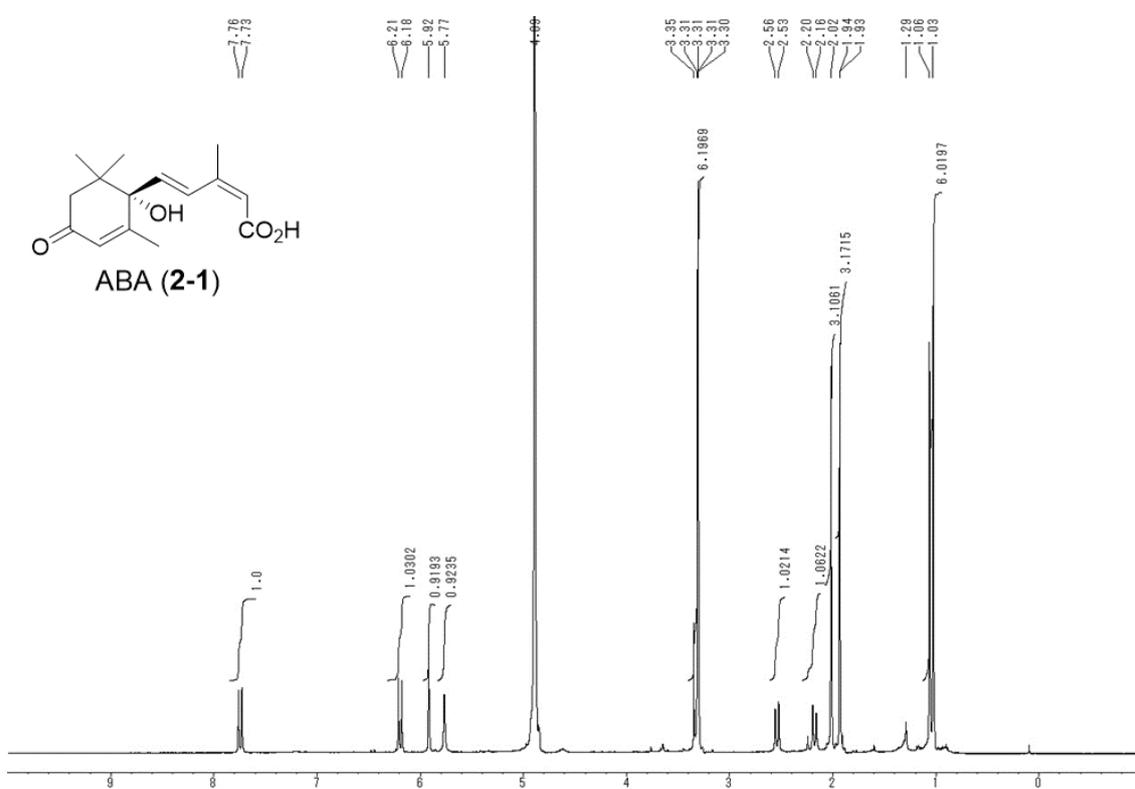
HMBC spectrum of **2-2** (AO-*bcABA3*) (in CDCl₃)



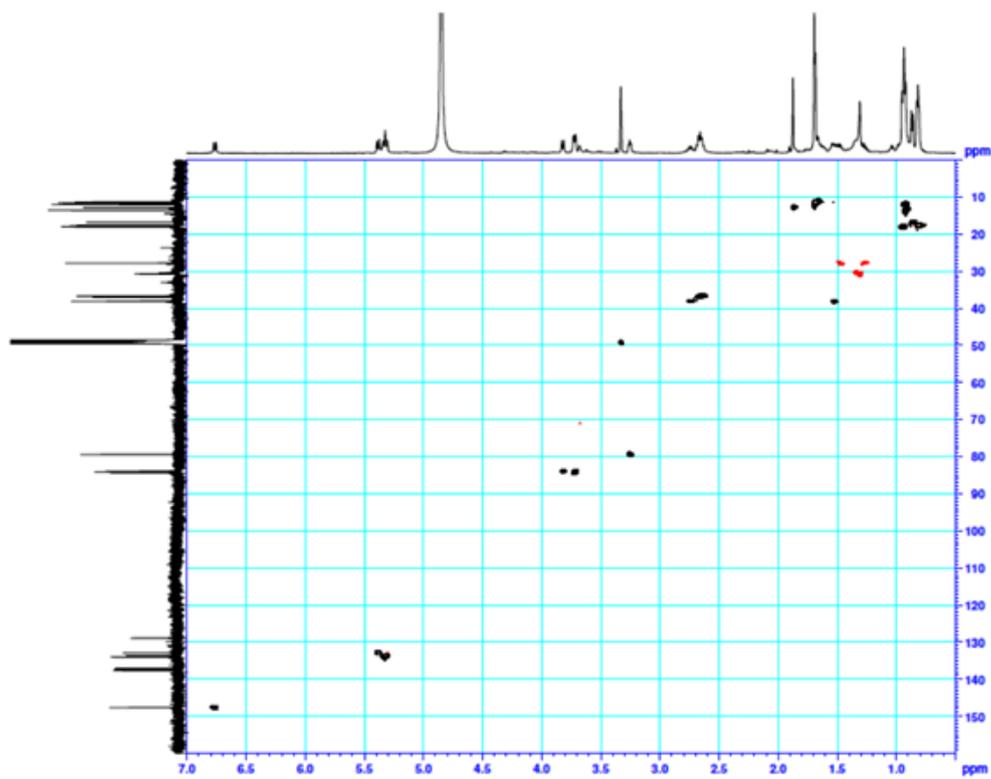
NOE spectrum of **2-2** (AO-*bcABA3*) (in CDCl₃)



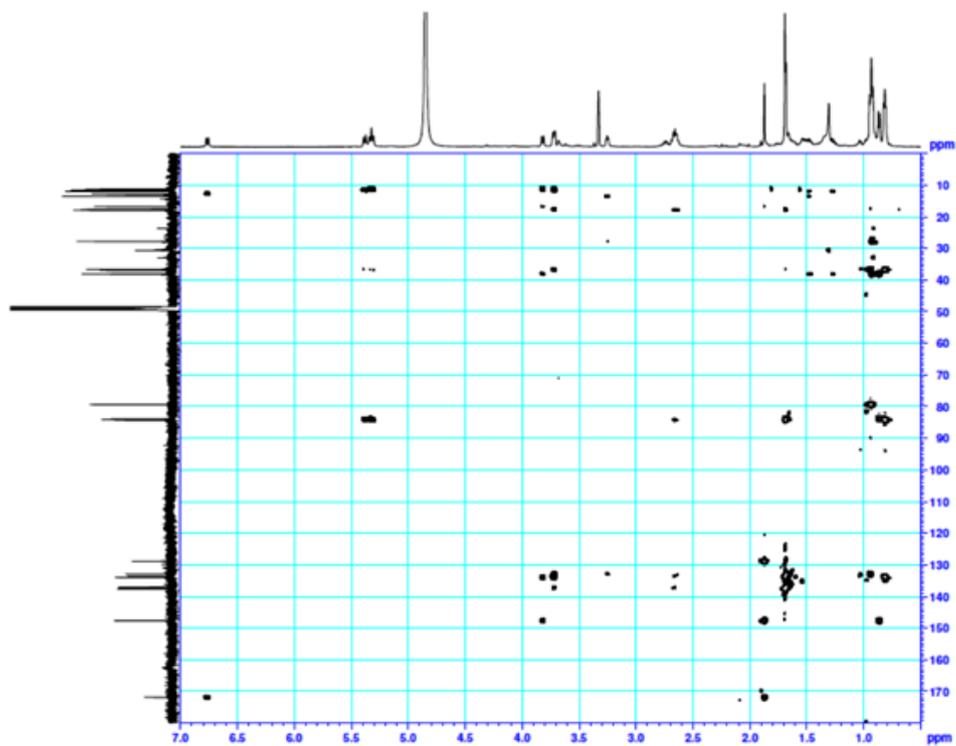
$^1\text{H-NMR}$ spectrum of **2-4** (bioconversion of **2-2** with AO-*bcABA1*) (in CDCl_3 , 500 MHz)



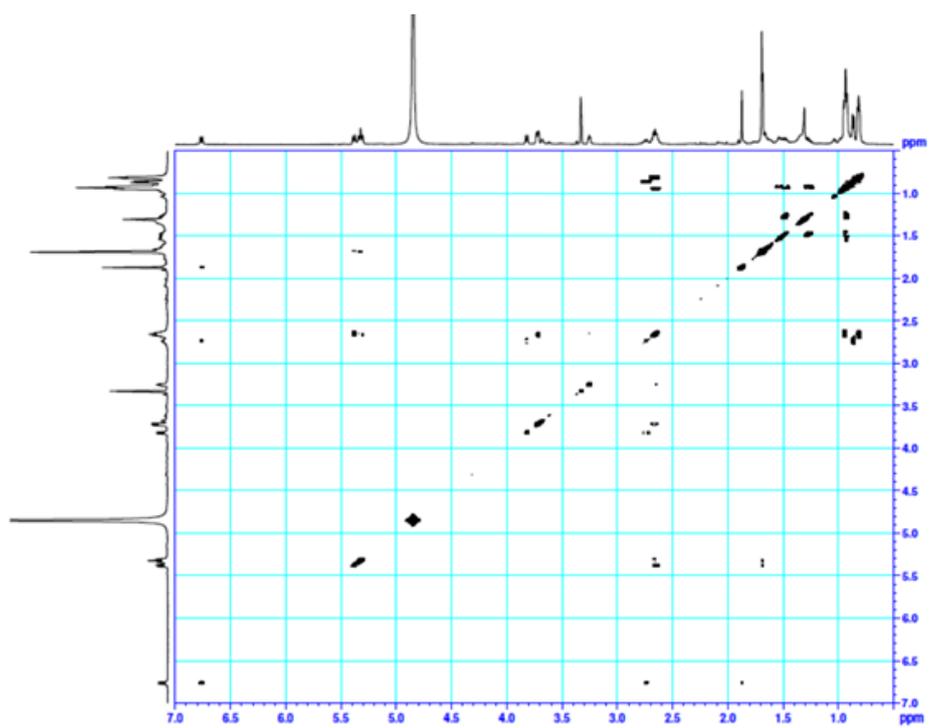
$^1\text{H-NMR}$ spectrum of **2-1** (AO-*bcABA1234*) (in MeOD, 500 MHz)



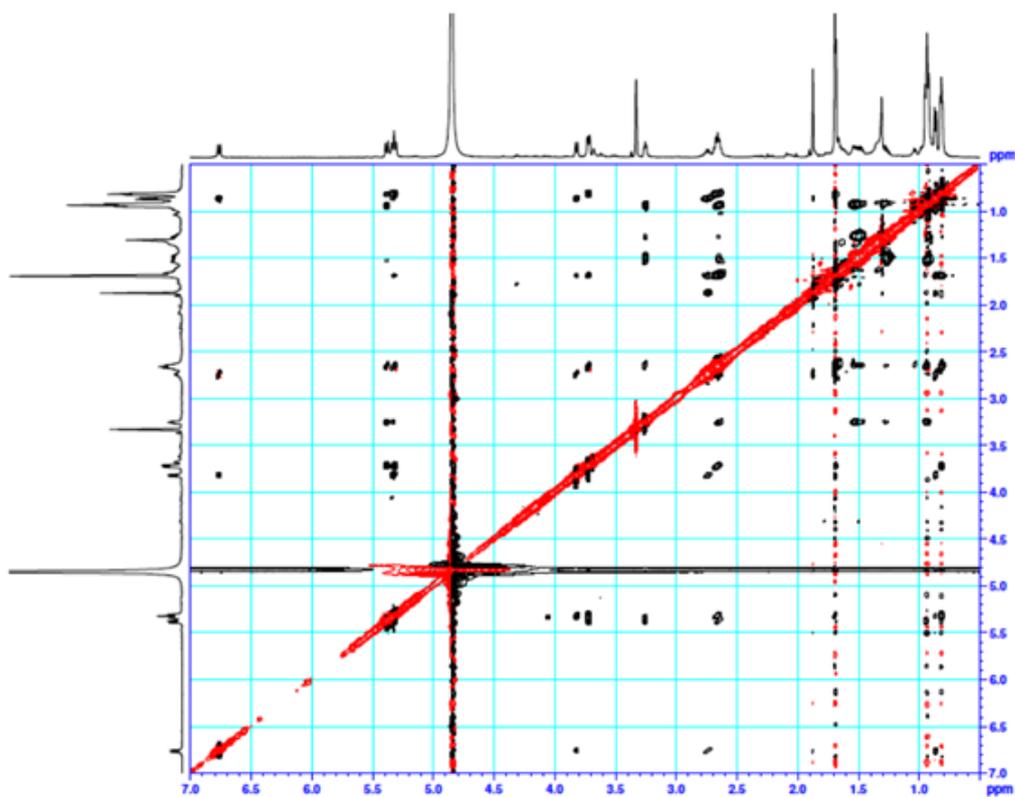
HSQC spectrum of **3-4** (in MeOD)



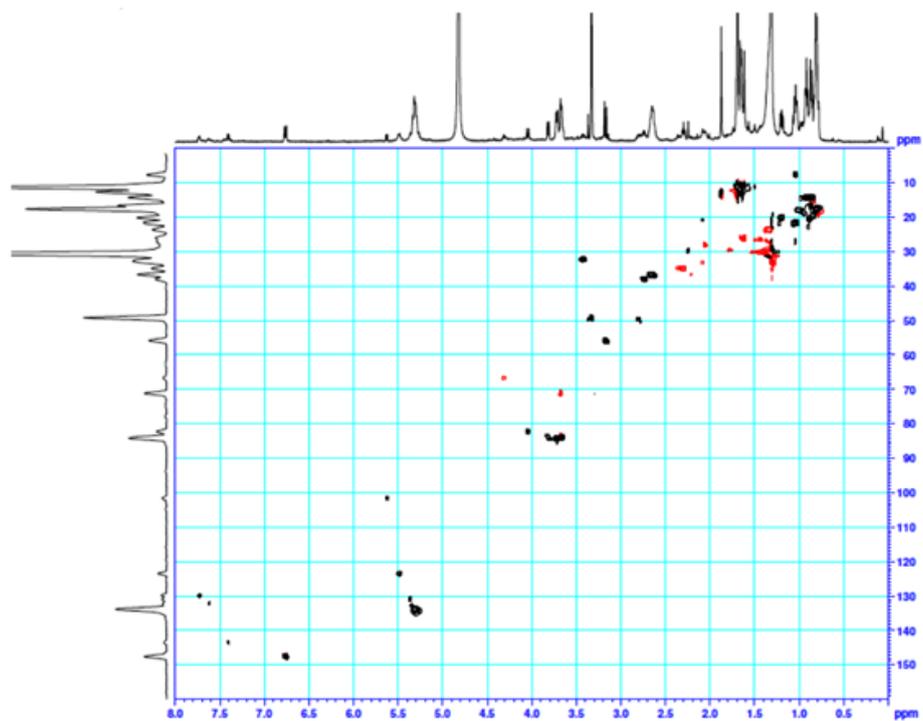
HMBC spectrum of **3-4** (in MeOD)



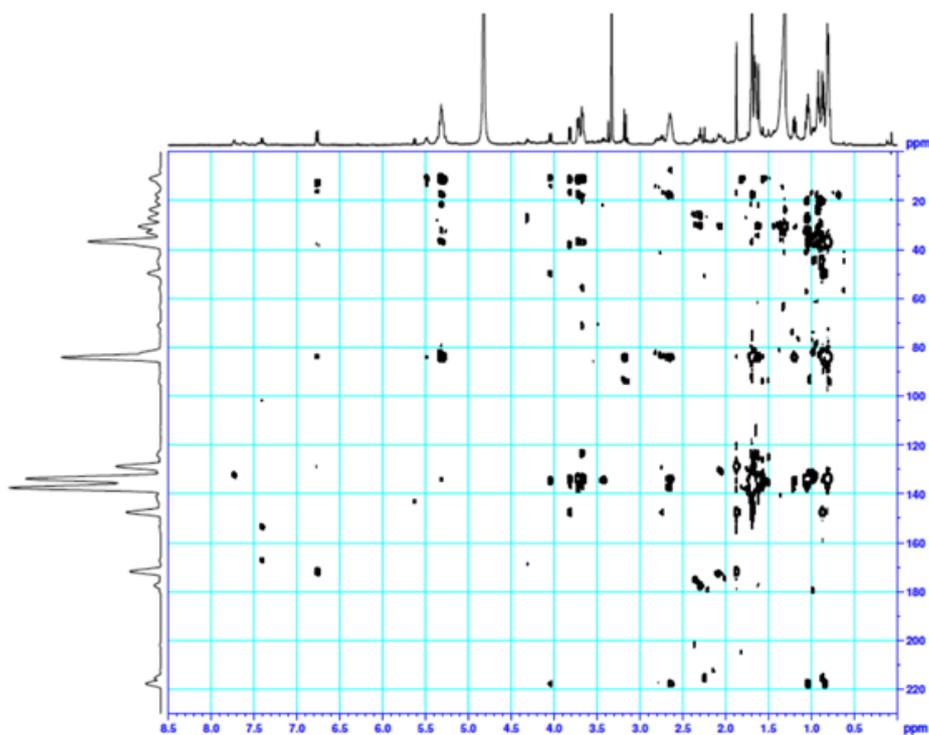
COSY spectrum of **3-4** (in MeOD)



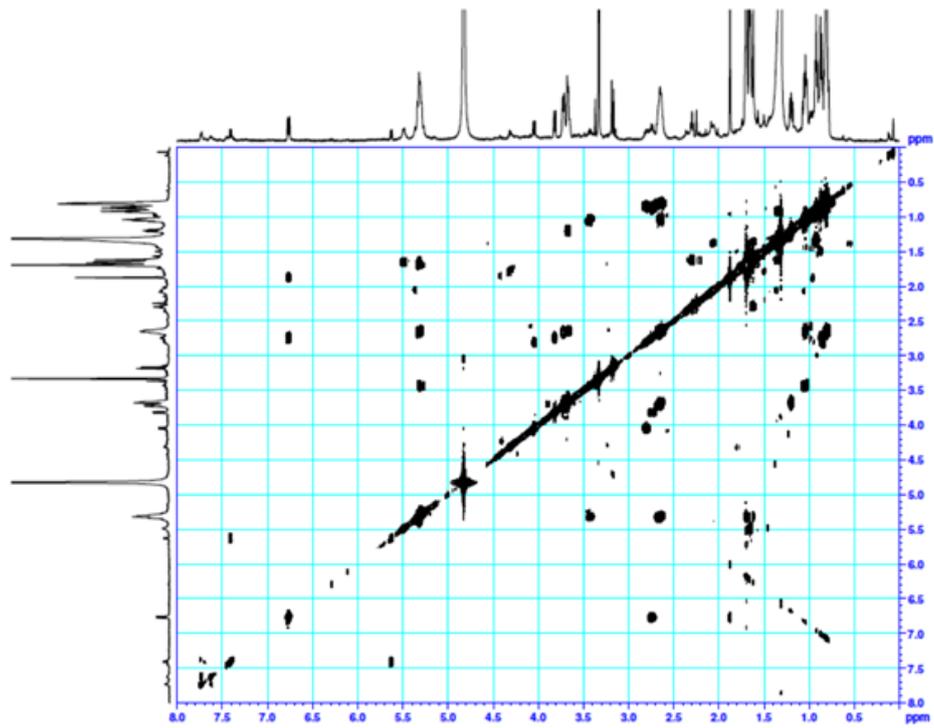
NOE spectrum of **3-4** (in MeOD)



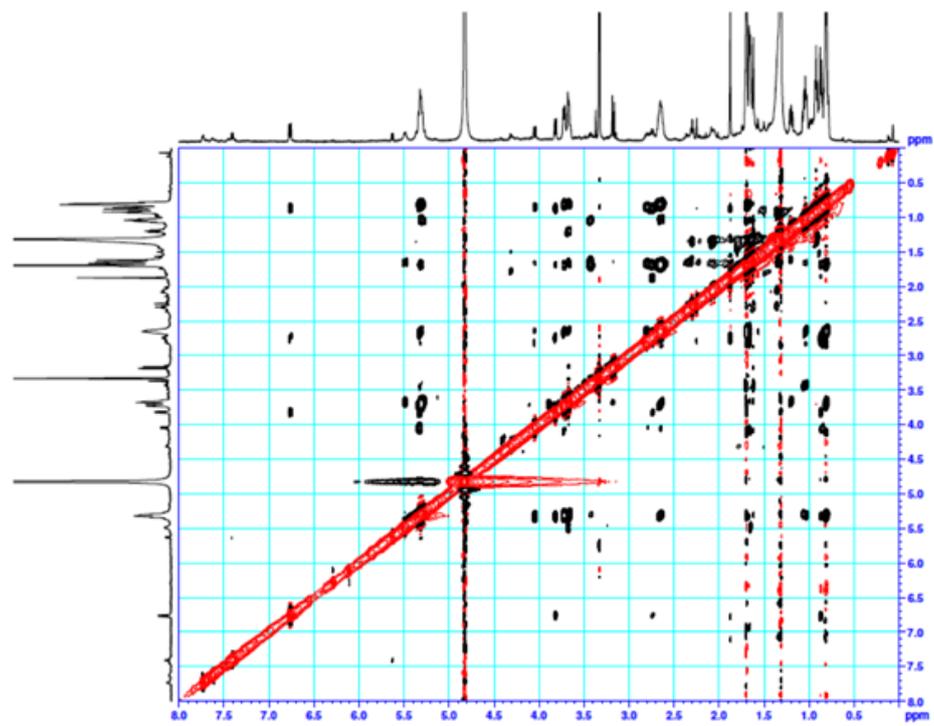
HSQC spectrum of **3-5** (in MeOD)



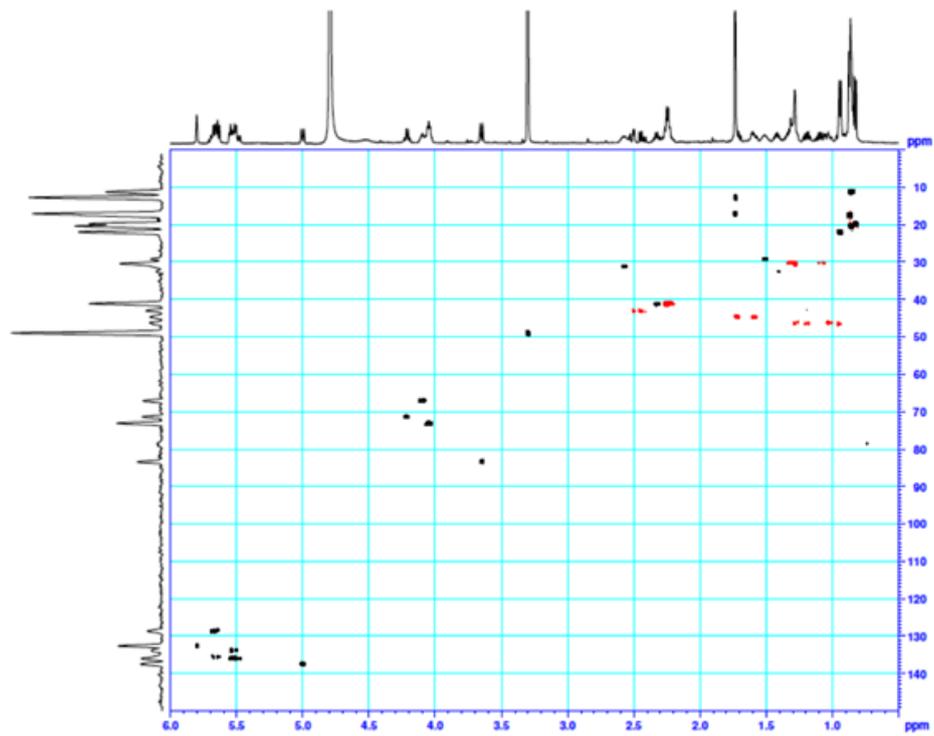
HMBC spectrum of **3-5** (in MeOD)



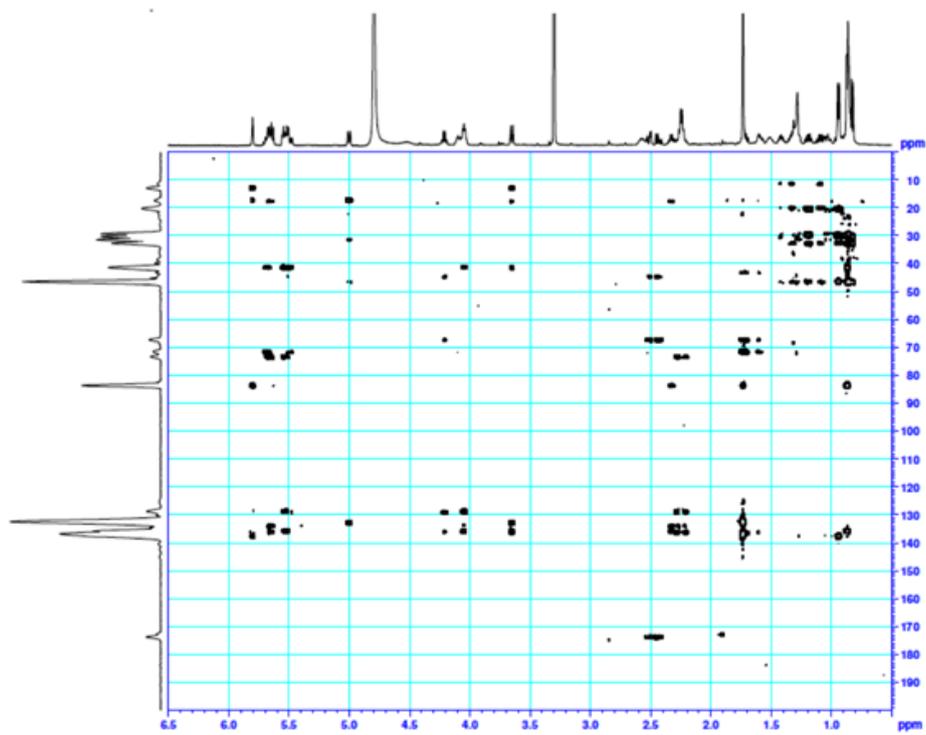
COSY spectrum of **3-5** (in MeOD)



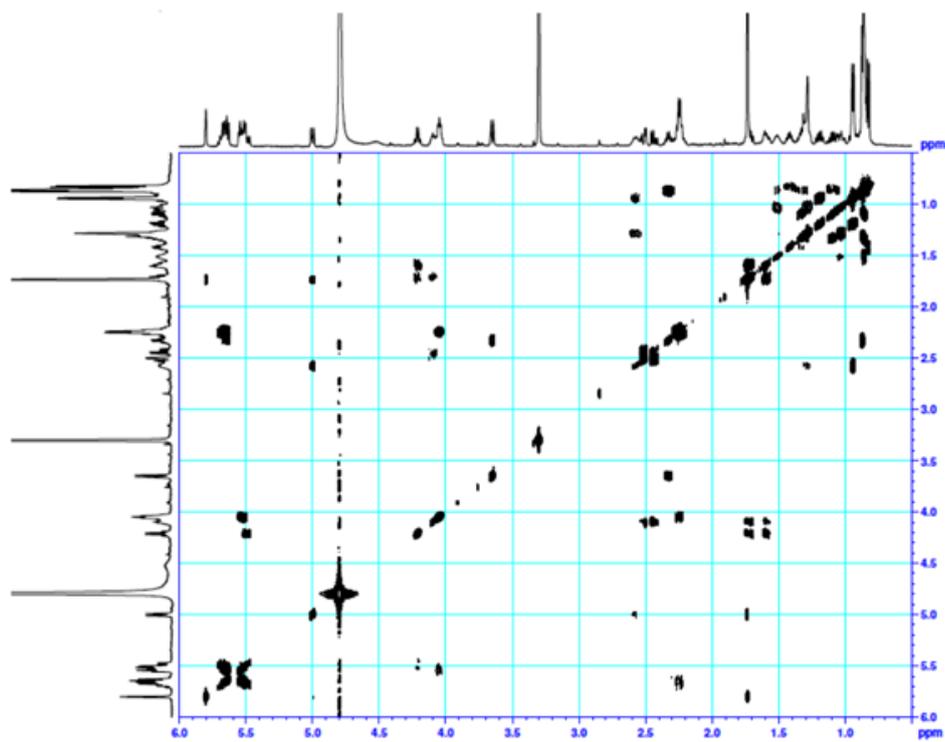
NOE spectrum of **3-5** (in MeOD)



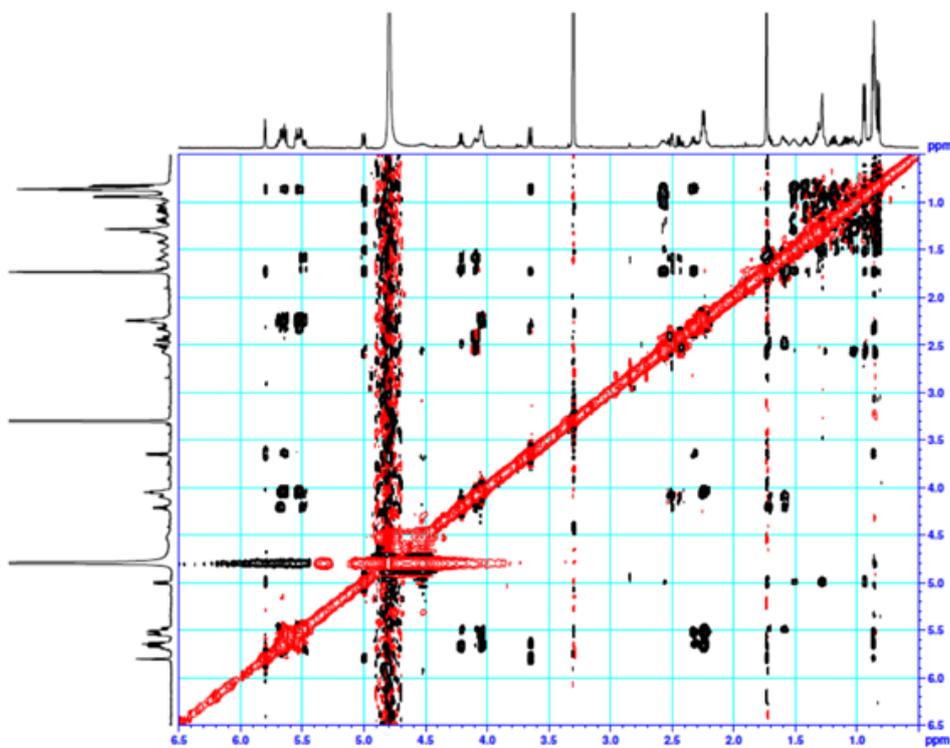
HSQC spectrum of **3-13** (in MeOD)



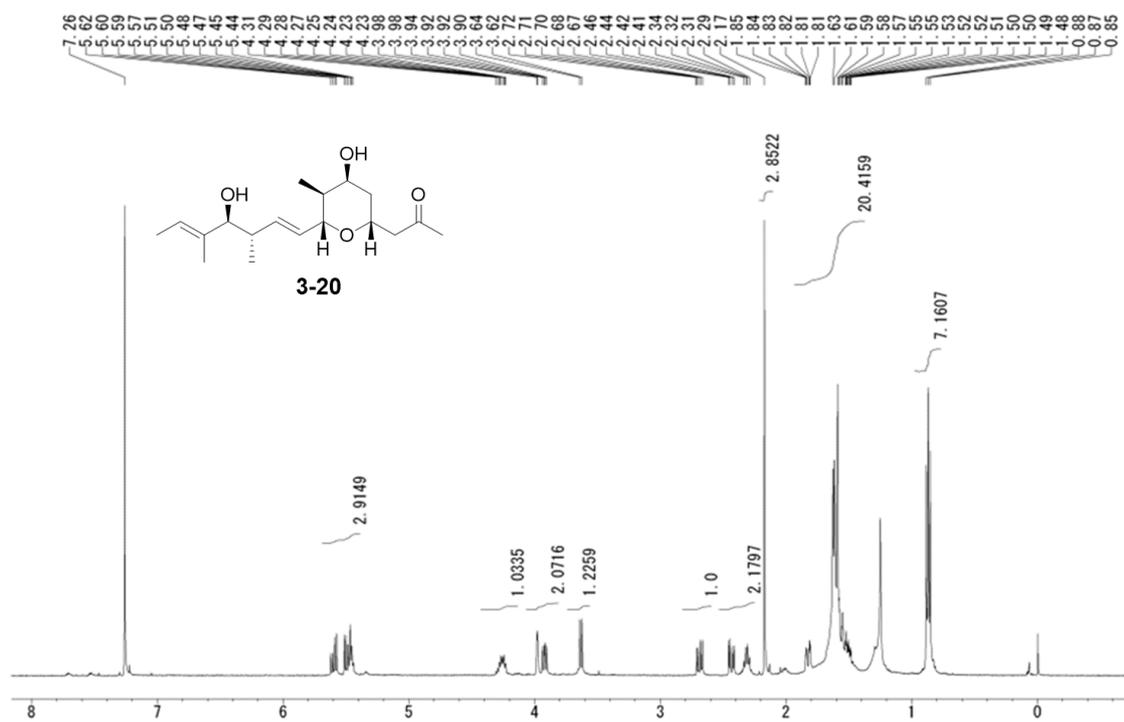
HMBC spectrum of **3-13** (in MeOD)



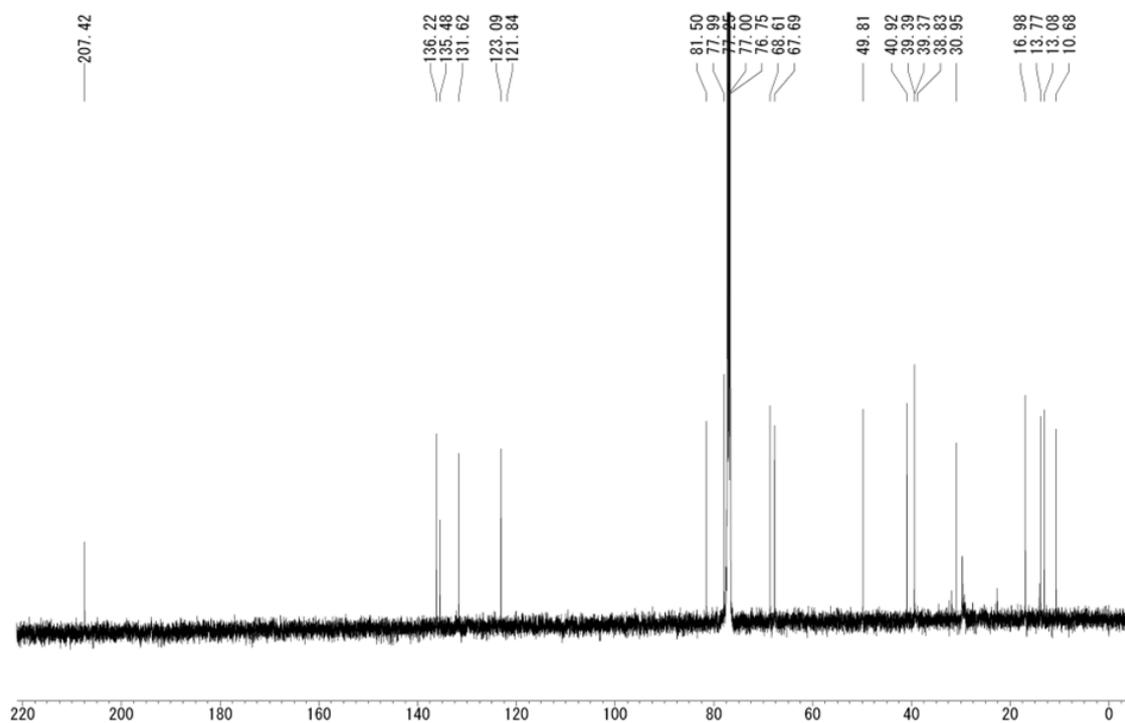
COSY spectrum of **3-13** (in MeOD)



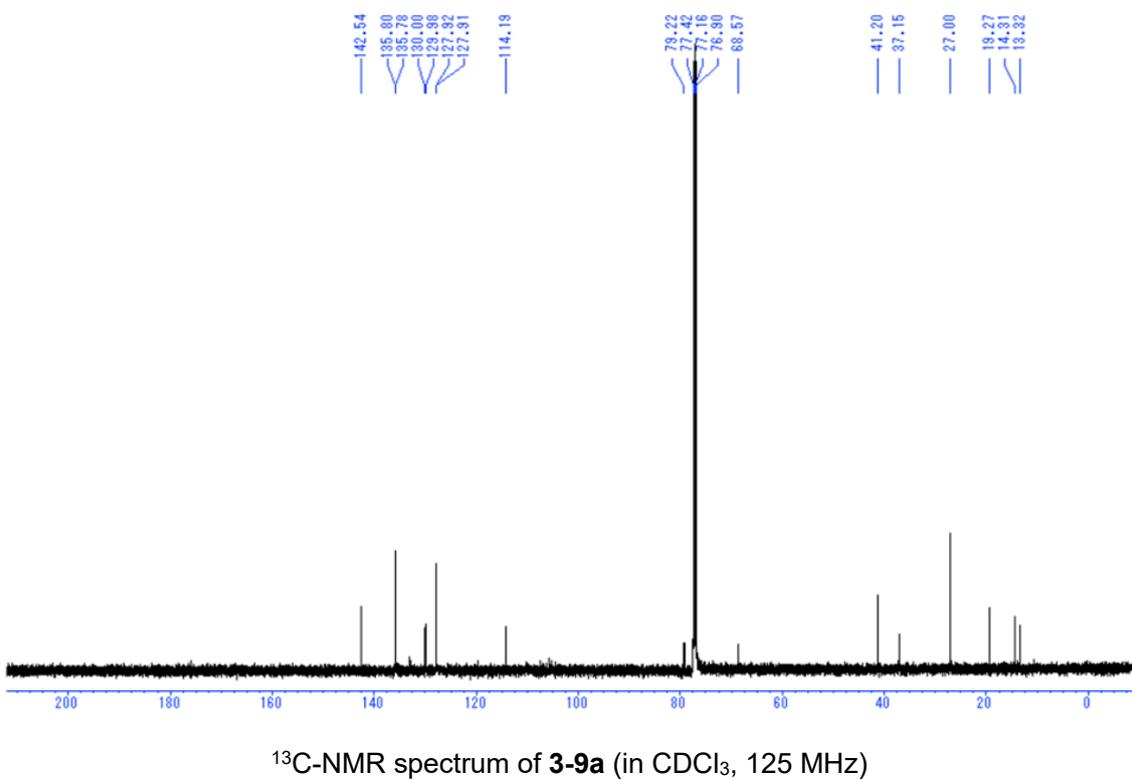
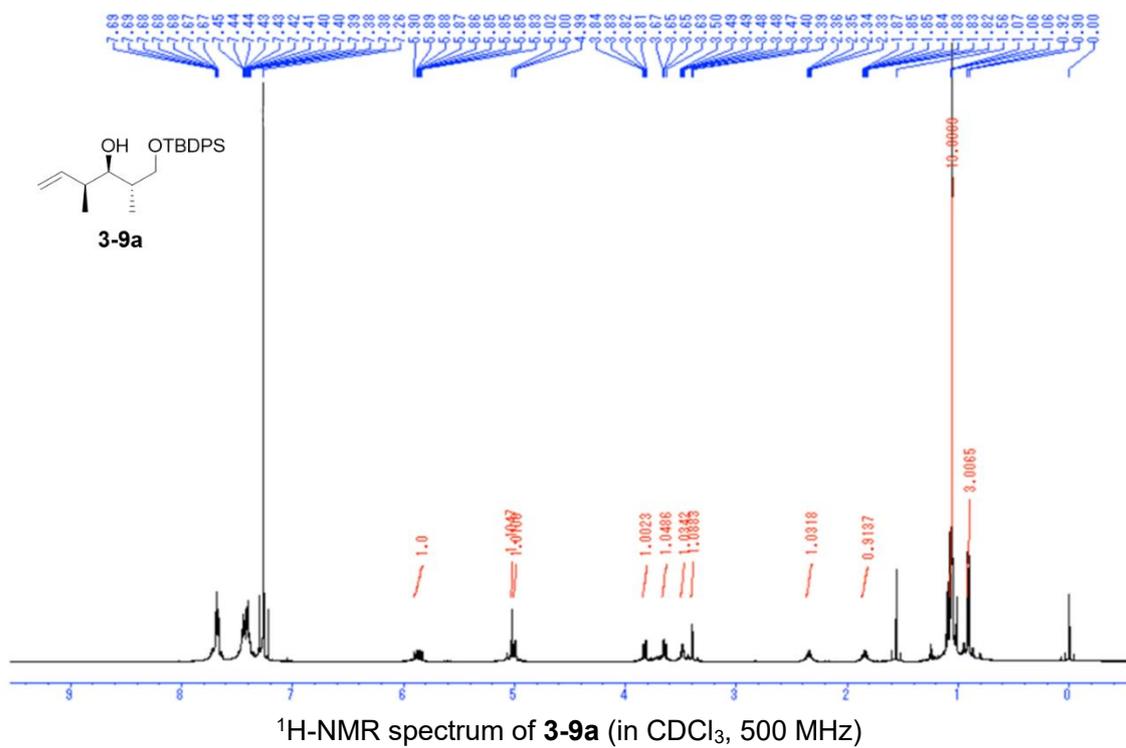
NOE spectrum of **3-13** (in MeOD)

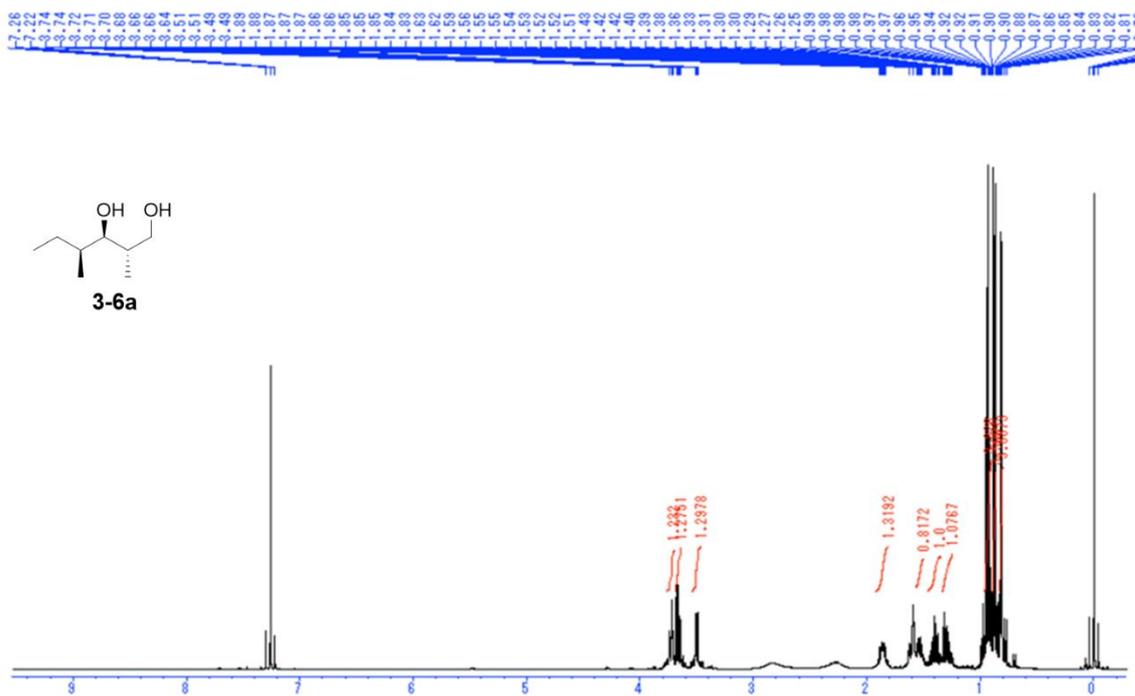


¹H-NMR spectrum of **3-20** (in CDCl₃, 500 MHz)

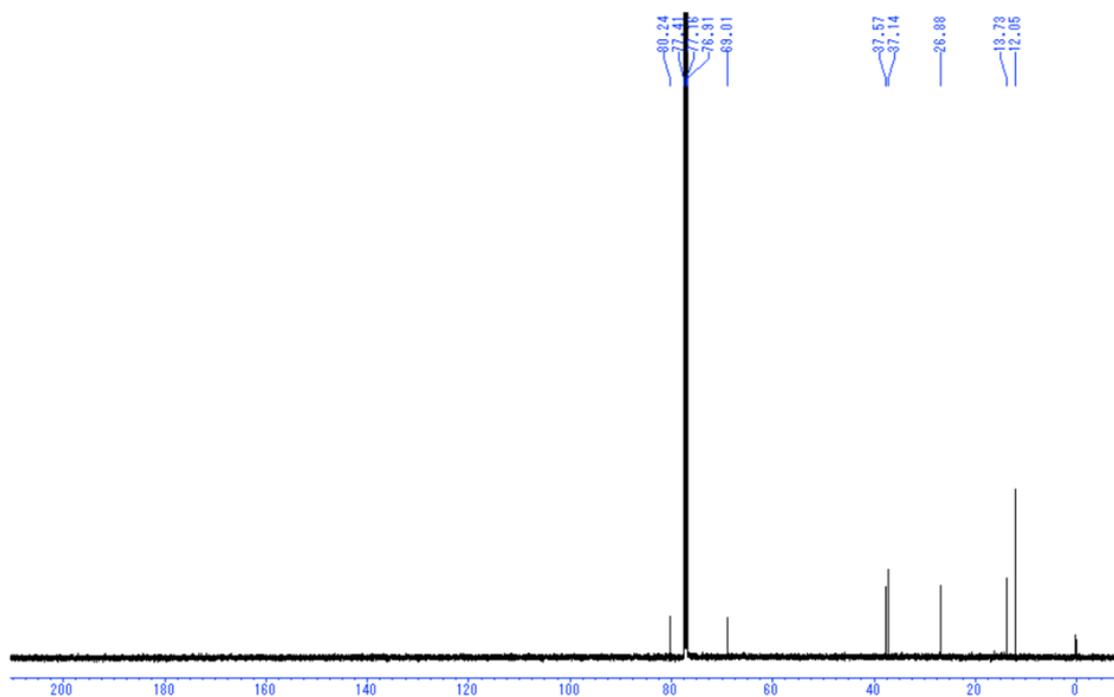


¹³C-NMR spectrum of **3-20** (in CDCl₃, 125 MHz)

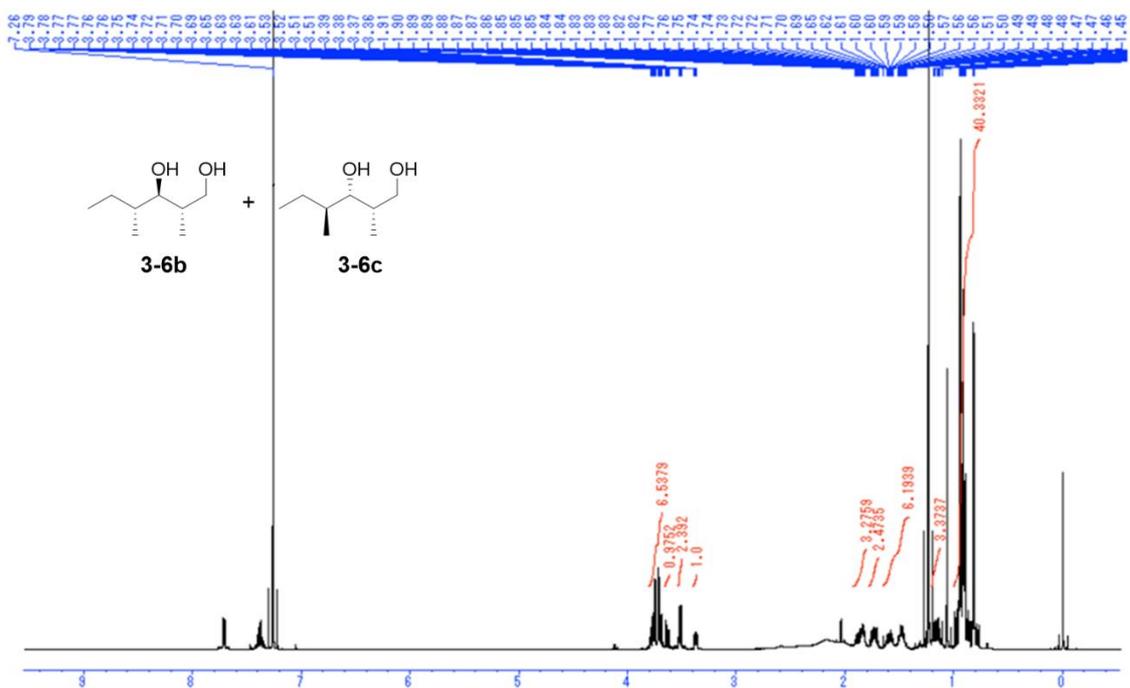




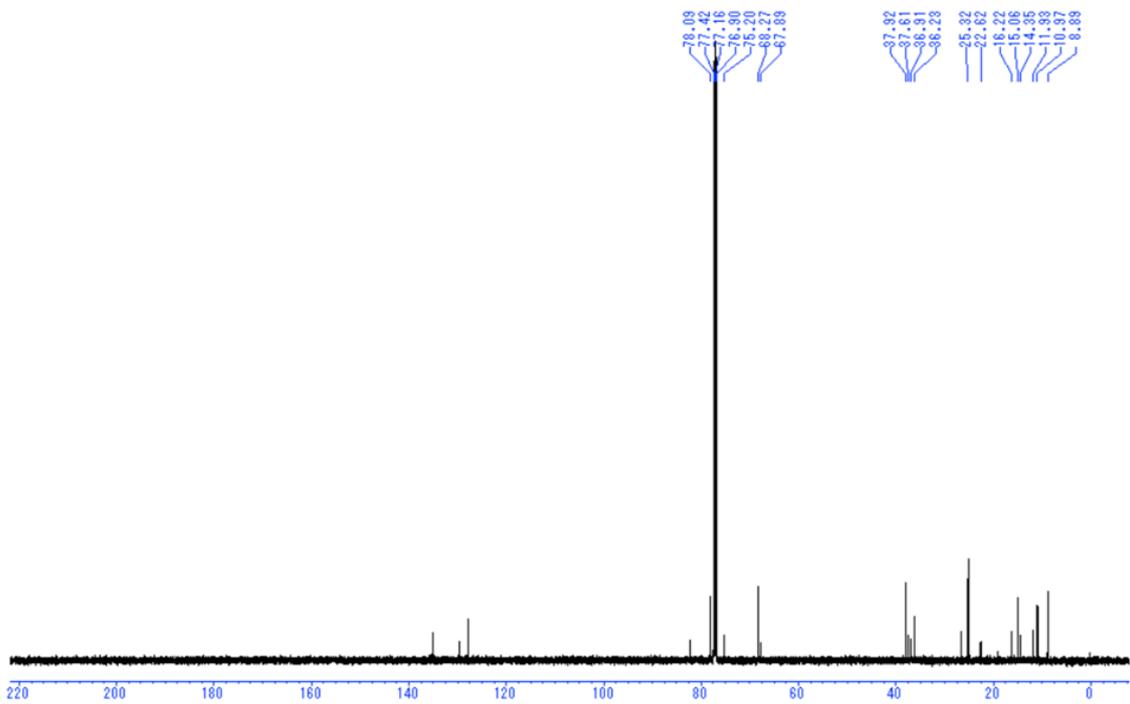
¹H-NMR spectrum of **3-6a** (in CDCl₃, 500 MHz)



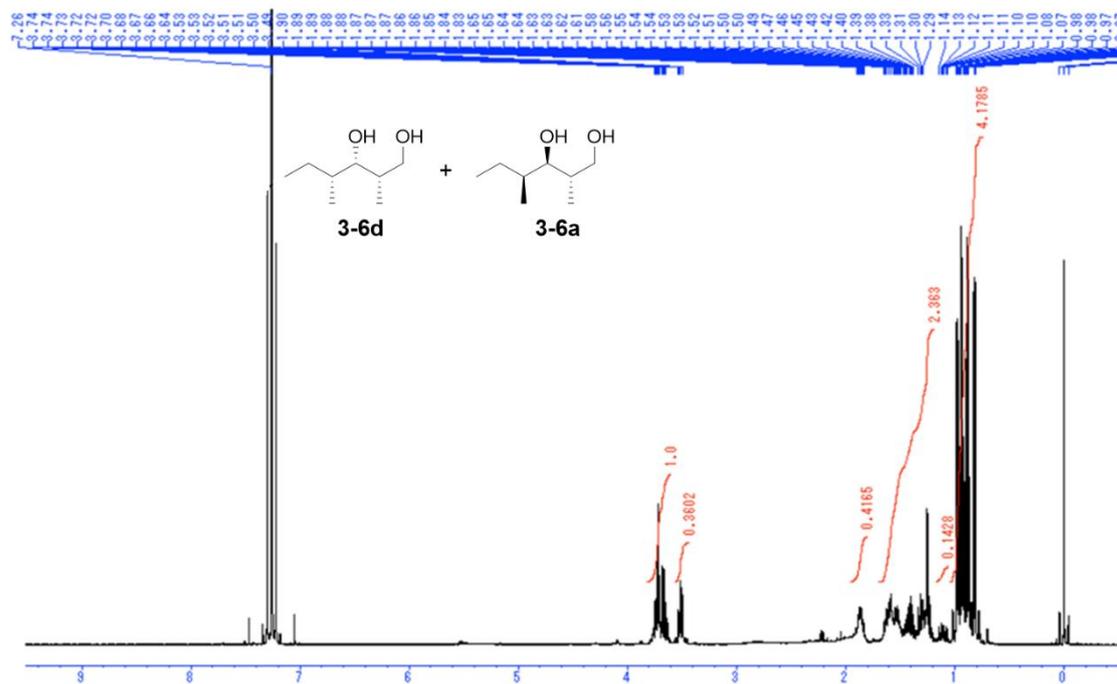
¹³C-NMR spectrum of **3-6a** (in CDCl₃, 125 MHz)



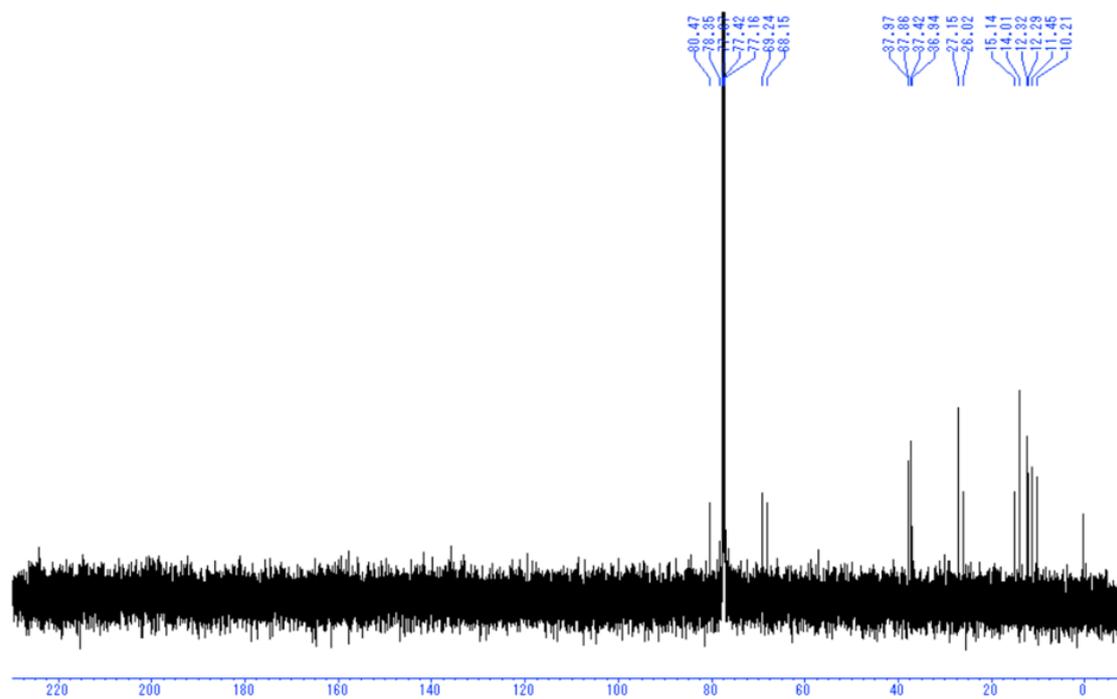
¹H-NMR spectrum of mixture of **3-6b** and **3-6c** (in CDCl₃, 500 MHz)



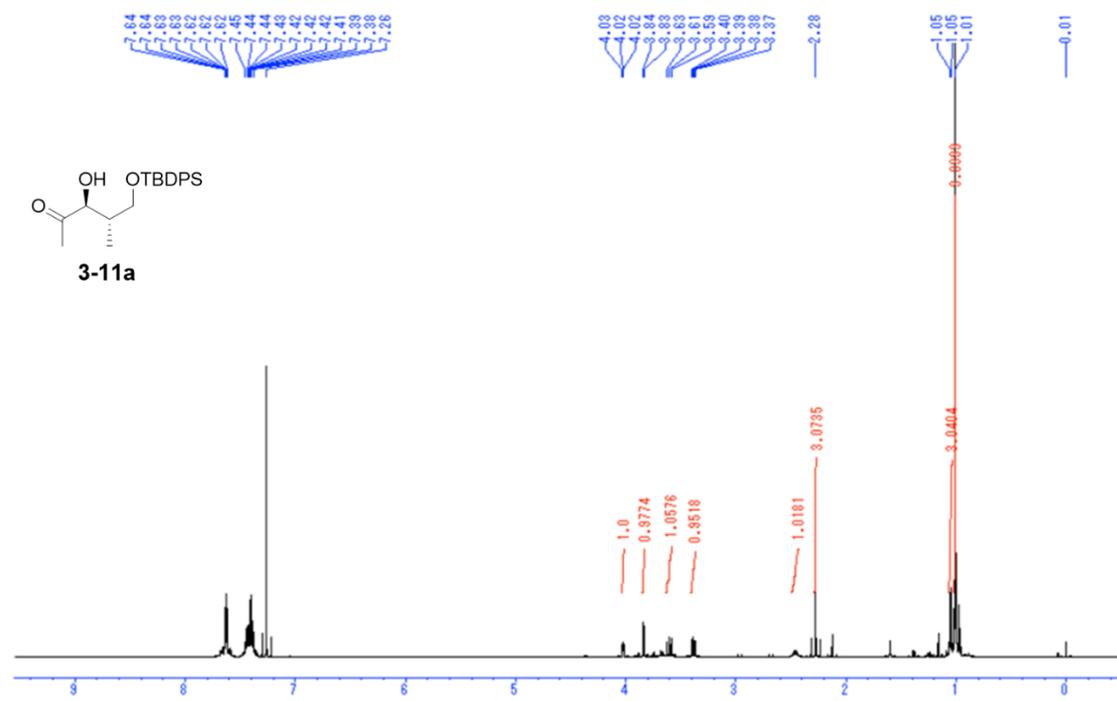
¹³C-NMR spectrum of mixture of **3-6b** and **3-6c** (in CDCl₃, 125 MHz)



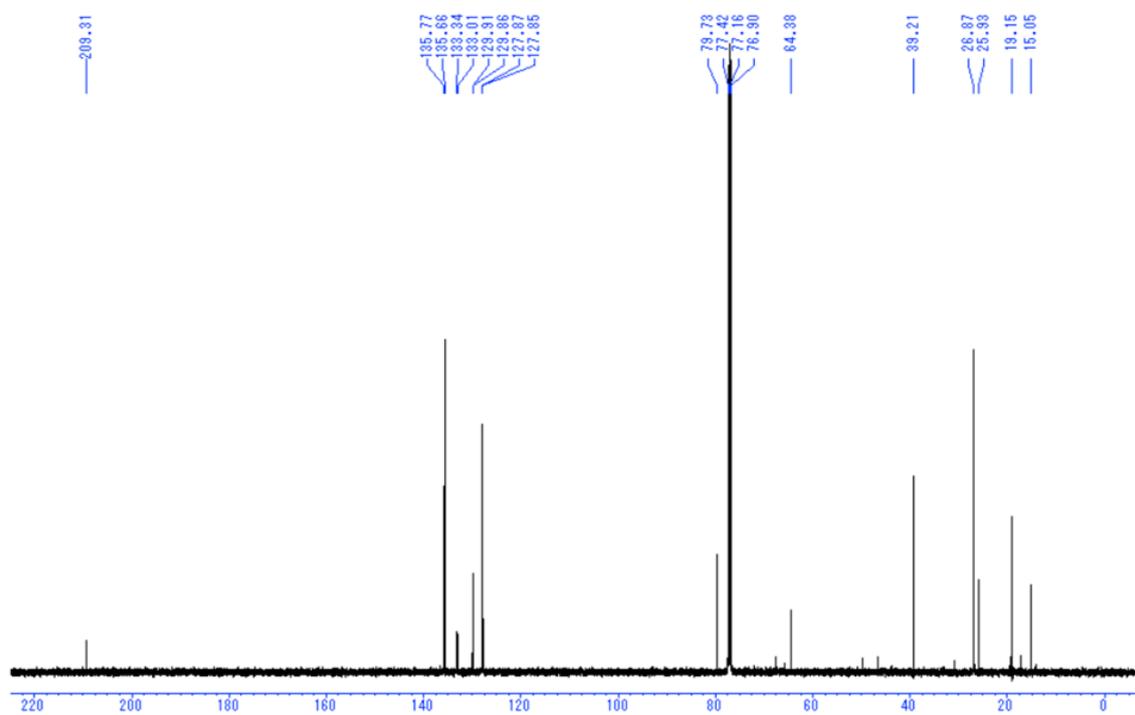
¹H-NMR spectrum of mixture of **3-6a** and **3-6d** (in CDCl₃, 500 MHz)



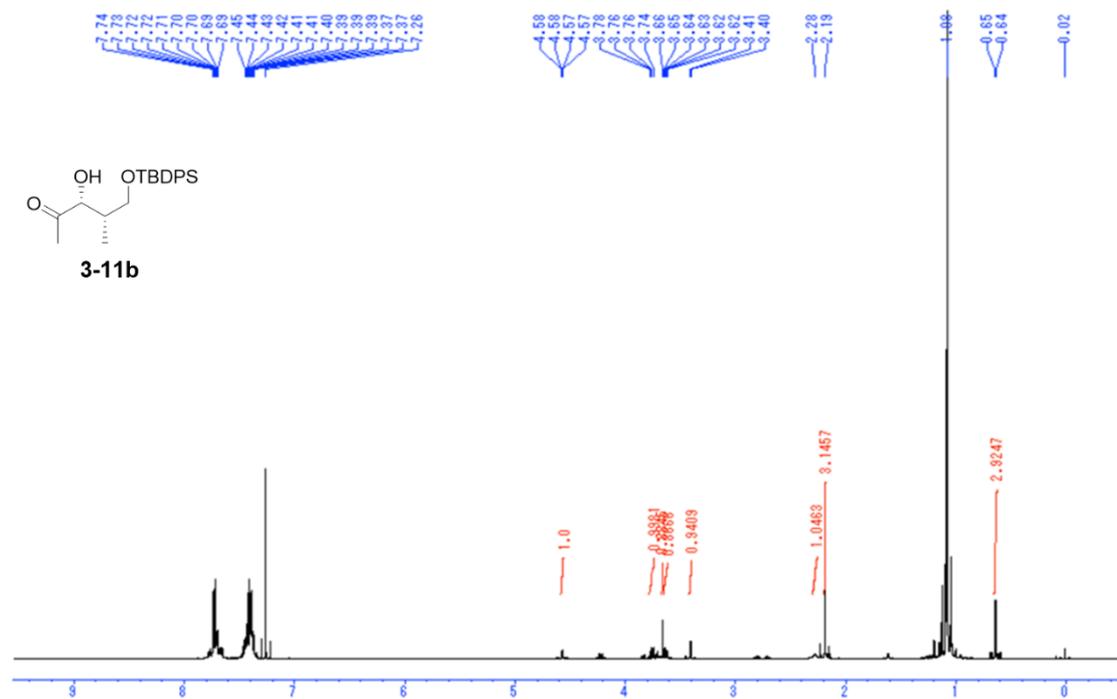
¹³C-NMR spectrum of mixture of **3-6a** and **3-6d** (in CDCl₃, 125 MHz)



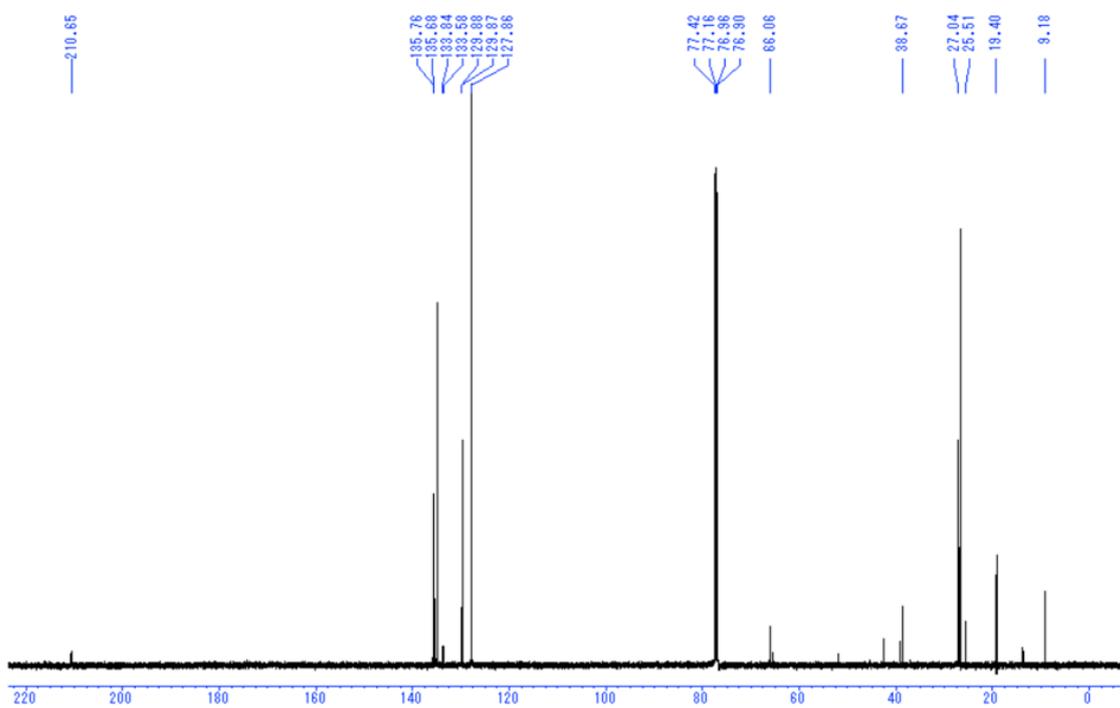
¹H-NMR spectrum of **3-11a** (in CDCl₃, 500 MHz)



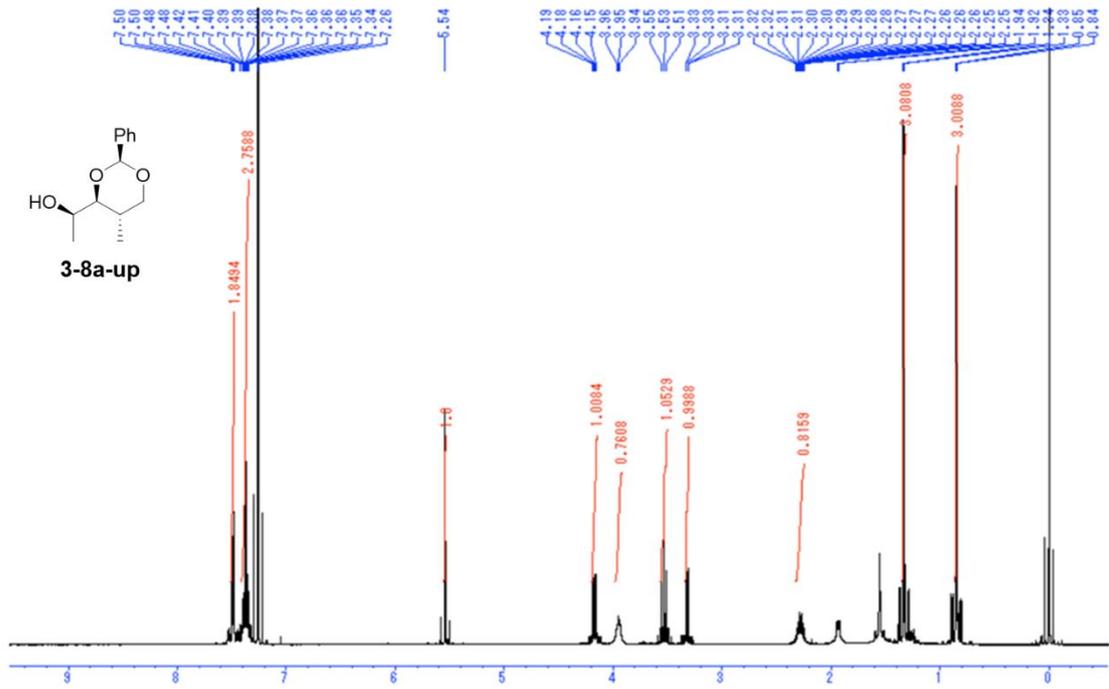
¹³C-NMR spectrum of **3-11a** (in CDCl₃, 125 MHz)



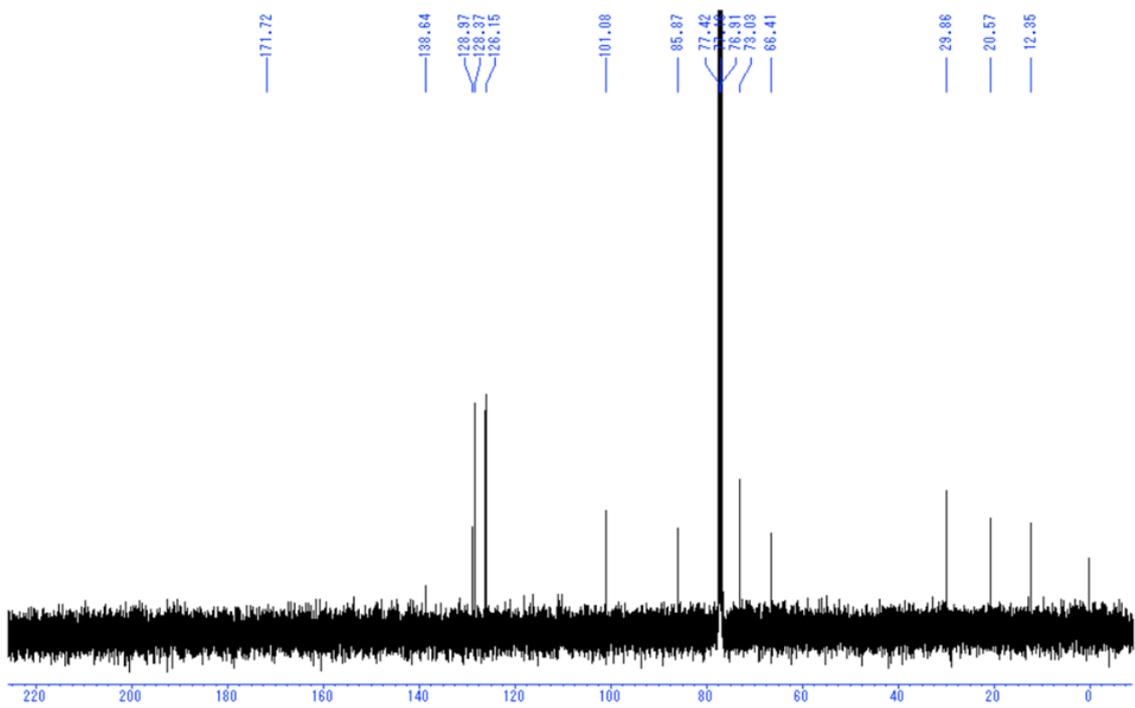
¹H-NMR spectrum of 3-11b (in CDCl₃, 500 MHz)



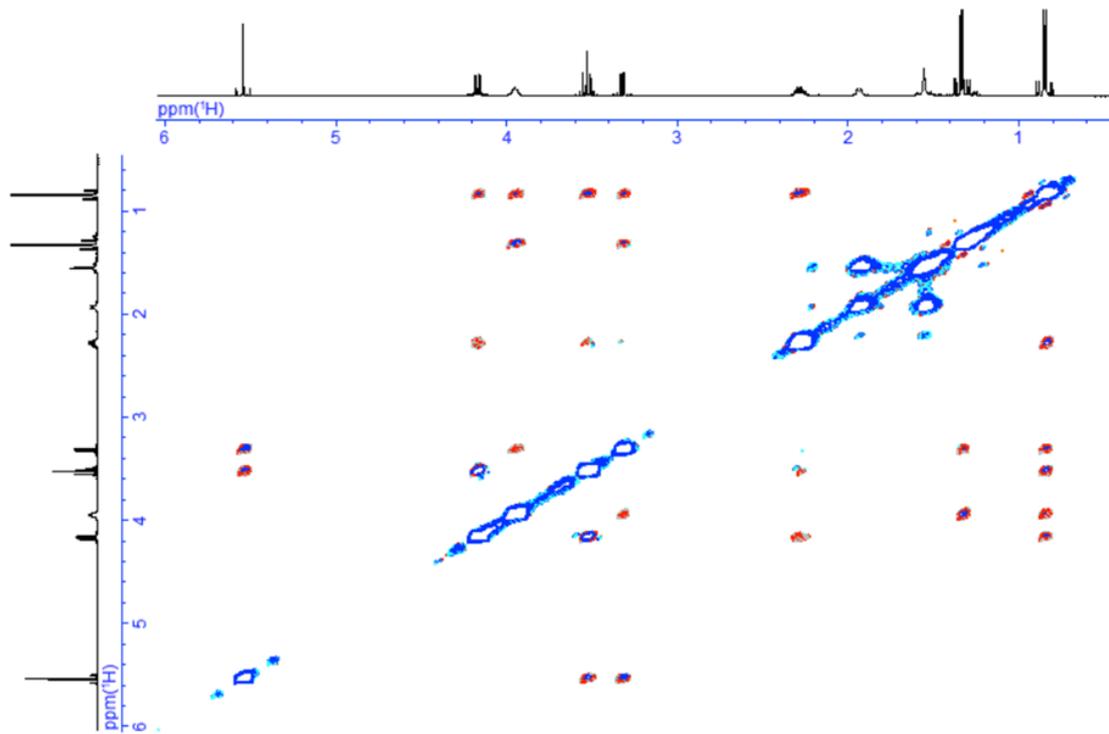
¹³C-NMR spectrum of 3-11b (in CDCl₃, 125 MHz)



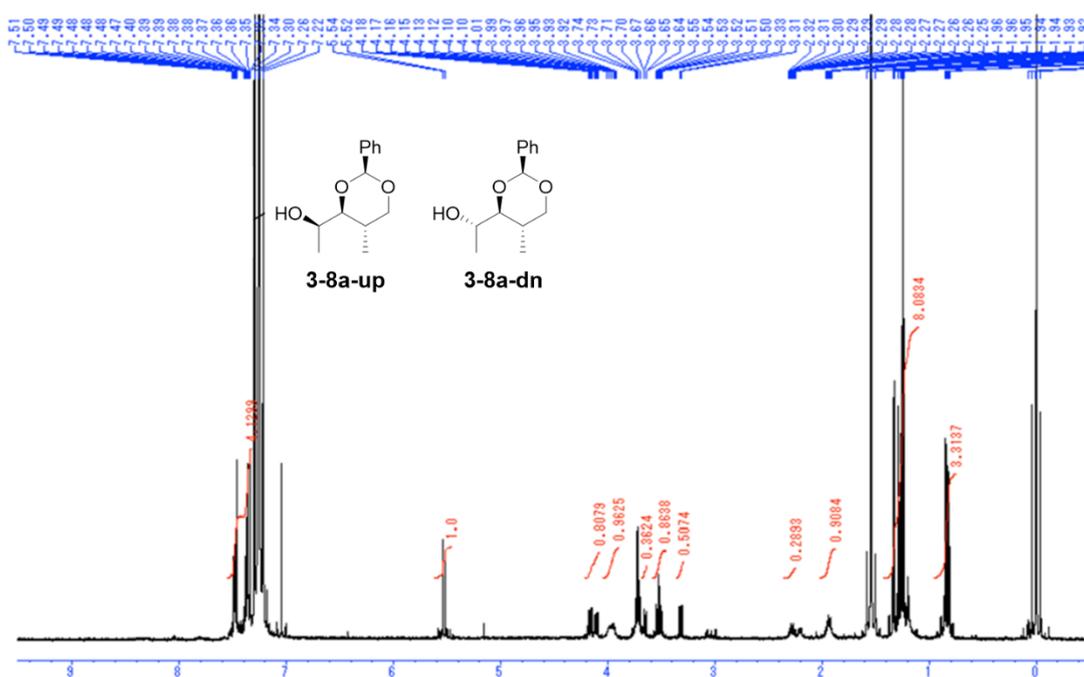
¹H-NMR spectrum of 3-8a-up (in CDCl₃, 500 MHz)



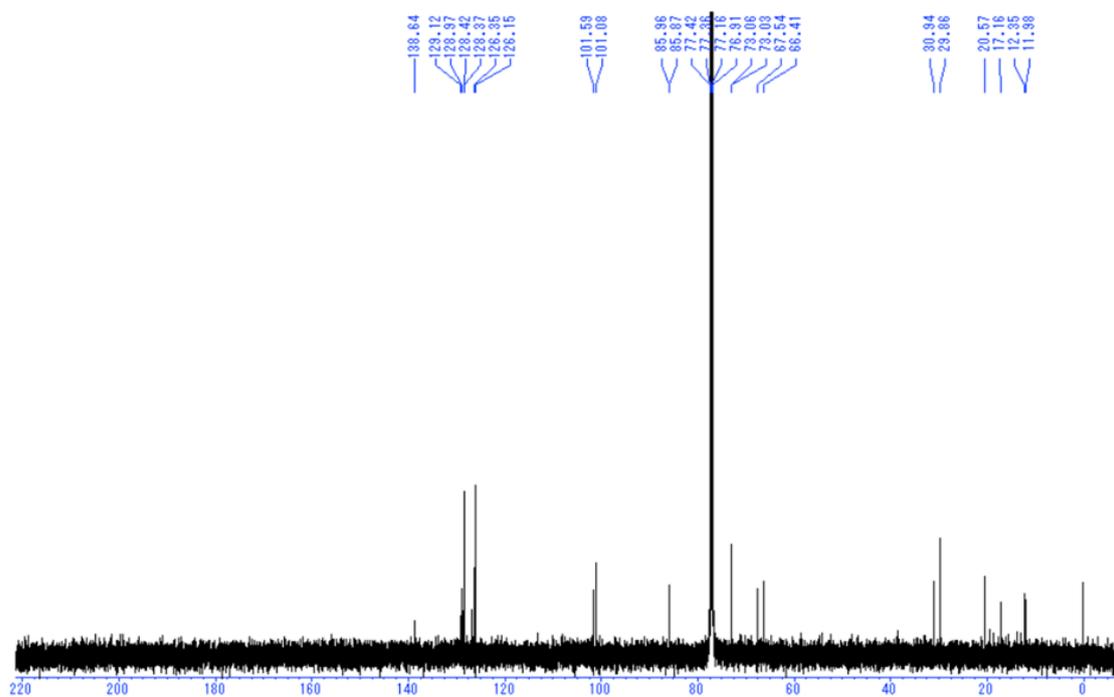
¹³C-NMR spectrum of 3-8a-up (in CDCl₃, 125 MHz)



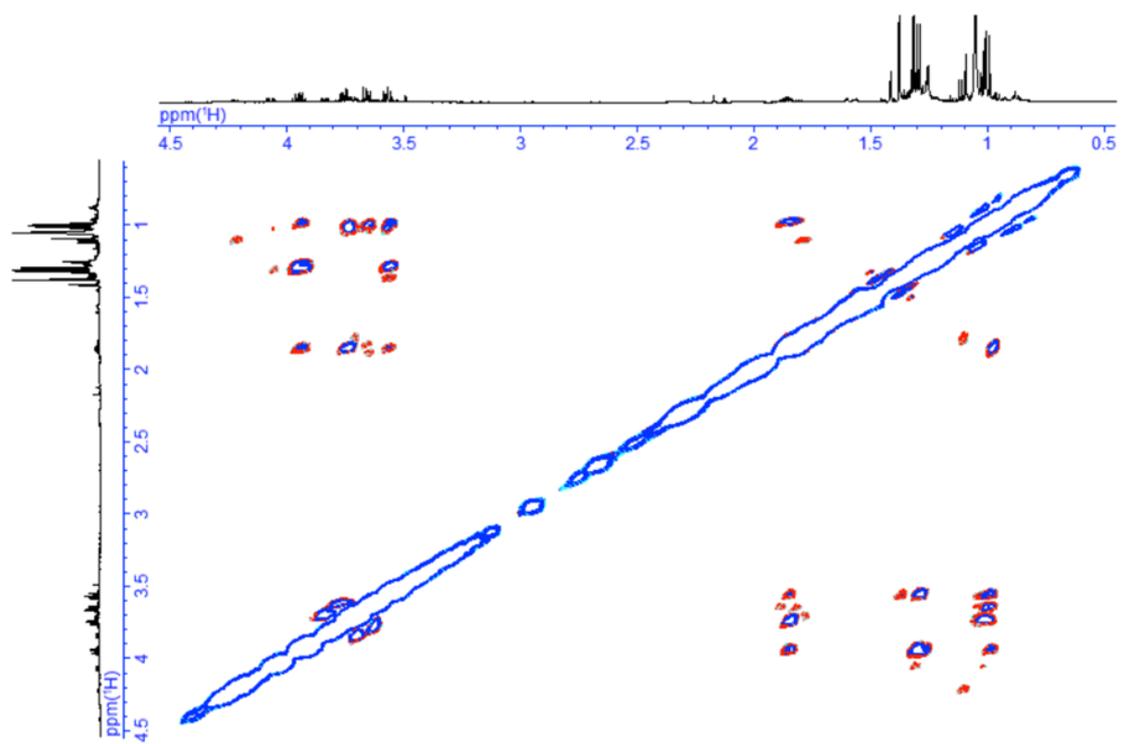
NOE spectrum of **3-8a-up** (in CDCl₃)



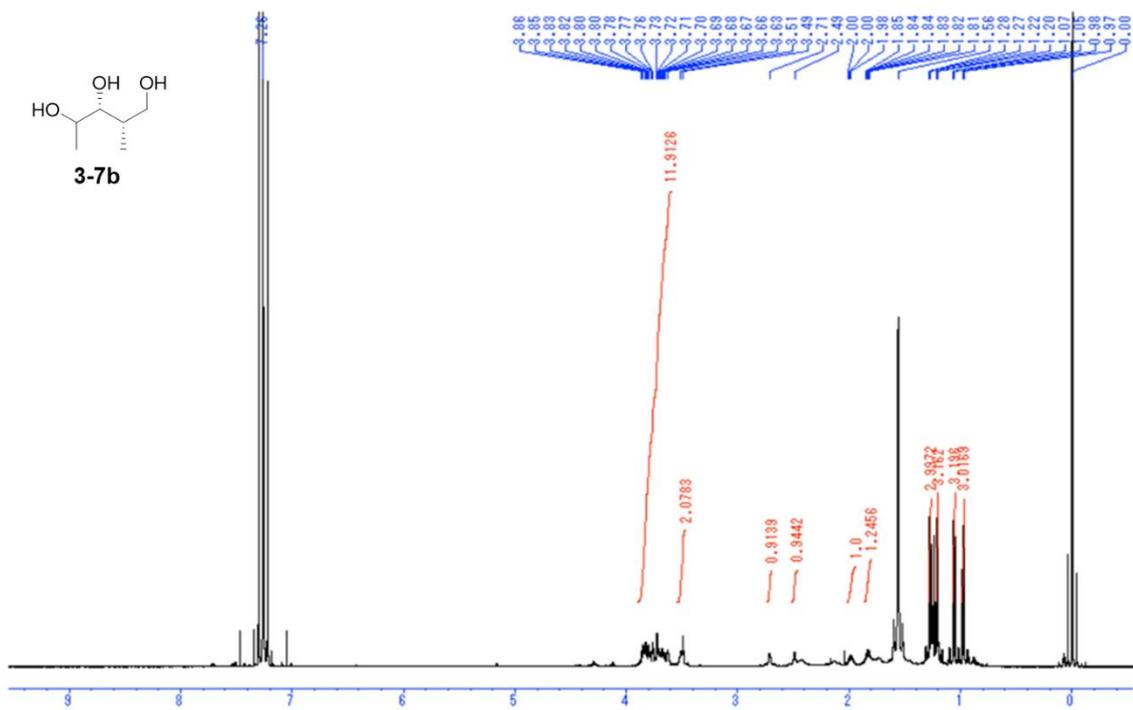
¹H-NMR spectrum of mixture of **3-8a-up** and **3-8a-dn**
(3-8a-up:3-8a-dn = 3:1, in CDCl₃, 500 MHz)

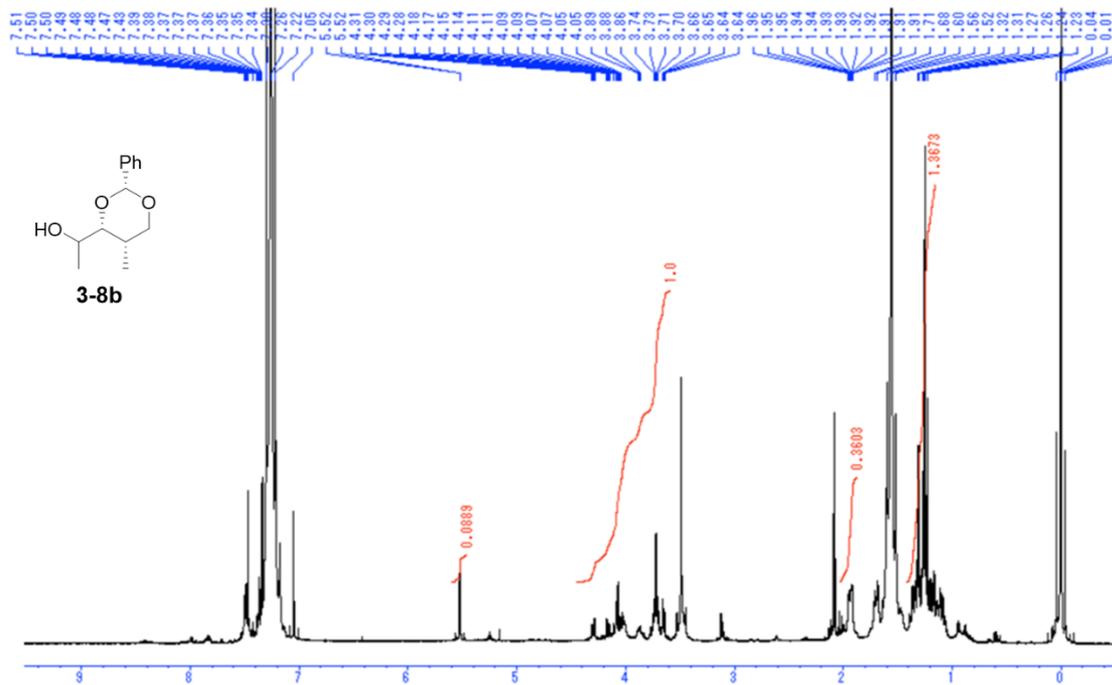


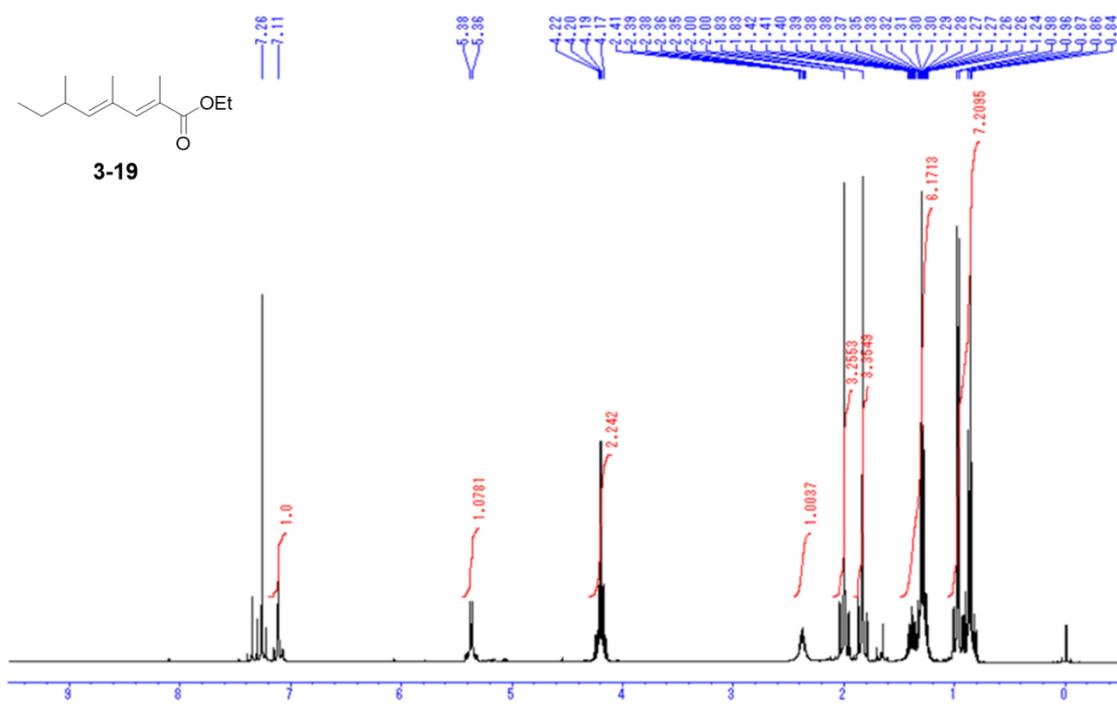
¹³C-NMR spectrum of mixture of **3-8a-up** and **3-8a-dn** (in CDCl₃, 125 MHz)



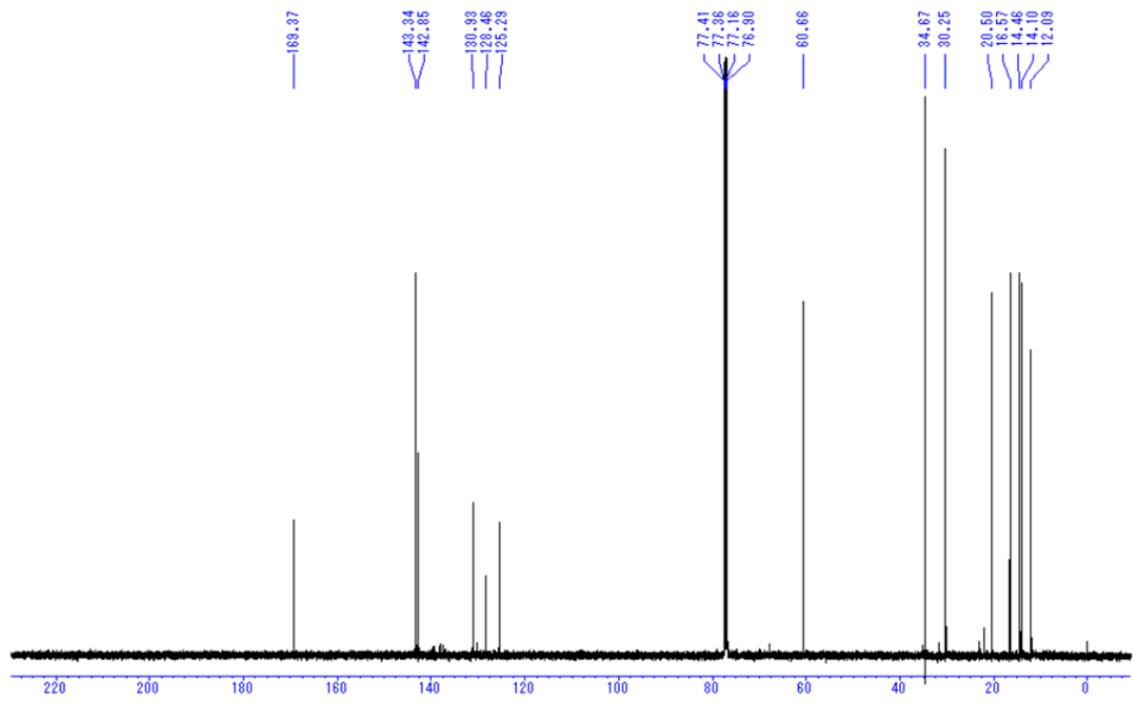
NOE spectrum of **S3-12a** (in CDCl₃)







¹H-NMR spectrum of **3-19** (in CDCl₃, 500 MHz)



¹³C-NMR spectrum of **3-19** (in CDCl₃, 125 MHz)

References

- [1]: M. Inomata, N. Hirai, R. Yoshida, H. Ohigashi, *Phytochemistry*. **2004**, *65*, 414.
- [2]: N. Hirai, R. Yoshida, Y. Todoroki, H. Ohigashi, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2000**, *64*, 7, 1448.
- [3]: T. Fujii, H. Yamaoka, K. Gomi, K. Kitamoto, C. Kumagai, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1995**, *59*, 1869.
- [4]: K. Tagami, A. Minami, R. Fujii, C. Liu, M. Tanaka, K. Gomi, T. Dairi, H. Oikawa, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 2076.
- [5]: T. Ugai, A. Minami, R. Fujii, M. Tanaka, H. Oguri, K. Gomi, H. Oikawa, *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 1878.
- [6]: J. Takino, T. Kozaki, Y. Sato, C. Liu, T. Ozaki, A. Minami, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2018**, *140*, 12392.
- [7]: K. Yamashita, E. Nagano, T. Oritani, *Agric. Biol. Chem.* **1980**, *44*, 1441.
- [8]: S. Picaud, M. Brodelius, P. E. Brodelius, *Phytochemistry*, **2005**, *66*, 961.
- [9]: S. S. Shinde, A. Minami, Z. Chen, T. Tokiwano, T. Toyomasu, N. Kato, T. Sassa, H. Oikawa, *J. Antibiot.* **2017**, *70*, 632.
- [10]: W. R. Roush, A. D. Palkowitz, K. Ando, *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 6348.
- [11]: A. P. Pulis, P. Fackler, V. K. Aggarwal, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4382.
- [12]: M. Oikawa, T. Ueno, H. Oikawa, A. Ichihara, *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 5048.
- [13]: J. M. Botubol, A. J. Macías-Sánchez, I. G. Collado, R. Hernández-Galán, *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 2420.
- [14]: J. Maruyama, K. Kitamoto, *Biotechnol. Lett.* **2008**, *30*, 1811.
- [15]: S. Nagamine, C. Liu, J. Nishishita, T. Kozaki, K. Sogahata, Y. Sato, A. Minami, T. Ozaki, C. Schmidt-Dannert, J. Maruyama, H. Oikawa, *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, *85*, e00409.
- [16]: C. Liu, A. Minami, T. Ozaki, J. Wu, H. Kawagishi, J. Maruyama, H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 15519.
- [17]: J. M. Gardner, Y. Kono, J. H. Tatum, Y. Suzuki, S. Takeuchi, *Phytochemistry* **1985**, *24*, 2861.
- [18]: A. Yagi, R. Uchida, K. Kobayashi, H. Tomoda, *J. Antibiot.* **2020**, *73*, 211.
- [19]: M. Devys, J. P. F8r8zou, R. S. Topgi, M. Barbier, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, **1984**, 2133.

5章 総括

糸状菌は天然有機化合物の宝庫であり、有機合成化学者も注目する複雑な構造や優れた生物活性をもつ興味深い化合物を数多く生産している。これらは、テルペン、ポリケタイド、RiPPs、アルカロイドなどに分類できるが、いずれも、一次代謝物を原料として炭素骨格を形成する骨格構築段階と、生成した炭素骨格へ官能基を導入する修飾段階を経て生合成される。この内、前者の反応に関わる骨格構築酵素であるテルペン環化酵素やポリケタイド合成酵素は、複雑な多段階反応を厳密に制御することで単一の生成物を与える。骨格構築酵素による反応制御機構の解明へ向けて、組み換え酵素を用いた *in vitro* 反応、計算化学的手法、標識前駆体を用いたラベル実験などが利用されているが、こうした基盤技術だけでは解明できない課題が残されているのが現状である。

本論文では、大腸菌・麹菌を宿主とした信頼性の高い異種発現系を利用して、糸状菌天然物の生合成における未解決課題に取り組んだ。その結果、1) 植物ホルモンアブシジン酸の生合成に関わるテルペン環化酵素の特定と反応機構の解明 (2章)、2) 糸状菌還元型ポリケタイド合成酵素の汎用的立体配置制御則の提唱 (3章)に成功した。

2章では、ABA 生合成への関与が指摘されていたものの、これまで機能解析されたどの遺伝子とも相同性をもたないために、注目されていなかった機能未知遺伝子 *bcABA3* を、汎用宿主である大腸菌・麹菌で異種発現した。これにより、*BcABA3* が ABA 生合成の骨格構築を担う新規テルペン環化酵素であることを明らかにし、ABA 生合成経路を解明した (図 5-1)。さらに、*BcABA3* 発現大腸菌をつかった中性分子の *in vivo* 酵素変換系を新たに確立し、重水素標識 FPP を基質とした *in vitro* 酵素反応と組み合わせることで、中性分子の異性化を経由する特徴的な環化機構を明らかにした (図 5-2)。本実験で開発した手法は、実験系が確立されている大腸菌を宿主とした発現系を利用しているため、誰でも簡単に、中性分子を経由する環化機構を解析できる手法である。また、アライメント解析と従来のテルペン環化酵素での知見に基づいて作成した 25 種の変異体の代謝解析と AlphaFold2 を用いた立体構造予測を組み合わせることで、新規テルペン環化酵素 *BcABA3* の活性部位を推定した。ここで得られた知見は、テルペン環化酵素の新たなモチーフの特定に繋がるのが期待される。

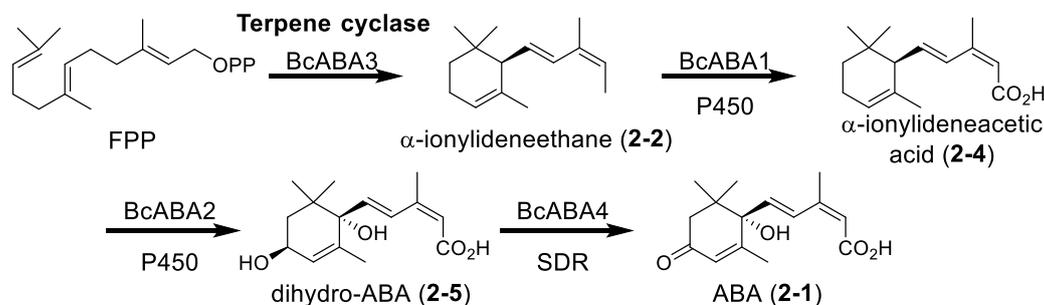


図 5-1. 糸状菌における ABA 生合成経路

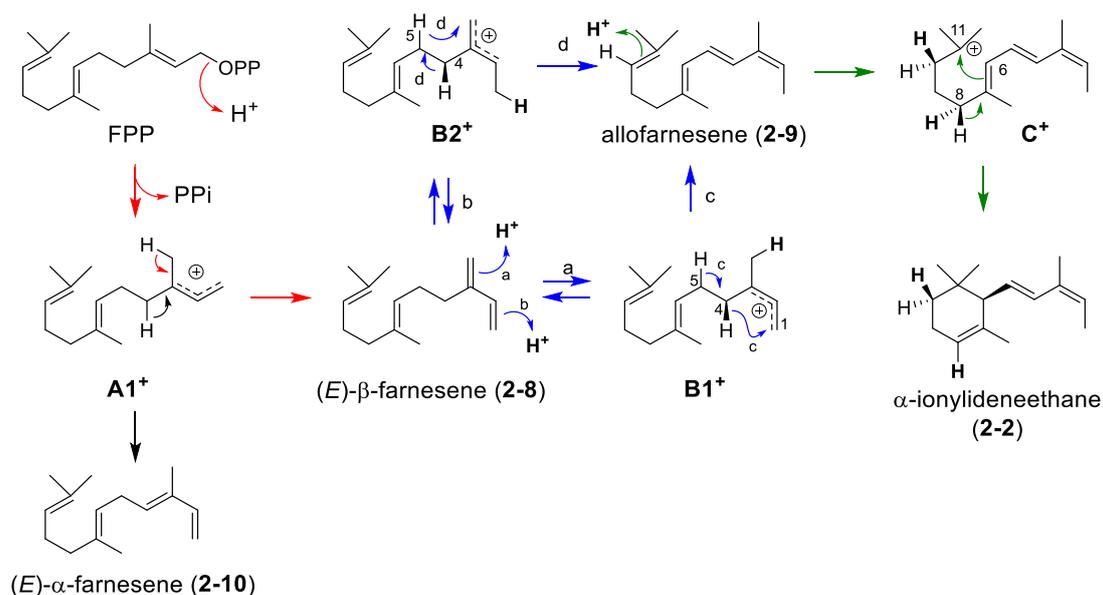


図 5-2. BcABA3 の推定環化機構

3 章では、糸状菌由来 HR-PKS の立体配置制御機構の解明を行った。HR-PKS は FAS と類似したドメインで構成されるモジュラー型巨大酵素である。FAS が触媒する炭素鎖伸長反応との相違点は、任意のドメインがスキップされるため、 β 位に置換基が残ったポリケタイド鎖を生合成する点が挙げられる。多くの研究者は、この反応制御に関わるプログラミング機構を解明すべく、独自の視点で研究を進めているが、一方で、各ドメインが触媒する反応の立体選択性については研究例が限定的であり、統一的な議論ができる状況に至っていなかった。この状況を打開するため、本研究では、ポリヒドロキシポリケタイド鎖を与える 3 種の HR-PKS に注目し、当研究室で開発を進めてきた麴菌異種宿主発現系を用いた機能解析を行った (図 5-3 A)。生成物の絶対立体配置を決めることで、解析に成功した 3 種の HR-PKS に共通する立体配置制御則を見出した (図 5-3 B)。さらに、1) 既知天然物の構造の確認、2) KR ドメインのモチーフ解析、3) 分子系統解析などから、提唱した立体配置制御則が糸状菌由来の HR-PKS に共通する特徴であることを指摘することに成功した。制御則に反する構造が報告されていた *thermolide* については、DFT 計算に基づく化学シフト予測とモデル化合物の合成から、制御則に従った構造の妥当性を支持する実験結果を得た。

以上の知見により、従来定説のなかった糸状菌 HR-PKS における汎用的立体配置制御則を提唱した。制御則に反する機能を持つ PKS も存在するが、それらの PKS は系統学的に特定のクレードに分類されていることも明らかにした。こうした例外的な PKS を適切に考慮することで、糸状菌が生産するポリケタイド系天然物の絶対立体配置を予測することができる。この構造予測は、構造決定を志向した全合成において、標的分子の構造を決める上でも有効であると考えられる。

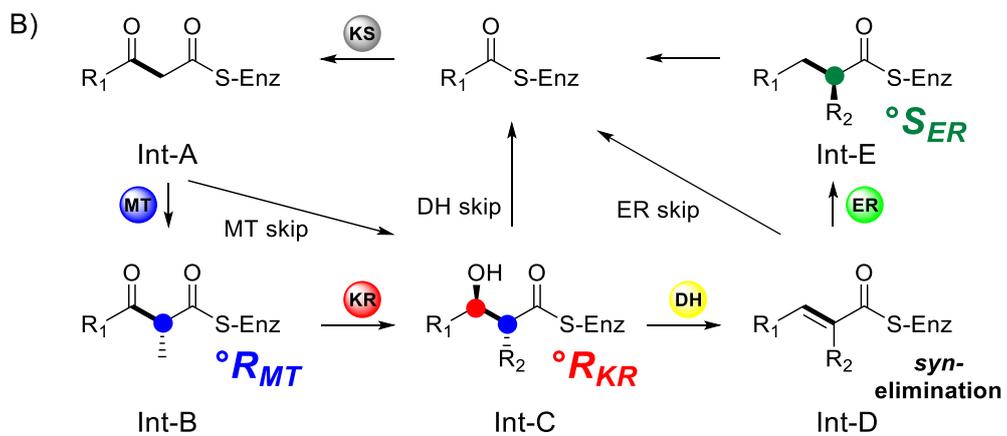
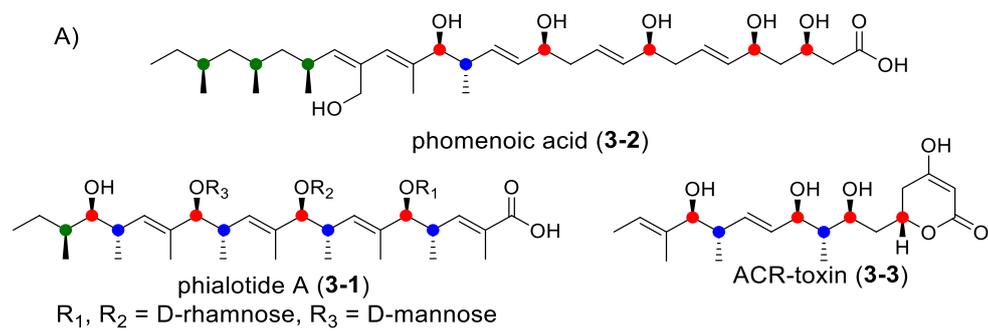


図 5-3. 糸状菌 HR-PKS における立体配置制御則; A) 研究標的としたポリヒドロキシポリケタイドの化学構造、B) HR-PKS の触媒反応および、反応生成物となる中間体の立体配置

謝辞

研究を行うにあたり、終始ご指導ご鞭撻を賜りました北海道大学大学院理学研究院 有機反応論研究室 及川英秋 名誉教授、永木愛一郎 教授、南篤志 准教授、尾崎太郎 助教 (現: 東北大学)、劉成偉 助教 (現: 東北林業大学)に心より感謝いたします。

北海道大学大学院理学研究院 有機化学第二研究室 谷野圭持 教授、大学院工学研究院 応用生物化学研究室 大利徹 教授には、論文の審査委員として貴重なご意見を賜り、ご助言をいただきました。ここに、感謝いたします。

以下の先生方には、微生物株の分譲や化合物の供与、DFT 計算、依頼測定などでお世話になりました。深謝いたします。

- ・北里大学 薬学部 供田洋 教授、小林啓介 助教
- ・東北医科薬科大学 薬学部 内田龍児 教授
- ・北京大学深圳大学院 Tao Ye 教授、Jie Yu 博士、Yian Guo 博士
- ・弘前大学 農学生命科学部 橋本勝 教授
- ・香川大学 農学部 秋光和也 教授、望月進 助教
- ・北海道大学 農学部 福士江里 博士