



Title	人工的機能改変を指向した糸状菌ポリケタイド系天然物の生合成に関する研究
Author(s)	鵜飼, 孝大
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第13667号
Issue Date	2019-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13667">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13667</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/91504">https://hdl.handle.net/2115/91504</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Takahiro_Ugai.pdf



人工的機能改変を指向した  
糸状菌ポリケタイド系天然物の生合成に関する研究

北海道大学大学院 総合化学院 有機反応論研究室  
鵜飼 孝大  
2019年 博士論文



# 目次

第 1 章 序論	
1-1. 糸状菌由来のポリケタイド系天然物	1
1-2. 麴菌異種発現系を利用した天然物生合成遺伝子の機能解析例	8
1-3. 本論文の目的	9
第 2 章 本論-植物毒素 <b>betaenone</b> の酵素的全合成	
2-1. <b>Betaenone</b> 類生合成研究の背景	12
2-2. <b>Betaenone</b> 類の生合成遺伝子クラスターの探索	14
2-3. 麴菌異種発現系を用いた <b>bet</b> 遺伝子クラスターの機能解析	
2-3-1. <b>AO-bet1, AO-bet13</b> からの代謝産物の抽出	15
2-3-2. <b>AO-bet134</b> からの代謝産物の抽出	17
2-3-3. <b>AO-bet132</b> からの代謝産物の抽出	18
2-4. デカリン骨格の形成	22
2.5. R ドメインの機能解析	24
2-6. 考察	26
2-7. まとめ	29
第 3 章 本論-じゃがいも夏疫病菌 <b>Alternaria solani</b> を用いたゲノムマイニング	
3-1. PKS を対象としたゲノムマイニング法	32
3-2. ゲノムマイニングの対象となる機能未知 PKS の探索	33
3-3. 麴菌異種発現系を用いた <b>asol</b> 遺伝子クラスターの機能解析	
3-3-1. <b>AO-asol/CS</b> からの代謝産物の抽出	38
3-3-2. <b>AO-asol/CSA</b> からの代謝産物の抽出	41
3-4. 考察	49
3-5. まとめ	51
第 4 章 本論-抗腫瘍活性ポリケタイド <b>cyclohelminthol</b> 類の生合成研究	
4-1. <b>Cyclohelminthol</b> および類縁体の生合成に関する研究の背景	54
4-2. <b>Cyclohelminthol</b> 類生合成遺伝子の探索	56
4-3. 異種発現系を利用した <b>terrein</b> 系天然物生合成遺伝子の機能解析	
4-3-1. <b>Cyclohelminthol</b> 類の生合成前期に関与する生合成遺伝子の機能解析	61
4-3-2. <b>Palmaenone</b> 類の生合成前期に関与する生合成遺伝子の機能解析	67
4-3-3. <b>Terrein</b> 類の生合成前期に関与する生合成遺伝子の機能解析	70
4-3-4. <b>Terrein</b> 系天然物の生合成後期に関与する生合成遺伝子の機能解析	73

4-4. 考察	89
4-5. まとめ	90
第5章 本論- キメラ酵素による糸状菌由来 PKS-NRPS の機能解析	
5-1. PKS キメラ酵素の機能解析	93
5-2. 従来法に従ったキメラ酵素遺伝子の機能解析	
5-2-1. キメラ酵素の材料選定と性質	98
5-2-2. AO- <i>aso</i> / <i>CS</i> <sub>KS-T</sub> / <i>hirA</i> <sub>R</sub> の機能解析	101
5-2-3. AO- <i>hirCA</i> <sub>KS-T</sub> / <i>aso</i> / <i>S</i> <sub>R*</sub> の機能解析	105
5-3. 考察	108
5-4. まとめ	109
第6章 実験項	112
第7章 総括	183
謝辞	188

## 第1章 序論

### 1-1. 糸状菌由来のポリケタイド系天然物

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り、様々な生物活性を有する化合物が知られている。糸状菌由来のポリケタイド天然物に着目すると、*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<sup>1</sup>、*Aspergillus terreus* より単離された HMG-CoA レダクターゼに対する阻害剤である lovastatin<sup>2</sup> (高脂血症治療薬) といった医薬品 (候補物質) の他、T-toxin<sup>3</sup>、aflatoxin<sup>4</sup>、fumonisin<sup>5</sup> などの毒素や、糸状菌の腺房形成を阻害する fusarisetin<sup>6</sup> 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。酸素官能基やメチル基が精緻にレイアウトされた直鎖状化合物や小員環から中員環からなる環状化合物は全合成研究における魅力的な標的分子でもあり、これまでに数多くの化合物が合成されてきた。一方で、近年は生合成酵素遺伝子と異種発現宿主を利用した生合成が可能になりつつある。

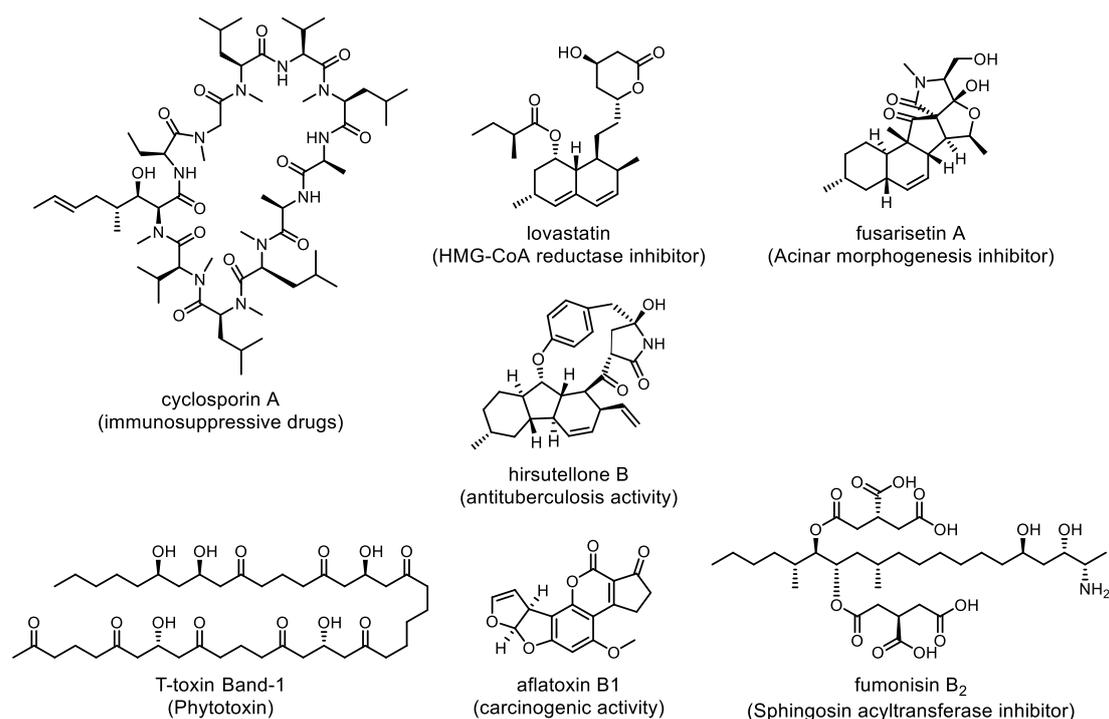


図 1-1-1. 糸状菌由来ポリケタイド系代謝産物と生物活性

ポリケタイド類の生合成に着目すると、最終産物の構造にかかわらず、脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase, FAS) と同様の機構での炭素鎖伸長と、修飾反応が進行する (図 1-1-2)。この炭素鎖伸長と修飾を触媒する酵素をポリケタイド合成酵素 (PKS) と呼び、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を基質として、

炭素鎖の伸長、β位の官能基化を経て、基本的な官能基を備えたポリケタイド鎖が構築される。この反応を触媒する機能単位をドメインと呼び、次の6つが知られている。

**KS (Ketosynthase):** 伸長単位の脱炭酸と、ポリケタイド鎖へのクライゼン縮合

**AT (ACP transacylase):** 伸長単位を ACP に乗せる

**DH (Dehydratase):** KR によって生じたβ-ヒドロキシケトンの脱水

**ER (Enoylreductase):** DH によって生じたα,β-不飽和カルボニルの 1,4 還元

**KR (β-Ketoreductase):** KS によって生じたβ-ジケトンの還元

**ACP (Acyl carrier protein):** ポリケタイド鎖とチオエステル結合し、各ドメインに運搬  
この内、KS, AT, ACP は FAS、PKS の炭素鎖伸長における最小単位であり、必ず機能するドメインである。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ことでポリケタイド鎖に還元度合いの多様性 (A~D) が生まれる (図 1-1-2.)。

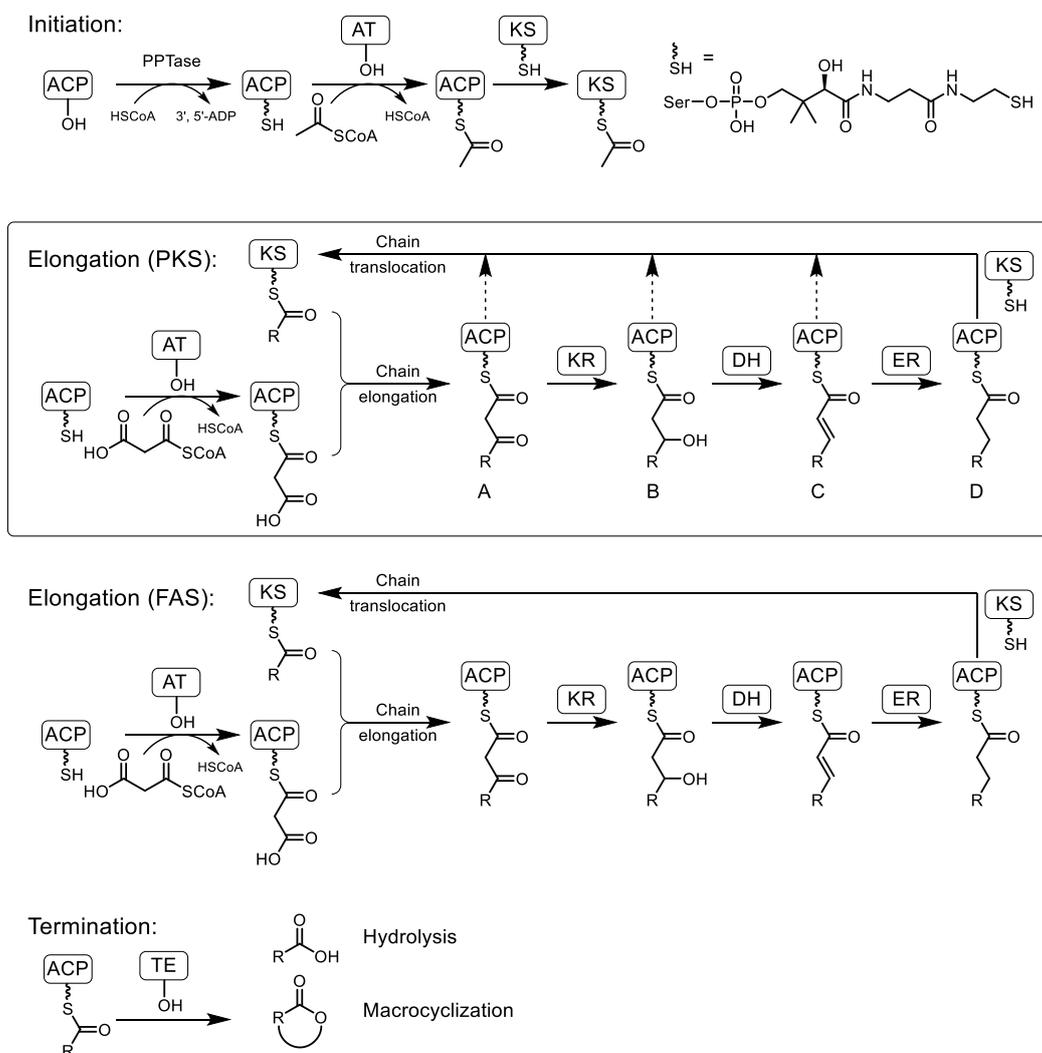


図 1-1-2. PKS を構成する各ドメインの機能

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。この内、Type I の PKS については、炭素鎖の伸長回数に応じた数のドメインが連結したマルチモジュラー型と、1 セットのドメインが複数回作用する繰り返し型に分類されている。

### <マルチモジュラー型 PKS>

マルチモジュラー型の PKS は主にバクテリアに見られ、炭素鎖の伸長に関わる一連の反応を触媒するドメインが一組となったモジュールが連なった巨大酵素である(図 1-1-4)。

- 1) 上流のモジュールから下流のモジュールへと炭素鎖が受け渡されて、ドメインの構成に応じた鎖長や酸化度をもつポリケタイドが構築される。
- 2) C 末端、N 末端に Domain docking (DD) ドメインを有しており、タンパク質間相互作用によって認識し、正確にポリケタイド鎖を受け渡している。
- 3) DEBS のモジュール 3 の X 線結晶構造解析にも成功しており、ホモダイマー構造が明らかになっている<sup>7</sup>。さらに Pikromycin の生合成に関与する PikA の 5 番目のモジュール (PikAIII) は cryo-EM によって構造解析されており、炭素鎖伸長の各段階で大きく構造が変化していることが知られているなど、様々なことが明らかになっている<sup>8,9</sup>。

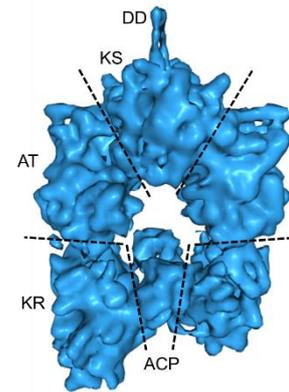


図 1-1-3. PikAIII の立体構造

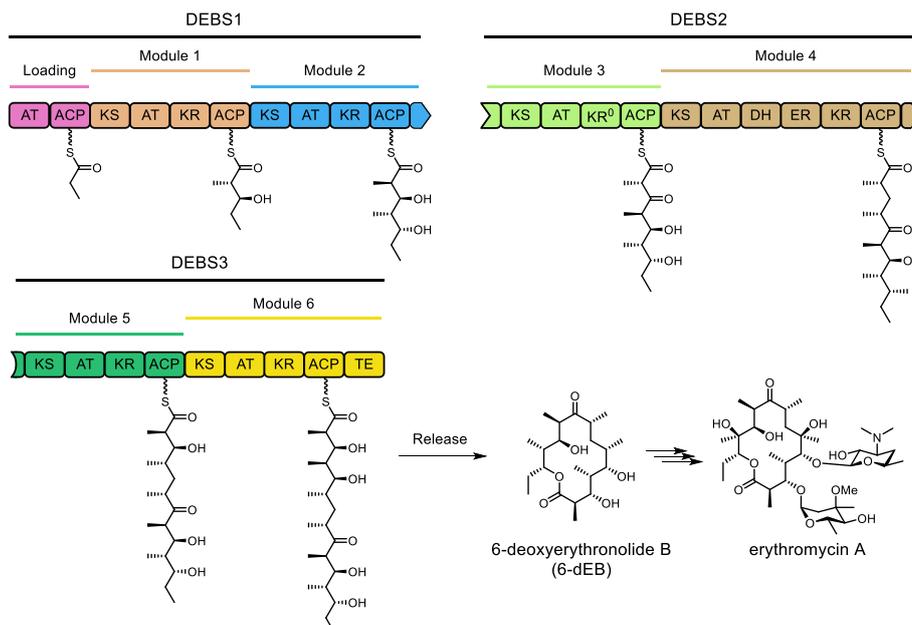


図 1-1-4. DEBS のドメイン構成と生成物

## <繰り返し型 PKS>

一方で繰り返し型は、マルチモジュラー型とは異なり、一分子のポリケタイド鎖を合成するための炭素鎖伸長と修飾を行う各ドメインを 1 つしか有していない。そのため、各機能ドメインは一分子のポリケタイド鎖を合成する際に「繰り返し」利用されるという特徴がある。繰り返し型 PKS は、その生合成様式において炭素鎖伸長のみを繰り返すか、または炭素鎖伸長と修飾の両方を行うか、さらに修飾の割合によって 3 つに分類される。

- 1) KR, ER, DH が存在せず、生成物がポリケトンの場合には Non-reducing PKS (NR-PKS)
- 2a) 生成物の還元割合が比較的低いものは Partially-reducing PKS (PR-PKS)
- 2b) よく還元された生成物を与えるものは Highly-reducing PKS (HR-PKS)

このうち NR-PKS の例として、aflatoxin 類の共通前駆体である norsolorinic acid anthrone を生産する PksA を示す (図 1-1-5)。NR-PKS は後述する HR-PKS とは異なり、AT ドメインには開始単位だけを認識する SAT、伸長単位だけを認識する MAT の 2 種類があり、さらに芳香族化するための C-C 結合形成を触媒する PT ドメインが存在している。KS, MAT, ACP の働きでポリケトン鎖が伸長した後に、PT ドメインによって 2-11 位、4-9 位間で C-C 結合を形成し、TE ドメインによって酵素から切り出される機構が確かめられている。NR-PKS は HR-PKS よりも比較的単純な構造をしているため、各ドメインを「切り分けて」各ポリペプチドに分割した後、それぞれを共発現することで活性が回復すると確認されている<sup>10</sup>。さらに cercosporin の生合成に関与する CTB1 では、SAT-KS-MAT の先頭 3 ドメインについて cryo-EM による構造解析がなされているなど、機能解析が進められている<sup>11</sup>。

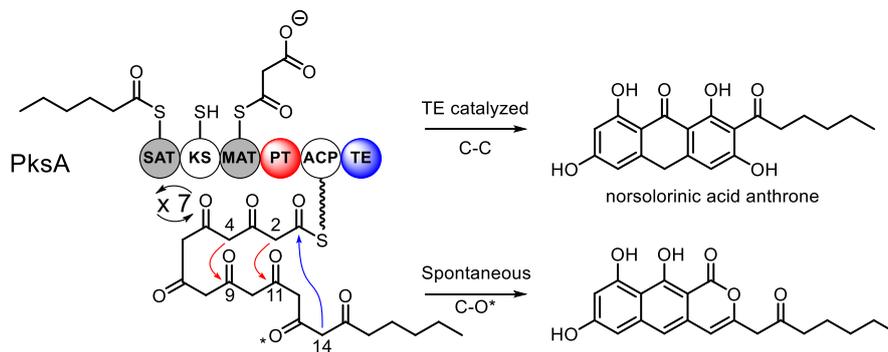


図 1-1-5. PksA (NR-PKS) の機能解析

一方で HR-PKS の触媒機構においては、例として、ある炭素鎖伸長段階では DH,ER が機能せずβ-ヒドロキシケトンが生成し、ある時は全てのドメインが働いて飽和ケトンが生成する、という制御が厳密にされており、決まった鎖長、酸化度の生成物を与えるが、その機能解析と、判明した機能に基づいた天然物の全合成への応用は NR-PKS と比較して遅れているのが現状である (図 1-1-6)。

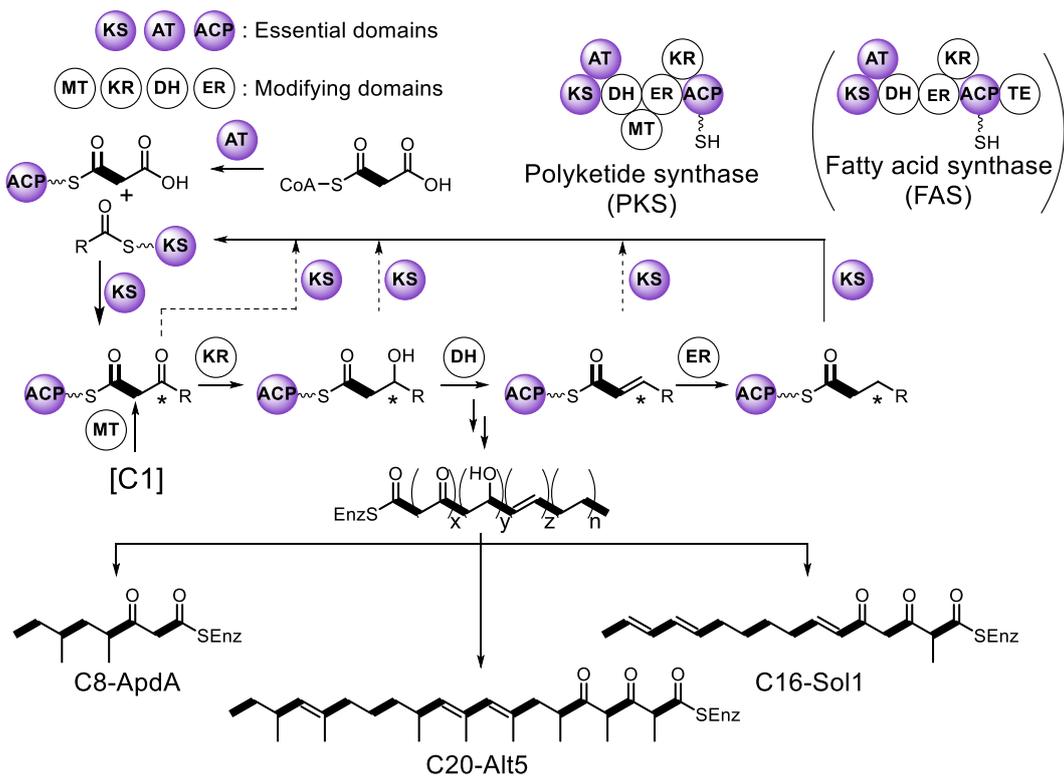


図 1-1-6. 繰り返し型 PKS の機能

そこで本研究では、HR-PKS 遺伝子と修飾酵素遺伝子を異種発現宿主に導入し、形質転換体を利用した天然物の全合成を行い、さらに得られた構造から PKS の機能解析を試みた。しかし、このような手法で天然物として単離された化合物の異種生産に成功した例は、本研究開始時点で数例が知られるのみであり、そのうち HR-PKS に限ると次の 3 例のみであった。

- 1) 2010年に Heneghan らは、*Aspergillus oryzae* を用いた異種発現系で tenellin の全合成を達成している。ポリケタイド合成酵素-非リボソームペプチド合成酵素 (PKS-NRPS) である TenS と、その機能を相補する trans-ER である TenC によって主鎖の炭素数が 10 のポリケタイド鎖が合成された後、NRPS によって選択的に活性化された Tyr が縮合する。その後、PKS-NRPS の C 末端にある、生成物の切り出しに参与する R\*ドメインが Dieckmann 縮合を触媒し、テトラミン酸構造を有する pretenellin-A が生合成される。続いて、P450 酸化酵素 TenA がテトラミン酸の酸化的な環拡大反応を触媒して 4-ヒドロキシ-2-ピリドン構造を有する pretenellin-B に変換した後、同じく P450 酸化酵素である TenB が窒素原子への水酸基の導入反応を触媒して tenellin が生合成されることを明らかにした (図 1-1-7)<sup>12</sup>。

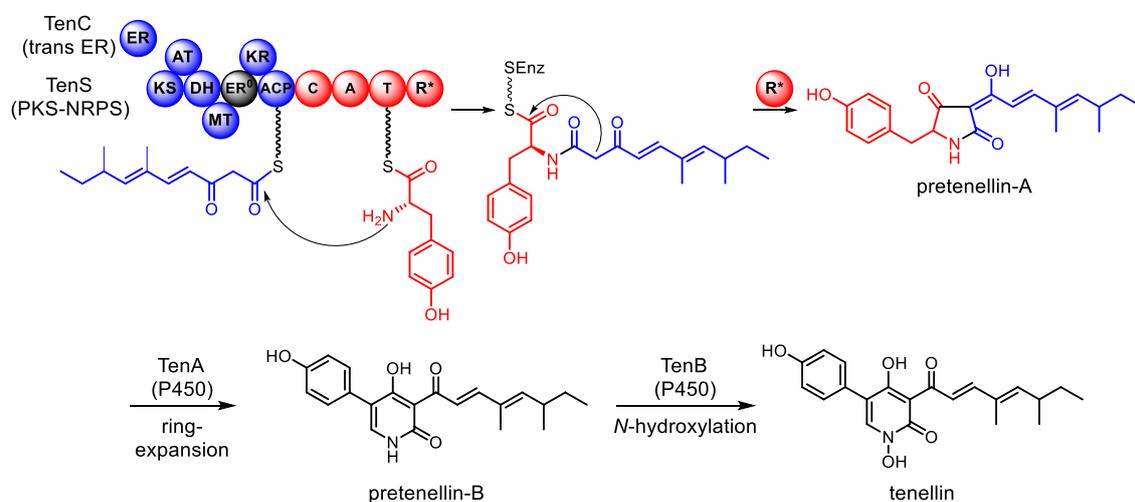


図 1-1-7. Tenellin の全合成

- 2) 一方、1999年に Kennedy らは、lovastatin 生合成酵素の HR-PKS である LovB と、その機能を相補する trans-ER である LovC を糸状菌 *Aspergillus nidulans* で異種発現させ、lovastatin の生合成前駆体である dihydromonacolin L の異種生産に成功した<sup>13</sup>。
- 3) 2009年には、同じく LovB を出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて組み換えタンパク質として発現させ、*in vitro* での実験により LovB の機能を解析した (図 1-1-8)<sup>14</sup>。

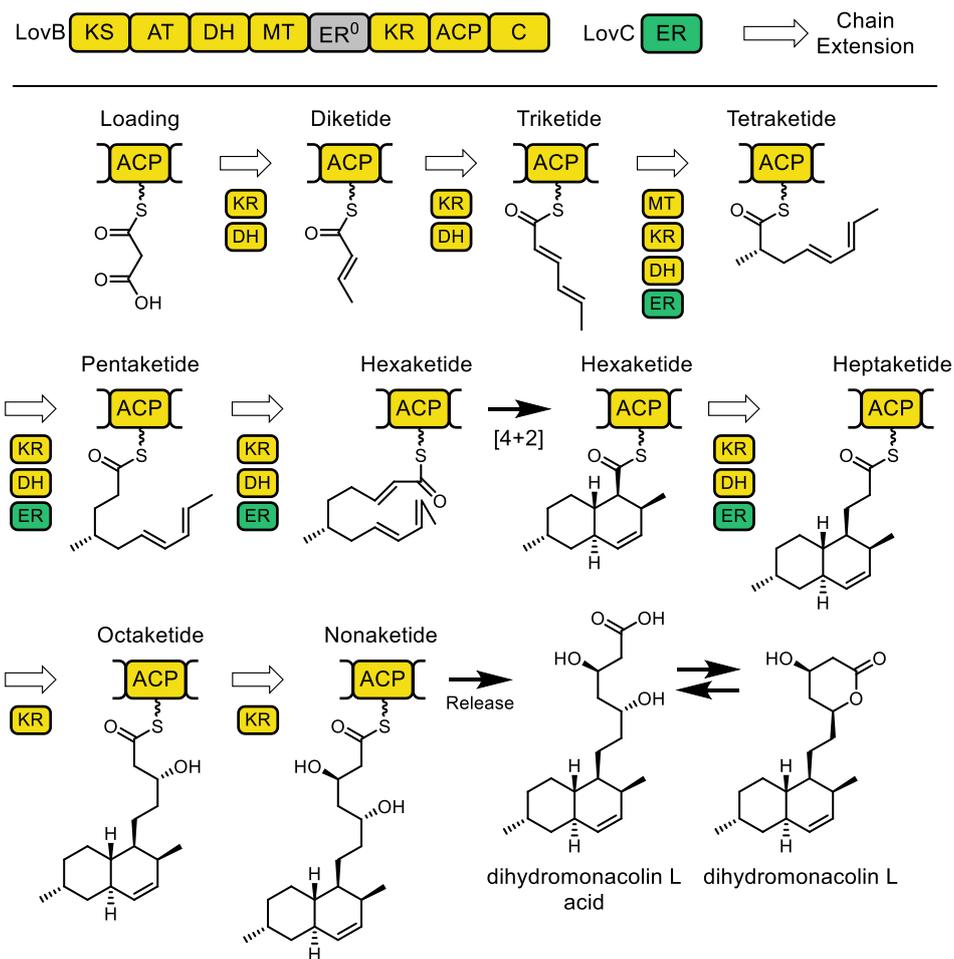


図 1-1-8. LovB, C の機能

これまでの研究において、HR-PKS が関連した天然物の全合成と機能解析例が少ない最大の理由は PKS (-NRPS) が 2600 ~ 4000 aa と、生合成酵素の中でも図抜けて巨大であり、取り扱いが煩雑で難易度が高いことである。さらに、生合成酵素の機能解析において有効な異種発現宿主を用いた発現例が少なく、労力をかけても成果を得る確率が低いことも挙げられる。

以上の点を踏まえ、ポリケタイド系天然物の全合成と PKS の機能解析を目指すために *A. oryzae* を宿主とした異種発現系に着目した。

## 1-2. 麹菌異種発現系を利用した天然物生合成遺伝子の機能解析例

前節 1-1 で述べたように、本研究では繰り返し型 PKS の関与する天然物の生合成機構を明らかにするため、異種発現系を用いた物質生産を通して機能解析を行った。そのための宿主として麹菌異種発現系に着目した。

麹菌は、我々の日常生活においても醤油や味噌の醸造などに使われている馴染み深い微生物であり、優れたタンパク質生産能力を有している。麹菌を異種発現系として利用すると、誘導プロモーターの制御下に置いた外来遺伝子由来の酵素が生産され、一次代謝産物を基質として、二次代謝産物の生合成を行うことができる。基質供給系の増強など、特別な操作をしないで得られる産物の収量が 100 mg/L 程と、生成物の構造解析に十分である。

さらに、これまで汎用宿主として用いられてきた酵母や大腸菌と比較すると、麹菌異種発現系は、麹菌と同様の子嚢菌由来の遺伝子であった場合、イントロンを含んだ gDNA 由来の配列を直接導入しても、正しく機能する点で優れている。

麹菌異種発現系を用いた糸状菌由来生合成遺伝子の機能解析は、PKS を対象とした研究が数例知られているが<sup>15, 16</sup>、特にテルペン系天然物への応用例が数多く知られている。例として、2013 年に Chiba は、世界で初めて二機能性のセスタテルペン (C<sub>25</sub>) 合成酵素 AcOS の機能解析と ophiobolin F の異種生産に成功し<sup>17</sup>、同じく 2013 年に Tagami らは特徴的な酸化修飾の順序を明らかにしながらインドールジテルペン Paxillin の全生合成を達成している<sup>18</sup>。2015 年に Liu らは、糸状菌由来天然物の生合成遺伝子の中で最も多い 17 個が生合成に関与するインドールジテルペン penitrem A の生合成経路の解析に成功した<sup>19</sup>。テルペンに加えて、最近では 2016 年に Ye らによって ustiloxin B の生合成遺伝子の機能解析に成功し、リボソーム由来のタンパク質を基質とした天然物の一群である RiPP の機能解析も麹菌異種発現系で可能であると証明した<sup>20</sup>。さらに 2017 年には、Yamane らによって担子菌 *Clitopilus pseudo-pinistus* 由来生合成遺伝子の cDNA を異種発現して pleuromutilin 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げている実績があり、様々な種、数の遺伝子が適応可能である<sup>21</sup>。

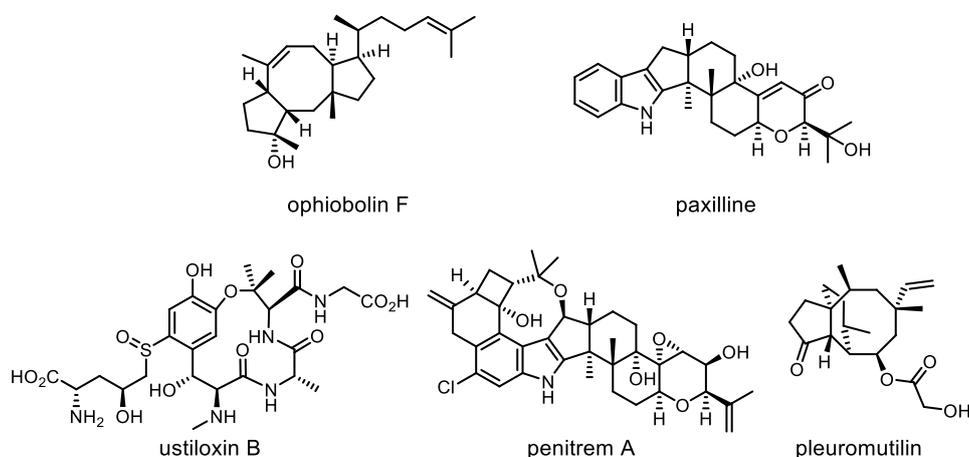


図 1-2-1. 麹菌異種発現系で機能解析、異種生産されてきた天然物

前述した先行研究から、麴菌異種発現系は以下の利点を持つと言える。

- 1) 物質生産に必要なレベルでの生合成酵素の発現
- 2) 細胞内局在化による比較的低い発現量での効率の良い物質生産<sup>22</sup>
- 3) P450還元酵素など、酵素の働きを補助する酵素の存在
- 4) 二次代謝産物の基質供給系の性能が良い
- 5) 導入した生合成酵素遺伝子に応じた生合成中間体が単離可能
- 6) 生産した化合物が毒性を持っている場合の回避機構の存在

### 1-3. 本論文の目的

本論文では、前節 1-2 で述べた通りの利点を有する麴菌異種発現系を利用し、他の天然物生合成酵素に比べて機能解析例の少ない HR-PKS (-NRPS) が関与した難易度の異なる課題に挑戦し、将来的に多様な物質生産のための知見を得るために研究を行ったので報告する。

- 2章: 既知化合物について生合成遺伝子、並びに生合成経路の解析
- 3章: 未知化合物について生合成遺伝子、並びに生合成経路の解析
- 4章: 複雑な生合成反応が関与する天然物の生合成遺伝子の解析
- 5章: 既知酵素を用いた機能改変酵素の解析

## References

- 1) H. Svarstad, H. C. Bugge, and S. S. Dhillon, *Biodivers. Conserv.* **1969**, *9*, 1521.
- 2) 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*, 3957.
- 3) Y. Kono, and 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, and N. P. J. Kriek, *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 1806.
- 6) J-H. Jang, Y. Asami, J-P. Jang, S-O. Kim, D. O. Moon, K-S. Shin, D. Hashizume, M. Muroi, T. Saito, H. Oh, B. Y. Kim, H. Osada, and J. S. Ahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6865.
- 7) A. L. Edwards, T. Matsui, T. M. Weiss, and C. Khosla, *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2229.
- 8) S. Dutta, J. R. Whicher, D. A. Hansen, W. A. Hale, J. A. Chemler, G. R. Congdon, A. R. H. Narayan, K. Håkansson, D. H. Sherman, J. L. Smith, and G. Skiniotis, *Nature* **2014**, *510*, 512.
- 9) J. R. Whicher, S. Dutta, D. A. Hansen, W. A. Hale, J. A. Chemler, A. M. Dosey, A. R. H. Narayan, K. Håkansson, D. H. Sherman, J. L. Smith, and G. Skiniotis, *Nature* **2014**, *510*, 560.
- 10) J. M. Crawford, P. M. Thomas, J. R. Scheerer, A. L. Vagstad, N. L. Kelleher, and C. A. Townsend, *Science* **2008**, *320*, 243.
- 11) D. A. Herbst, C. R. Huitt-Roehl, R. P. Jakob, J. M. Kravetz, P. A. Storm, J. R. Alley, C. A. Townsend, and T. Maier, *Nat. Chem. Biol.* **2018**, *14*, 474.
- 12) M. N. Heneghan, A. A. Yakasai, L. B. Halo, Z. S. Song, A. M. Bailey, T. J. Simpson, R. J. Cox, and C. M. Lazarus, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1508.

- 13) J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, C. R. Hutchinson, *Science* **1999**, *284*, 1368.
- 14) 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, and Y. Tang, *Science* **2009**, *326*, 589.
- 15) I. Fujii, N. Yoshida, S. Shimomaki, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1301.
- 16) K. Kasahara, I. Fujii, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 920.
- 17) R. Chiba, A. Minami, K. Gomi, and H. Oikawa, *Org. Lett.* **2012**, *15*, 594.
- 18) K. Tagami, C. Liu, A. Minami, M. Noike, T. Isaka, S. Fueki, Y. Shichijo, H. Toshima, K. Gomi, T. Dairi, and H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 1260.
- 19) C. Liu, K. Tagami, A. Minami, T. Matsumoto, J. C. Frisvad, H. Suzuki, J. Ishikawa, K. Gomi, and H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5748.
- 20) Y. Ye, A. Minami, Y. Igarashi, M. Izumikawa, M. Umemura, N. Ngano, M. Machida, T. Kawahara, K Shin-Ya, K. Gomi, and H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 8072.
- 21) M. Yamane, A. Minami, C. Liu, T. Ozaki, I. Takeuchi, T. Tsukagoshi, T. Tokiwano, K. Gomi, and H. Oikawa, *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 2317.
- 22) A. Ban, M. Tanaka, R. Fujii, A. Minami, H. Oikawa, T. Shintani, and K. Gomi, *Biosci, Biotechol, Biochem.* **2018**, *82*, 139.

## 第2章 本論-植物毒素 betaenone の酵素的全合成

### 2-1. Betaenone 類生合成研究の背景

ポリケタイド系天然物の生合成研究を詳細に行うにあたり、PKS の機能を忠実に再現させる異種発現系が必須である。しかし本研究の開始時点において、麴菌異種発現系での全合成例は2010年に Heneghan らによって報告された tenellin のみであった<sup>1</sup>。加えて、PKS の単独異種発現例は数例知られているものの、宿主によって生産物が予期せぬ修飾を受ける例もあり、実用可能な株であるかを判断するために解析例を積み重ねる必要がある<sup>2</sup>。そこで糸状菌由来植物毒素 betaenone に着目し、その生合成研究を行った。

Betaenone A (**2-1**)は、1983年に Ichihara らにより、甜菜(ビート)に感染して蛇眼病を引き起こす植物病原糸状菌 *Phoma betae* PS-13 の培養ろ液より単離された三環性骨格を有するポリケタイド系天然物である。同菌からは、デカリン環を有する betaenone B (**2-2**)<sup>3</sup>、β-ヒドロキシエノン構造を有する betaenone C (**2-3**) を含む類縁体4種が単離されている<sup>4</sup>。本化合物群のうち、最も毒性が強いのは **2-3** であり、構造中に見られるβ-ヒドロキシエノンが毒性に重要であると推定されている<sup>4</sup>。Betaenone 類と同様にデカリン骨格を有する天然物は数多く知られており、その中でも1983年に Barash らによって糸状菌 *Stemphylium botryosum* より単離された stemphyloxin I<sup>5</sup>や、2012年に Sørensen らによって糸状菌 *Fusarium graminearum* より単離された fusarielin F<sup>6</sup>は betaenone 類と非常に類似な構造を有している。

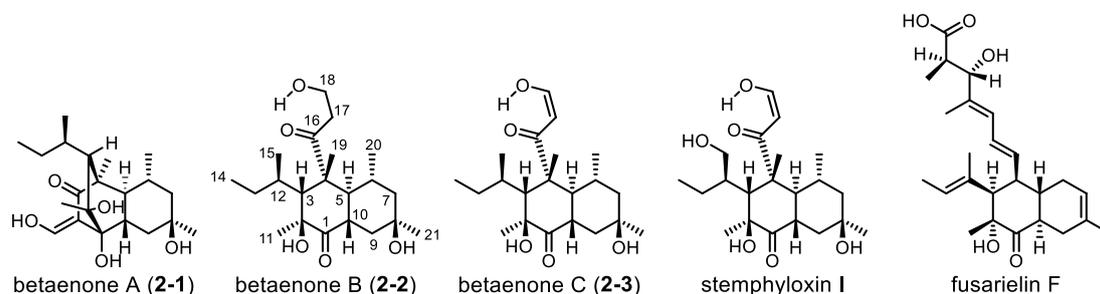


図 2-1-1. betaenone 類縁体および類似化合物

これらの天然物に共通するデカリン骨格の生合成経路を明らかにするため、1984年に Oikawa らは、ポリケタイドの原料となる酢酸、メチオニンを<sup>13</sup>Cで標識し、生産菌である *P. betae* へ投与する実験を行った<sup>7</sup>。単離された **2-2** の<sup>13</sup>C標識パターンから、betaenone 類はアセチル CoA に対して7個のマロニル CoA が Claisen 縮合して炭素数16の主鎖が構築され、さらにメチオニン由来のメチル基が5つ導入されていることが明らかにされた(図 2-1-2)。

また、1988年に行われた<sup>18</sup>Oで標識した酢酸の投与実験において、**2-2**の16位のみが標識されたことから、1位の酸素が酸化酵素によって導入され、その基質が分子状酸素や水であることが示唆された。そこで、酸化酵素P450の阻害剤ancymidol、S-3307Dを投与したところ、**betaenone**類縁体中で最も酸化度の低い新規化合物probetaenone I (**2-4**)が単離されたことから、デカリン環部の生合成にはP450が関与していることが明らかになった<sup>8</sup>。また**2-4**の構造から、**betaenone**類のデカリン骨格は[4+2]環化付加反応によって生成すると予想された。以上より、**betaenone**の生合成経路が推定された(図2-1-3)。このうち、ポリケタイド合成酵素からの還元的な切り出し反応、デカリン骨格の形成に関与する[4+2]環化付加反応、オレフィンからα-ケトールへ変換する多段階酸化反応は、**betaenone**の生合成を理解する上で特に重要である。

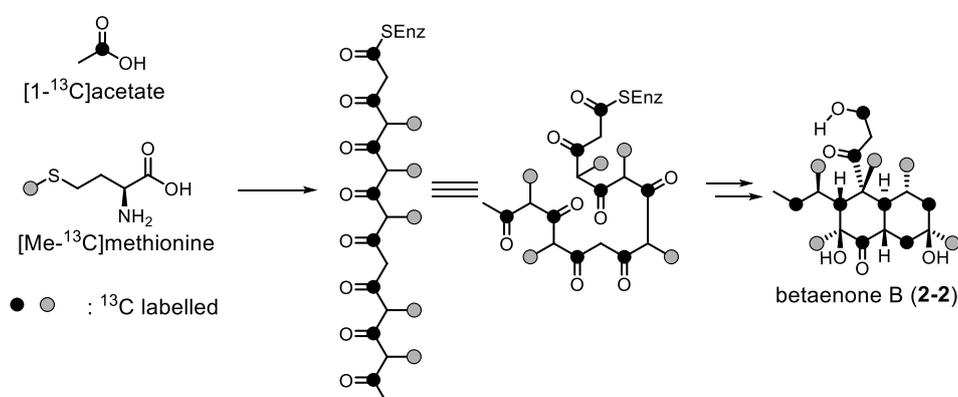


図 2-1-2. 同位体標識実験によるラベルパターン

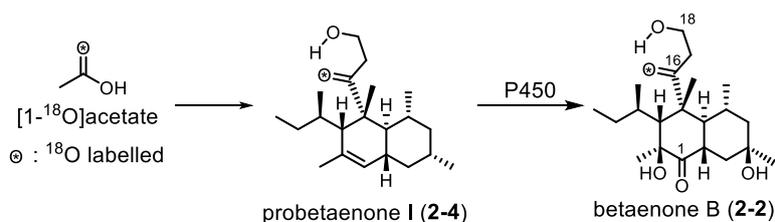


図 2-1-3. P450 阻害剤による実験結果

2章では、興味深い生物活性と特徴的な化学構造をもつ植物毒素 **betaenone** を研究対象として、麴菌異種発現系を用いたポリケタイド系天然物の異種生産を検討した。この過程で、還元ドメインによるポリケタイド鎖の切り出し、デカリン環形成のタイミング、多段階酸化反応を触媒するチトクローム P450 の解析を行ったので報告する。

## 2-2. Betaenone 類の生合成遺伝子クラスターの探索

前節 2-1 で述べたように betaenone 類縁化合物の単離と構造決定、および部分的な生合成経路の解析は終了している。しかし生合成遺伝子は未発見であったため、betaenone 類生産菌である *P. betae* PS-13 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、solanapyrone 生合成に関与する HR-PKS である Sol1<sup>9</sup> を指標とし、Local Blast を行うためのソフトウェア BlastStation (<http://www.blaststation.com/ja/>) を用いて相同性検索を行った。その結果、*sol1* と高い相同性を示す 5 個の HR-PKS を含む遺伝子クラスターが見つかった。各候補遺伝子クラスターに含まれる遺伝子の機能を予測するため、翻訳したアミノ酸配列の保存領域を Pfam で解析する公開ウェブツール 2ndFind (<http://biosyn.nih.gov/2ndfind/>) で解析した。5 個の候補のうち、周辺に P450 酸化酵素遺伝子が存在した候補を絞り込むことで、*bet* クラスターを発見した (図 2-2-1)。以後、同定したクラスターに含まれる PKS 遺伝子を *bet1*、trans ER 遺伝子を *bet3*、P450 酸化酵素遺伝子を *bet2*、酸化還元酵素遺伝子を *bet4* と呼称する。相同性から予想された酵素機能から、*bet4* から *bet1* をクラスターとした。

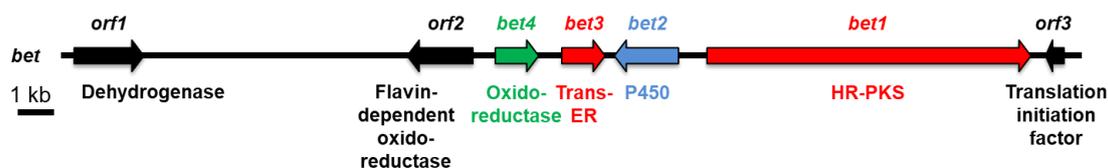


図 2-2-1. *bet* クラスター

各遺伝子の推定される機能を図 2-2-2 にまとめた。*bet* クラスターには HR-PKS 遺伝子である *bet1* のほかに、Lovastatin や PKS-NRPS の生合成に見られる trans-ER 酵素と相同性を示す *bet3* が存在したことから、Bet1 と Bet3 が共同で機能することで直鎖アルデヒドを合成し、[4+2]環化付加反応が進行して予想生合成中間体 dehydroprobetaenone I (2-5) を生成すると考えられた。さらに P450 阻害剤の投与実験の際に 2-5 の 17,18 位還元体が蓄積したことから、P450 酸化酵素 Bet2 がデカリン骨格の多段階酸化反応を触媒すると予想した。

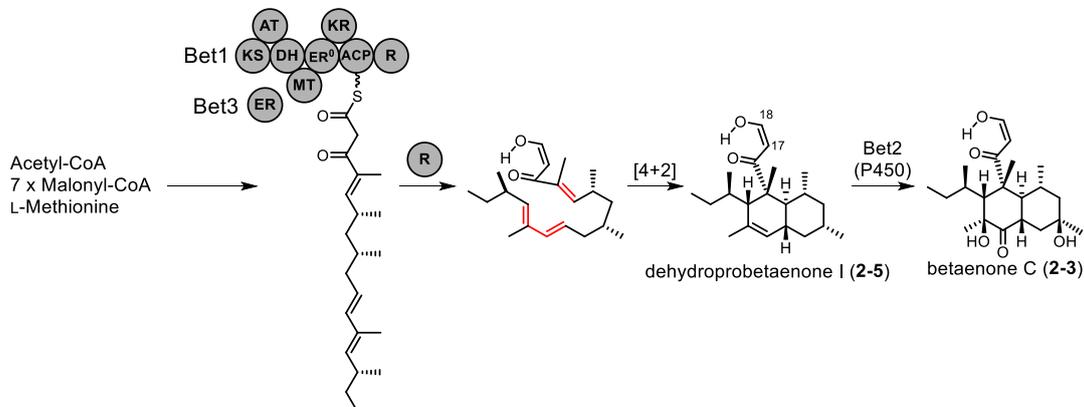


図 2-2-2. betaenone 生合成遺伝子の予想機能順序

## 2-3. 麹菌異種発現系を用いた *bet* 遺伝子クラスターの機能解析

前節 2-2 で特定した *bet* 遺伝子クラスターを麹菌で発現し、*in vivo* で機能解析を行った。推定基本骨格 **2-5** の生産に関与すると予想された PKS である *bet1* と、trans ER である *bet3* を麹菌発現用ベクター pUARA2 (*argB*) と pUSA2 (*sC*) の、でんぷんやマルトースで誘導するプロモーター *PamyB* 制御下にそれぞれ導入した。続く修飾反応を触媒すると予想された P450 酸化酵素遺伝子である *bet2* と、酸化還元酵素遺伝子 *bet4* は、別々に pAdeA2 (*adeA*) へ導入した。構築したプラスミドをプロトプラスト-PEG 法にて麹菌に導入し、形質転換体 *Aspergillus oryzae-bet1* (AO-*bet1*, 形質転換体は以下同様に記載する), AO-*bet13*, AO-*bet132*, AO-*bet134* を得た。

### 2-3-1. AO-*bet1*, AO-*bet13* からの代謝産物の抽出

得られた形質転換体 AO-*bet1*, AO-*bet13* を、*PamyB* 誘導培地である MPY 培地 (液体)、米培地 (固体) で培養し、代謝産物を抽出し解析した。まず MPY 培地から代謝産物を抽出し TLC で解析したが、新規代謝産物は得られなかった。一方、米培地で培養し得られた粗抽出物を LC-MS で解析したところ、AO-*bet13* でのみ野生株には見られない新たなピークが確認された (図 2-3-1)。この結果を受け、以降の培養は全て米培地で行った。**2-5** を単離し、HR-MS 分析より分子式を  $C_{21}H_{34}O_2$  と決定した。 $^1H$ -NMR において、3 つのメチル基に相当するダブレットシグナル ( $\delta_H$  0.86 x 2, 0.99) と 1 つのメチル基に相当するトリプレットシグナル ( $\delta_H$  0.92)、1 つのアリル位のメチル基に相当するシングレットシグナル ( $\delta_H$  1.68) に加えて、1H 分のオレフィンプロトンに相当するマルチプレットシグナル ( $\delta_H$  5.19) が観測されたことから、直鎖ポリケタイドではなく環化体であることが示唆された。加えて、水素結合により低磁場シフトした 1H 分のブロードダブレットシグナル ( $\delta_H$  15.85)、1H 分のオレフィンプロトンに相当するダブレットとマルチプレットのシグナルが、それぞれ 1 つずつ ( $\delta_H$  7.39, 5.41) 観測されたことから、Bet1 に連結したポリケタイド鎖が還元的な切り出しを受けてアルデヒドとして放出されたことがわかった (図 2-3-2)。以上の結果から、新規代謝産物は betaenone 予想生合成中間体 **2-5** であると推測された。これは、**2-5** を  $NaBH_4$  で還元したところ、2 つのカルボニル基 16 位、18 位のうち、18 位のみが還元されることで probetaenone I (**2-4**) が生成したことから支持された (図 2-3-4)。この還元反応については、後の項で考察する。

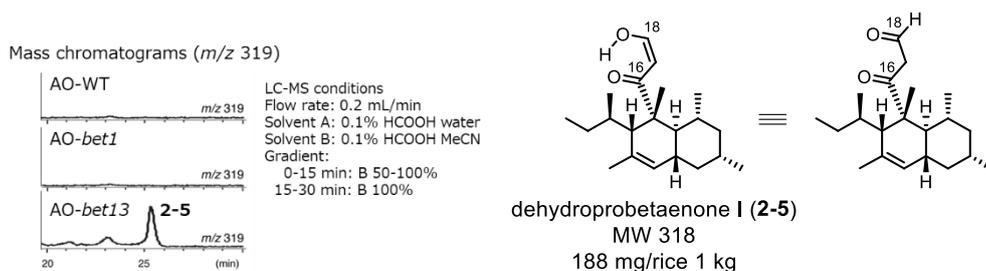
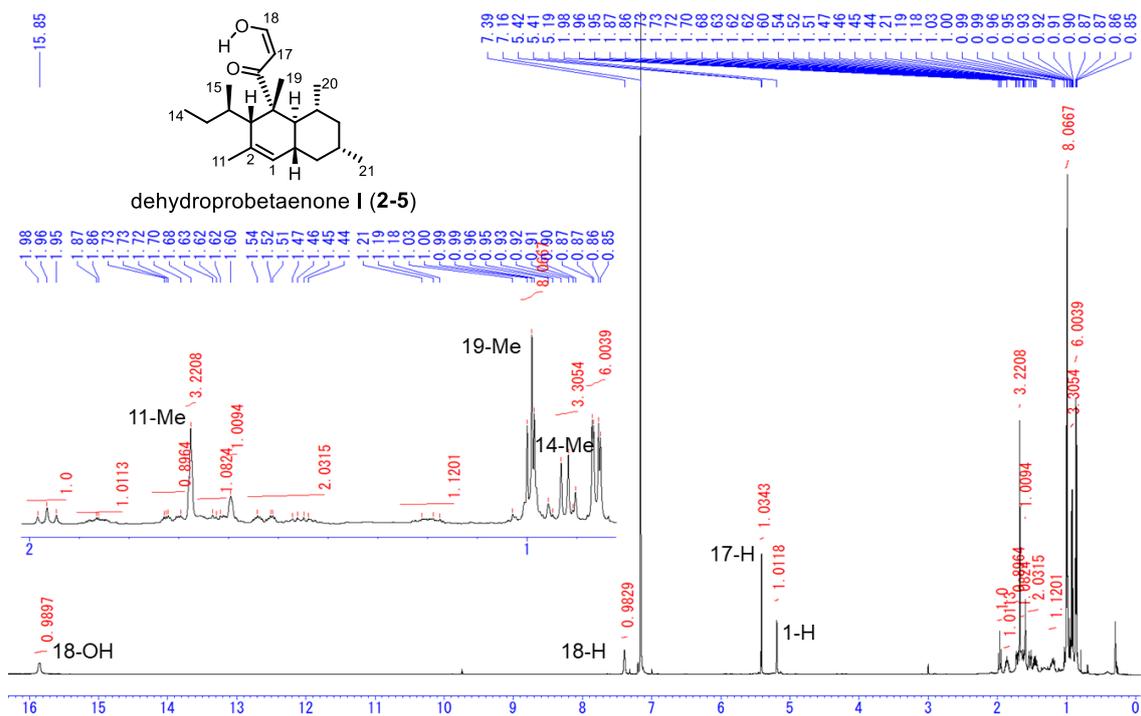
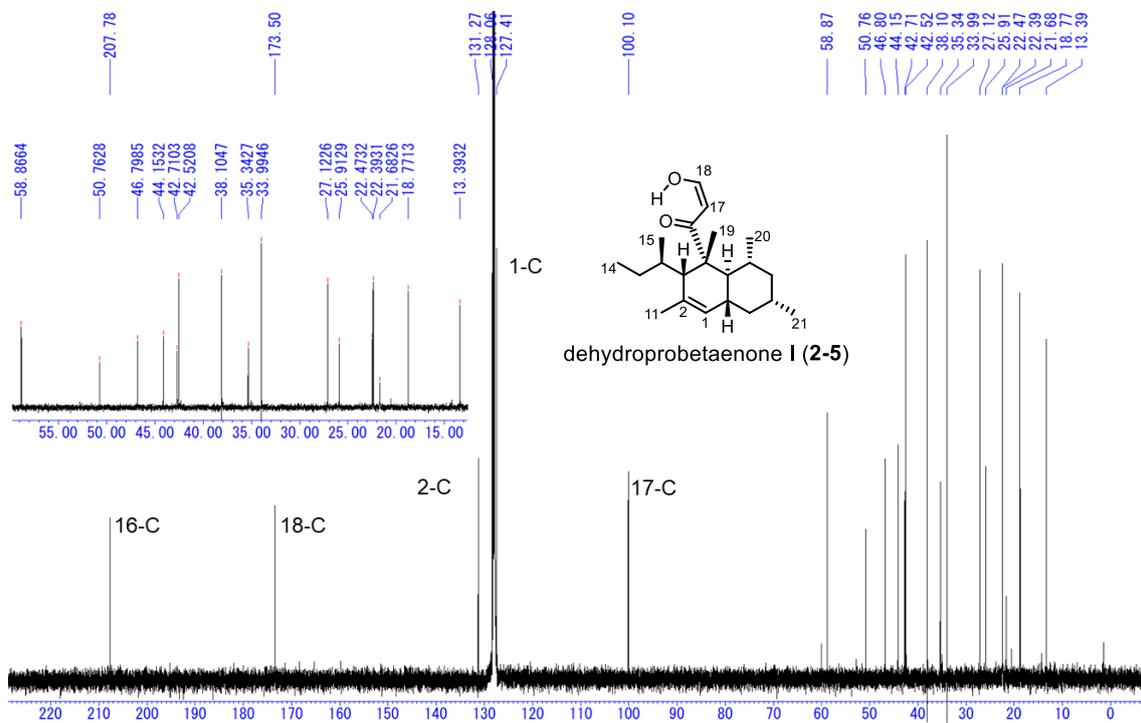


図 2-3-1. AO-*bet1*, AO-*bet13* より得られた代謝産物の解析



☒ 2-3-2. Dehydroprobetaenone I (2-5) の <sup>1</sup>H-NMR spectrum (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)



☒ 2-3-3. Dehydroprobetaenone I (2-5) の <sup>13</sup>C-NMR spectrum (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)

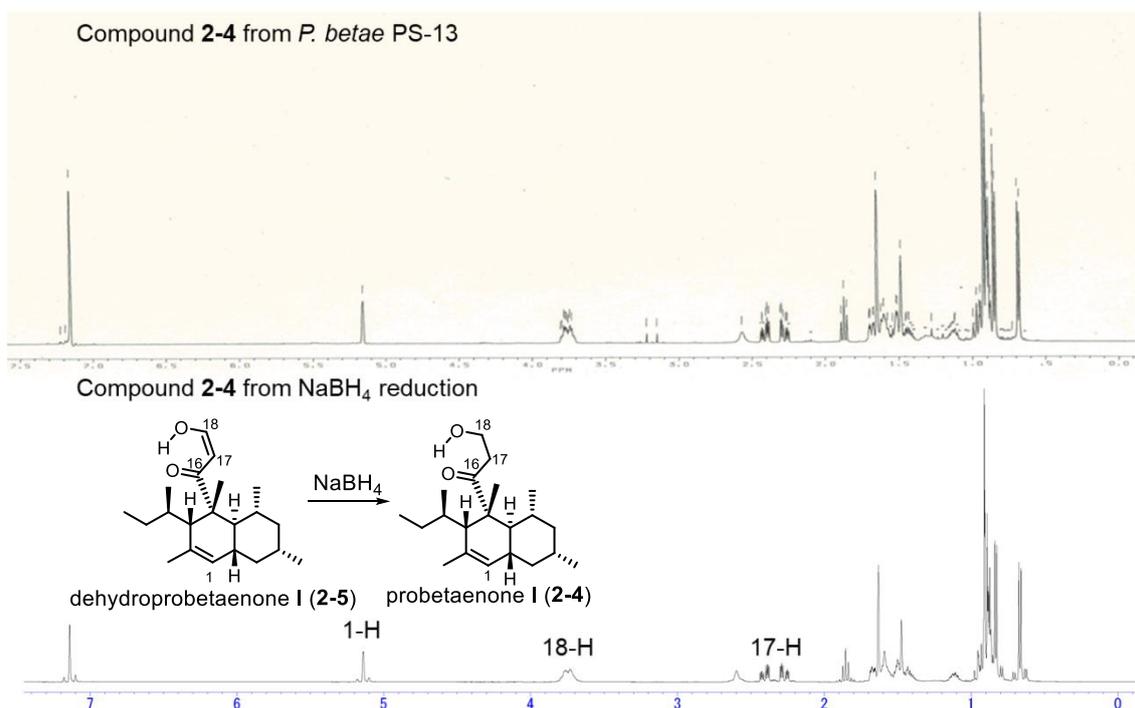


図 2-3-4. **2-4** の  $^1\text{H-NMR}$  比較 (in  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz) スペクトル  
(上段: *P. betae* からの抽出物, 下段: **2-5** の還元生成物)

### 2-3-2. AO-bet134 からの代謝産物の抽出

**2-5** 生産株である AO-bet13 に対し、酸化還元酵素遺伝子 *bet4* を追加で導入し、AO-bet134 を調製した。Bet4 は典型的な Short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) であり、**2-5** の  $\beta$ -ヒドロキシエノン還元すると予想された。AO-bet134 の代謝産物を抽出し LC-MS 解析を行うと、野生株で見られなかった新たなピークが見られた (**2-4**, 保持時間 20 min, 図 2-3-5)。本ピークを精製し、HR-MS から分子式を  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_2$  と決定した。**2-4** が純度よく含まれる画分の  $^1\text{H-NMR}$  を測定し、先に合成した **2-4** のスペクトルと一致したことから、Bet4 が  $\beta$ -ヒドロキシエノンの還元反応を触媒することが明らかになった。

**2-4** の生産量を計算するため、**2-4** を純度よく含む画分に内部標準物質として *p*-nitrobenzonitrile を添加し、 $^1\text{H-NMR}$  の積分値から生産量を見積もった結果、 $^1\text{H-NMR}$  の積分値の比較から probetaenone I (**2-4**) は 6.96 mg (M.W. 320.2715; 21.7  $\mu\text{mol}$ ) 含まれており、17.4 mg/kg (solid medium) と見積もった (図 2-3-6)。

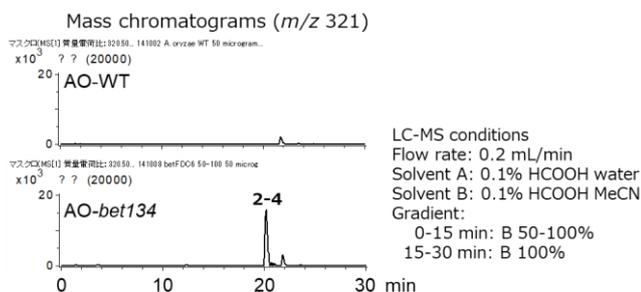


図 2-3-5. AO-bet134 の代謝産物解析

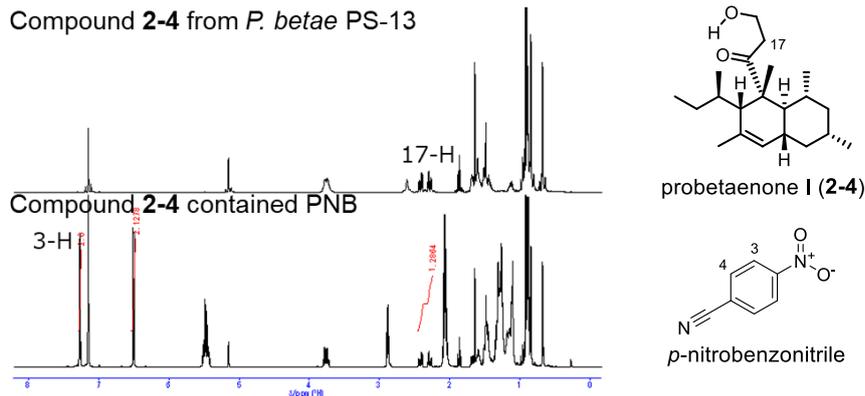


図 2-3-6. **2-4** の  $^1\text{H-NMR}$  からの生産量見積もり (in  $\text{C}_6\text{D}_6$ , 500 MHz)

### 2-3-3. AO-*bet132* からの代謝産物の抽出

次に、P450 酸化酵素 **Bet2** の機能解析を行った。前節 2-1 で述べたように、先行研究において **betaenone** 類の酸化修飾には P450 酸化酵素が関与していると報告されていたため<sup>8</sup>、P450 酸化酵素 **Bet2** が多段階化反応を触媒し、生合成中間体 **2-5** を **betaenone C (2-3)** へ変換すると予想した (図 2-3-7)。

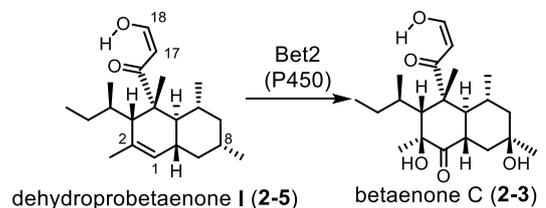


図 2-3-7. **Bet2** による予想反応

**2-5** を生産する AO-*bet13* に対し *bet2* を追加導入して AO-*bet132* を調製した。得られた形質転換体の代謝産物を LC-MS で解析したところ、AO-*bet13* にはみられない新たなピークが観測され、HR-MS 分析からその分子式を  $\text{C}_{21}\text{H}_{36}\text{O}_5$  と決定した (図 2-3-8)。 $^1\text{H-NMR}$  測定の結果、**2-4** や **2-5** で観測されたデカリン環部のオレフィンプロトンに相当するシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  5.19) が消失していたことから、オレフィン部位での酸化修飾が進行していると考えられた。また、**2-5** で観測されていたオレフィンプロトンに相当するシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  7.39, 5.41) も消失していたことから、 $\beta$ -ヒドロキシエノンが還元されていることもわかった。この結果を受けて関連化合物のスペクトルと比較したところ、天然物である **betaenone B (2-2)** と良い一致を示した (図 2-3-9)。

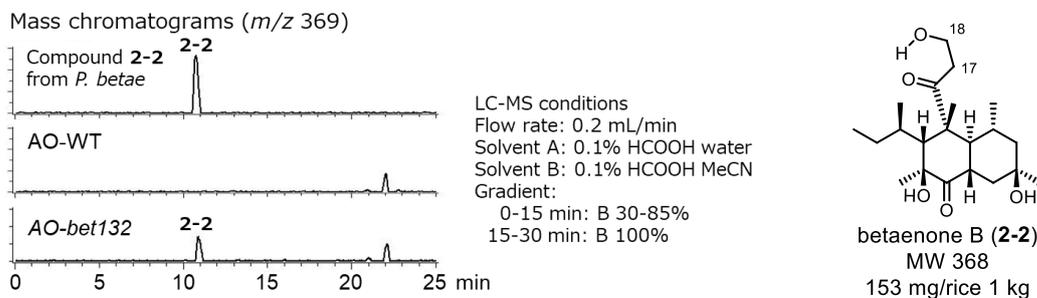


図 2-3-8. AO-*bet132* の代謝産物解析

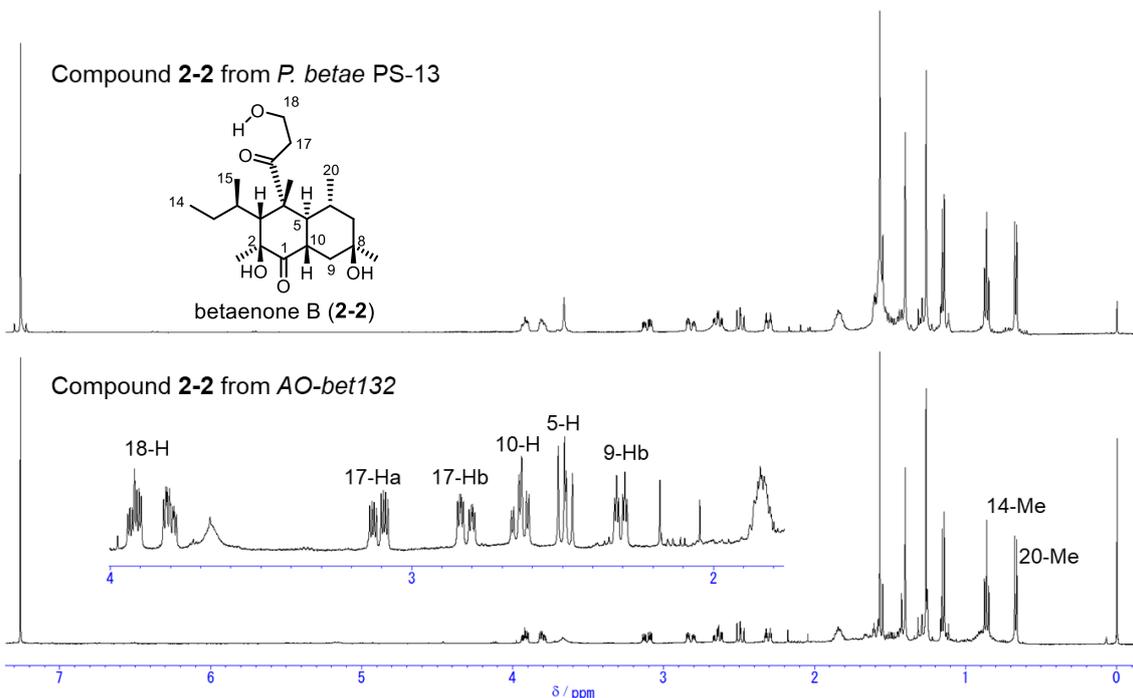


図 2-3-9. AO-bet132 由来の **2-2** (下段) と *P. betae* 由来標品 (上段) の  $^1\text{H-NMR}$  比較 (in  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

このことから、Bet2 がデカリン骨格上の 1 位、2 位、8 位という遠隔位を、多段階で酸化修飾する酸化酵素であることがわかった。同様に遠隔位を酸化する P450 酸化酵素は以前にも報告されており、ジテルペン aphidicolin の生合成において、PbP450-2 が基質である aphidicolan-16 $\beta$ -ol の 18 位を酸化した後、対象線上に存在する 17 位も水酸化する反応を触媒する (図 2-3-10)<sup>10</sup>。

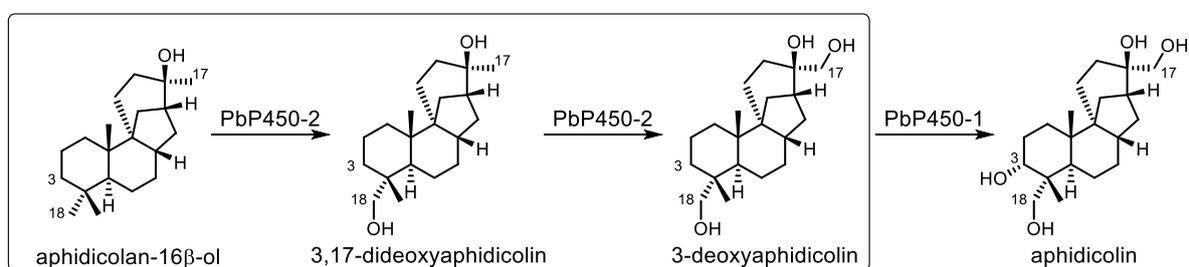


図 2-3-10. 同一酵素が遠隔位を連続で酸化する例

また、多段階の酸化反応を触媒する例としては、糸状菌 *Aspergillus fumigatus* 由来メロテルペノイド **fumagillin** の生合成に関与する **Fma-P450** が知られており、環骨格の転位を伴う数段階の反応を触媒する (図 2-3-11)<sup>11</sup>。

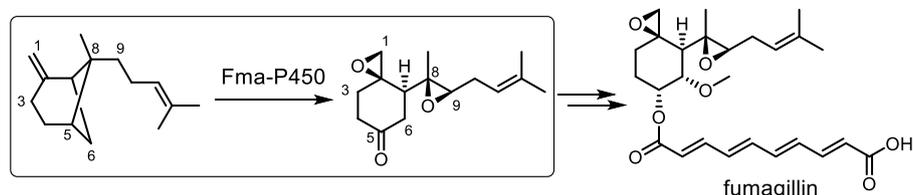


図 2-3-11. 同一 P450 酸化酵素が連続で参加する例

また、前項 2-3-2 で機能を解析した還元酵素 **Bet4** を導入していないにもかかわらず、 $\beta$ -ヒドロキシエノンが還元されていたことから、麹菌由来の還元酵素が **Bet2** の生成物である **2-3** を還元したと考えられる (図 2-3-12)。

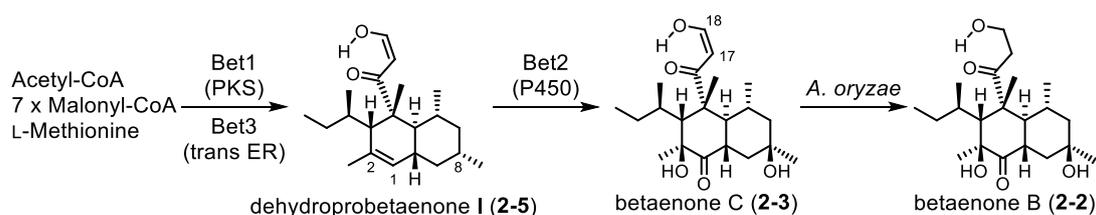


図 2-3-12. 麹菌由来の還元酵素による過還元

前節 2-1 で示した **betaenone** 構造類縁体である **fusarielin** は、その生合成遺伝子中に HR-PKS である **FSL1** と trans-ER である **FSL5** に加えて P450 酸化酵素遺伝子 **FSL4** を有する。2016年に Droce らは **FSL** 遺伝子クラスターを活性化した糸状菌 *F. graminearum* における **FSL4** 遺伝子破壊実験から、**fusarielin** 類の推定生合成中間体 **prefusarielin** を単離した<sup>12</sup>。1995年には Kobayashi らによって糸状菌 *Fusarium* sp. から 11,12 位が酸化されエポキシドに変換された化合物 **fusarielin C**<sup>13</sup> が単離されているほか、2012年に Sørensen らによって糸状菌 *F. graminearum* より、15,16 位の  $sp^2$  炭素が酸化されてエポキシド構造へ変換された **fusarielin G** や **betaenone B** と同様に  $\alpha$ -ケトール構造を有する **fusarielin F** が単離されている<sup>6</sup>。これら **fusarielin** 類縁体の構造を考慮し、**FSL4** による酸化反応の順番を推定した。本項 2-3-3 において多段階酸化反応を触媒することが明らかになった **Bet2** は **FSL4** と 42% の相同性を示すことから、類似の機構で反応が進行すると仮定すると、**betaenone** における酸化修飾の順番は図 2-3-13 のようになる。まず、8 位炭素が立体選択的に水酸化され、次いで、デカリン部のオレフィンがエポキシ化された後に

酸化的な開裂が進行して $\alpha$ -ケトール構造を形成すると推定した (図 2-3-13)。 $\alpha$ -ケトール構造の構築は、植物においてアレンオキシドの加水分解によって生成されることが知られているが<sup>14</sup>、Bet2 ホモログは単独の P450 酸化酵素による多段階の酸化反応によって $\alpha$ -ケトール構造を形成することがわかった。

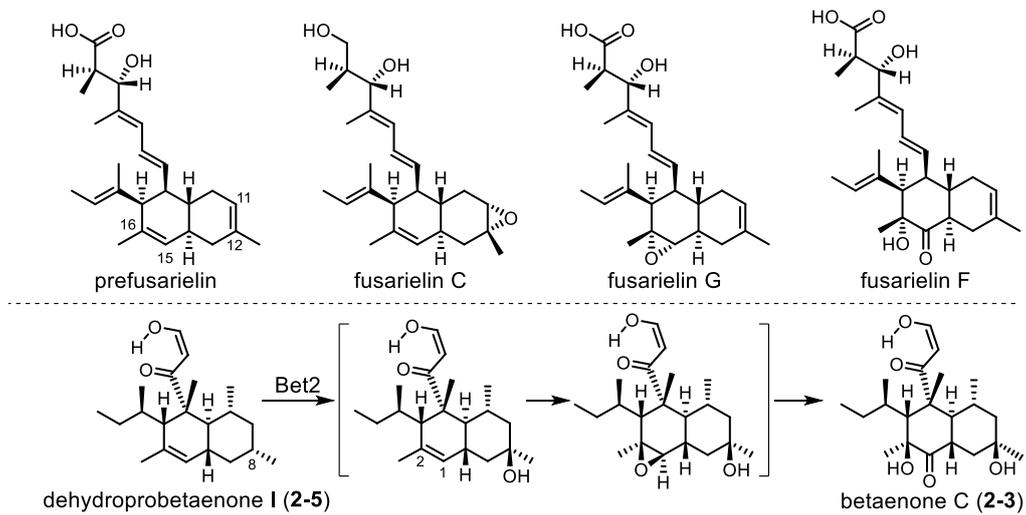


図 2-3-13. Bet2 の予想酸化順序

## 2-4. デカリン骨格の形成

骨格構築酵素遺伝子のみを導入した *AO-bet13* が直鎖ポリケタイドではなくデカリン骨格を持つ **2-5** を生産したことから、ジエンとジエノフィルをもつ前駆体から非酵素的な [4+2]環化付加反応が進行したと考えられる。この条件を満たす中間体は、ポリケタイド鎖構築過程で生じる中間体 **II-1** と **II-3**、ポリケタイド合成酵素から切り出された **II-4** の 3 種類が考えられる。それぞれの推定経路を pathway 1-3 と命名した。Pathway1 と 3 は lovastatin と類似した経路であり<sup>15</sup>、pathway 2は solanapyrone と類似の経路である<sup>9</sup> (図 2-4-1, 2-4-2)。

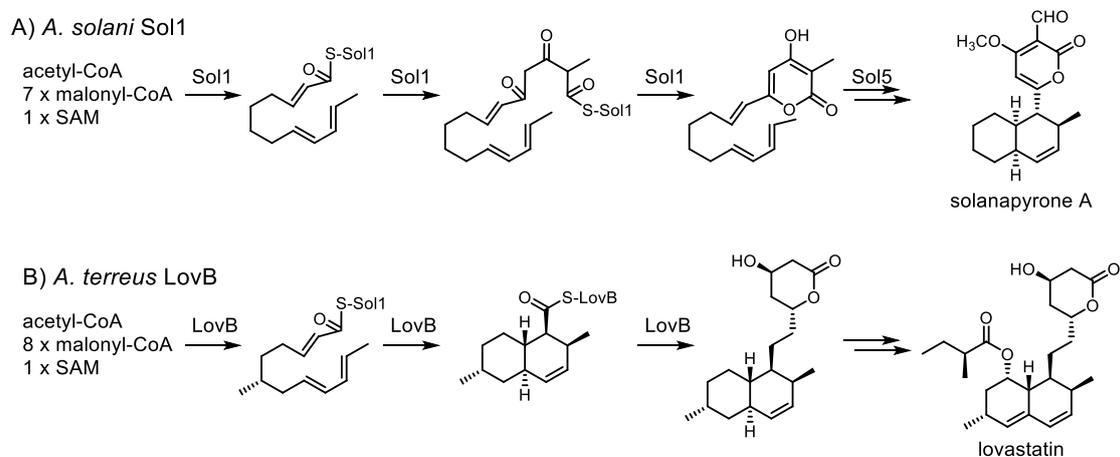


図 2-4-1. Solanapyrone と lovastatin におけるデカリン骨格形成

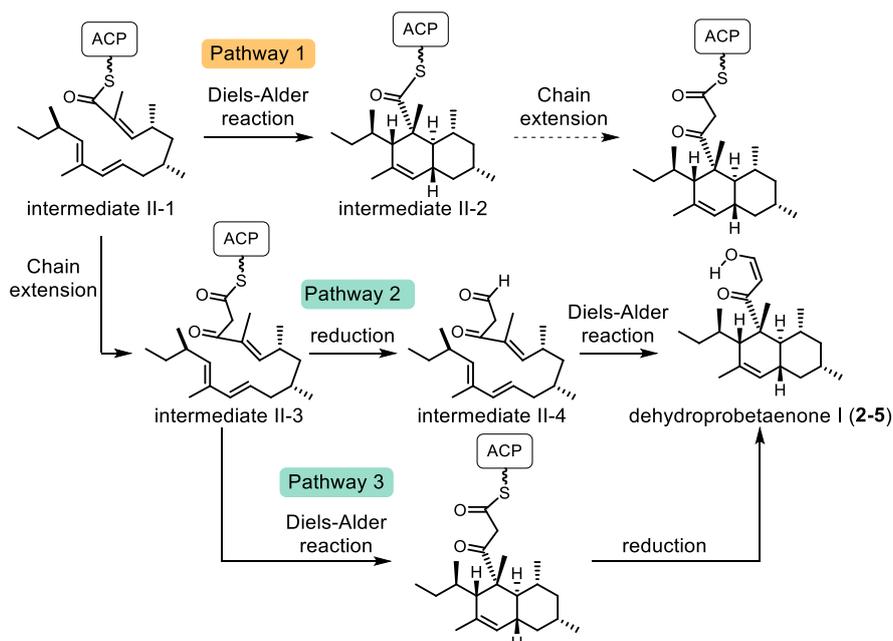


図 2-4-2. Diels-Alder 環化反応のタイミング

想定した pathway 1-3 の相違点は、Pathway 1 ではデカリン環形成後にポリケタイド鎖の伸長反応が進行するのに対して、Pathway 2, 3 ではポリケタイド鎖が伸長された後に環形成が進行することにある。両者を区別する上では、**2-5** に対する還元剤の反応性が重要な知見を与えた。**2-5** は、その構造中に  $\text{NaBH}_4$  との反応点が 2 つ (16 位、18 位のカルボニル基) 存在するため、通常は両者が還元されたジオールが生成すると予想される。しかし実際に本反応を行うと、16 位のケトンが未反応のまま **2-4** へ変換されている (図 2-4-3)。このことから、「16 位のケトンは 15、19、20 位のメチル基によって立体的に遮蔽されており、ヒドリドが接近できないほど混みあった環境ではないか」と予想された。実際にマクロモデル (SCHRÖDINGER) による最安定配座の計算を行うと、16 位カルボニル基の周辺はメチル基によって遮蔽された配座が最安定構造であることがわかった (図 2-4-4)。以上の結果から、16 位カルボニル基はヒドリドすら接近できないほど混みあった環境にあり、図 2-4-2 の Pathway 1 で示した、デカリン環形成後に 16 位カルボニル上での Claisen 縮合は進行しにくいと予想された。そのため、Pathway 2 か 3 を経てデカリン環が形成されると考えられる。さらに、2016 年に Zheng らによって Diels-Alderase である PyrI4 の X 線結晶構造が得られている。本酵素の活性部位の構造から、水素結合性の水素がルイス酸として作用し、ジエノフィルと共役したカルボニル基の LUMO エネルギーを低下させ、[4+2]環化付加反応を加速すると推定している<sup>16</sup>。よって、図 2-4-1

において Pathway 2 で示したように、ポリケタイド鎖が直鎖アルデヒドとして切り出された後、 $\beta$ -ヒドロキシエノンへの互変異性によって、ジエノフィルの LUMO エネルギーの低下が駆動力となり [4+2]環化付加が進行すると推定される。

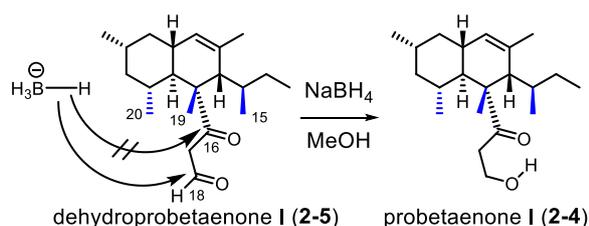


図 2-4-3. 化合物 **2-5** の  $\text{NaBH}_4$  還元

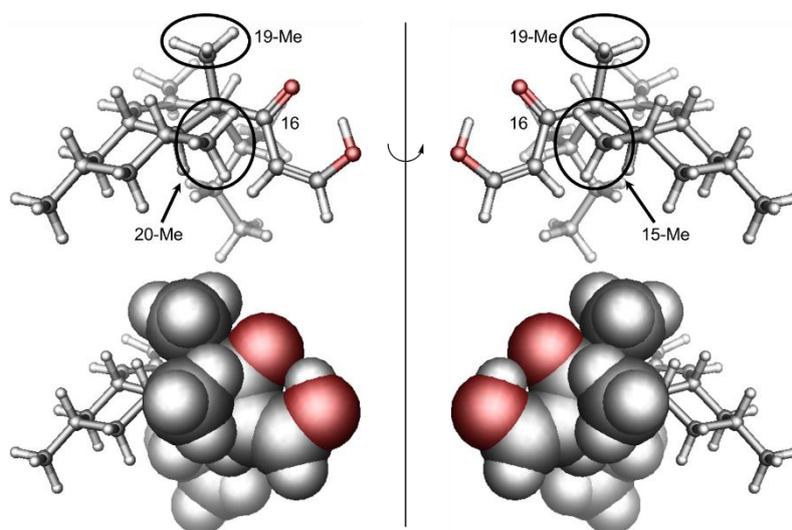


図 2-4-4. dehydroprobetaenone I (**2-5**) のマクロモデルによる最安定配座

## 2-5. R ドメインの機能解析

次に、ポリケタイド鎖の切り出しに重要な役割を担っている **Bet1** の R ドメインについて機能解析した。R ドメインは前節 2-3-2 で述べた **Bet4** と同様に、SDR と相同性を有している。一般に SDR は、その活性中心に Ser, Tyr, Lys からなる触媒三残基を有している。この三残基は、基質や NAD(P)H とのヒドリド授受を行うネットワークを形成しており、活性に重要である (図 2-5-1)<sup>17</sup>。

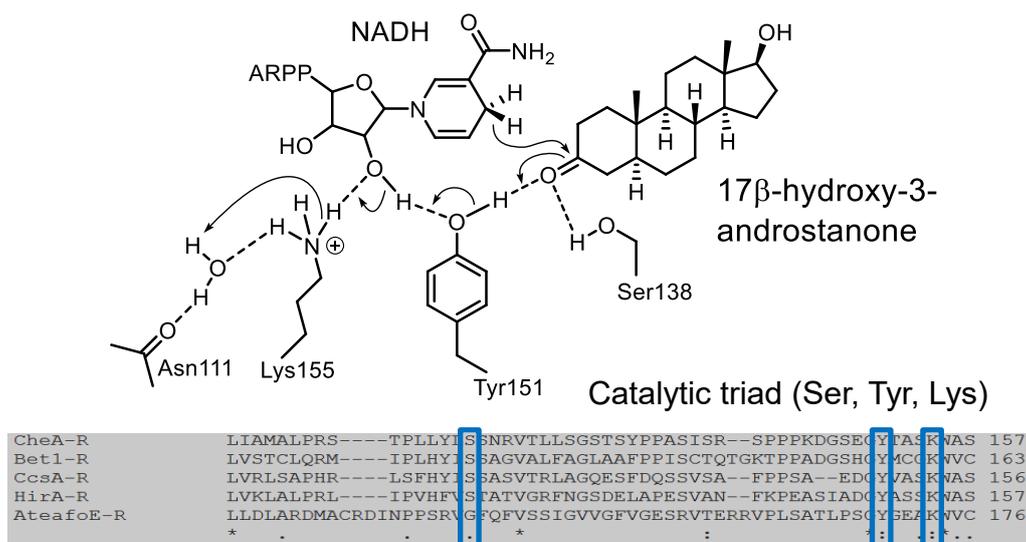


図 2-5-1. R ドメインの触媒三残基

これらの触媒残基は、**Bet1** の R ドメインでも S2705、Y2737、K2741 として保存されていた。そこで各残基の役割を明らかにするために、3 種の Ala 変異体 (**AO-bet31**<sub>S2705A</sub>, **AO-bet31**<sub>Y2737F</sub>, **AO-bet31**<sub>K2741A</sub>) を作成した。仮に、これらの残基が還元反応に関与しているならば、**AO-bet13** で生成した **2-5** が得られないことが予想される。

各変異導入株の代謝産物を LC-MS で解析したところ、予想通り化合物 **2-5** は検出されなかったことから、ポリケタイド鎖の切り出しには R ドメインが重要であることを確認した。また、切り出しを受けていないポリケタイド鎖の構造を確認できれば、**pathway 2** と **3** を区別して [4+2] 環化付加反応のタイミングを明らかにすることができるはずである。2009 年に Ma らは、Lovastatin の主鎖を生成する HR-PKS である LovB の *in vitro* 解析を行い、ACP に結合したポリケタイド鎖を、塩基処理によって人工的に切り出すことでポリケタイドの検出に成功している (図 2-5-2)<sup>18</sup>。先例に倣って **Bet1** に結合したポリケタイド鎖の塩基性条件による切り出しを試みたが、遊離ポリケタイドは観測できなかった。

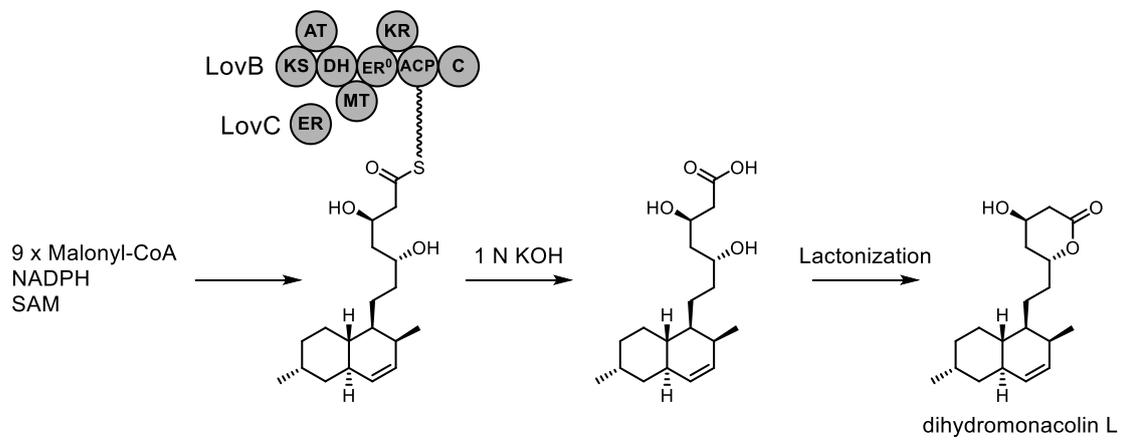


図 2-5-2. LovB に対する塩基処理

## 2-6. 考察

2-5 のようなポリケタイド鎖が適度に還元された化合物を合成する HR-PKS は、通常、ポリケタイド合成酵素のドメインとして存在する cis-ER が還元反応を触媒する。一方、PKS-NRPS 配列中の cis-ER は活性を失っており ( $ER^0$ )、その機能を補完するため trans-ER が PKS-NRPS と相互作用するという違いがある。

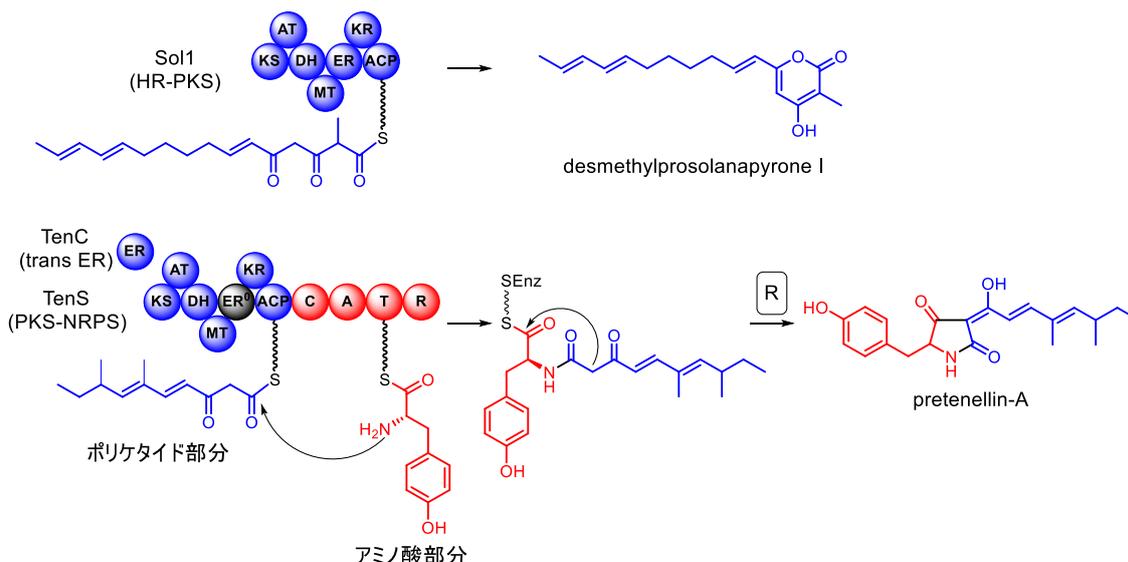


図 2-6-1. 活性を保持した cis-ER, 失活した cis-ER ( $ER^0$ ) と trans-ER

本研究で注目した Bet1 は HR-PKS であるにもかかわらず cis-ER の機能が失われており、その機能を補完する trans-ER (Bet3) を必要とする点は興味深い。類似の例としては、lovastatin の生合成に関与する HR-PKS である LovB と trans-ER である LovC が知られている。2012 年に Ames らは、LovC について X 線結晶構造解析を行い、加えて LovC と相同性の高い Medium-chain dehydrogenase/reductase (MDR) タンパク質群とアミノ酸配列の比較を行った (図 2-6-2)<sup>19</sup>。その結果、trans-ER である LovC には通常の MDR には存在しない 2 つの部分配列 xL1, xL2 が存在することがわかり、この 2 つの配列が HR-PKS である LovB との相互作用に影響を与えていると推測された。以上を踏まえ、機能を保持した、または失った cis-ER と trans-ER の相違点を明らかにするため、8 個の trans-ER ドメインと、22 個の

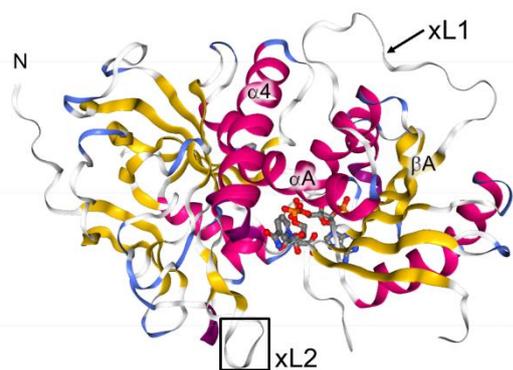


図 2-6-2. LovC の X 線結晶構像 (PDB ID: 3B70)

cis-ER ドメインについて分子系統解析を行った。その結果、配列 xL1 は trans-ER にのみ存在しており、配列 xL2 は機能を保持した trans-,cis-ER にのみ存在することがわかった。この解析結果から、配列 xL1 は trans-ER と PKS が相互作用する際に必要な領域であり、配列 xL2 は活性に重要な領域であるという仮説が立てられる。以上の仮説が正しければ、活性を保持した cis-ER、活性を失った cis-ER (ER<sup>0</sup>) はアミノ酸配列から容易に見分けることが可能になる (図 2-6-3)。例として、この知見を基に fusarielin 生合成遺伝子クラスターに存在する FSL1 (HR-PKS) の cis-ER と FSL5 (trans-ER) を解析すると、cis-ER は不活性、trans-ER は活性を示すクレードに分類された。これより、fusarielin 基本骨格の生合成にも trans-ER が必須であると推測できる。

Bet1 や LovB のドメイン構成を確認すると、通常の PKS のドメイン (KS, AT, DH, ER, KR, ACP) だけではなく、Bet1 は R ドメイン、LovB は C ドメインを有している。これらは通常、PKS-NRPS に存在するドメインである上に、Bet1 と LovB の cis-ER は PKS-NRPS と同じクレードに属していることから、Bet1 と LovB の進化的な先祖は PKS-NRPS であり、NRPS を構成するドメインが抜け落ちる進化をしてきたことが示唆されるが、今後はバイオインフォマティクスの解析を行う必要がある。

	Trans-ER	Active cis-ER	inactive cis-ER
F515	VGAFAQVGAFTDITLTKVPSM--IYEDAAATLG-SGVG-TIGL-----ALPRG--LDVPG--	VGAFAQVGAFTDITLTKVPSM--IYEDAAATLG-SGVG-TIGL-----ALPRG--LDVPG--	VGAFAQVGAFTDITLTKVPSM--IYEDAAATLG-SGVG-TIGL-----ALPRG--LDVPG--
E6K6	VGAFAVTAAVEMILLIKRIPSL--SFOEGASLIG-ISEN-TTGG-----ALFRS--LGRPG--	VGAFAVTAAVEMILLIKRIPSL--SFOEGASLIG-ISEN-TTGG-----ALFRS--LGRPG--	VGAFAVTAAVEMILLIKRIPSL--SFOEGASLIG-ISEN-TTGG-----ALFRS--LGRPG--
C6C6	SGSRPFIYASBAEFLTKRIPDSM--SFEBAALIGGLA-TLGM-----ALFRY--LELPG--	SGSRPFIYASBAEFLTKRIPDSM--SFEBAALIGGLA-TLGM-----ALFRY--LELPG--	SGSRPFIYASBAEFLTKRIPDSM--SFEBAALIGGLA-TLGM-----ALFRY--LELPG--
LovC	QGFQSVYVTRGVWMAKLEPKL--SFEQAAALP-AGIS-TDGL-----AMK-L--LGLPL--	QGFQSVYVTRGVWMAKLEPKL--SFEQAAALP-AGIS-TDGL-----AMK-L--LGLPL--	QGFQSVYVTRGVWMAKLEPKL--SFEQAAALP-AGIS-TDGL-----AMK-L--LGLPL--
Ch6B	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--
AbdC	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--
DmbC	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--	NGAFAYVAAPAVLAVVPPMM--PYQAAALIG-VGLA-TVGL-----ALVOR--MRUKT--
Bet3	NGAFAYVAADSHLQIPDAI--SNIQAAALIGMG-TDAL-----AMSDPTALNPLG--	NGAFAYVAADSHLQIPDAI--SNIQAAALIGMG-TDAL-----AMSDPTALNPLG--	NGAFAYVAADSHLQIPDAI--SNIQAAALIGMG-TDAL-----AMSDPTALNPLG--
LovF	GHMASRYTSTRNVTIRLEPL--SFEPAASIP-LAFT-TRAY-----SIVYVARIL--	GHMASRYTSTRNVTIRLEPL--SFEPAASIP-LAFT-TRAY-----SIVYVARIL--	GHMASRYTSTRNVTIRLEPL--SFEPAASIP-LAFT-TRAY-----SIVYVARIL--
Az4B	-GHMTRPRAPTMSVVRIDPL--SFEPAASIP-TVFA-TRAY-----ALHEFARIQ--	-GHMTRPRAPTMSVVRIDPL--SFEPAASIP-TVFA-TRAY-----ALHEFARIQ--	-GHMTRPRAPTMSVVRIDPL--SFEPAASIP-TVFA-TRAY-----ALHEFARIQ--
Ca2F	-GPFSSRRITMGVYINNPQOM--SFEPAASIP-MIPT-TRAY-----ALVQVARLR--	-GPFSSRRITMGVYINNPQOM--SFEPAASIP-MIPT-TRAY-----ALVQVARLR--	-GPFSSRRITMGVYINNPQOM--SFEPAASIP-MIPT-TRAY-----ALVQVARLR--
A6cG	-GPFSSRRARVSHMGVYASPRAGM--GEPAASIP-MIPT-TRAY-----ALVQVARLR--	-GPFSSRRARVSHMGVYASPRAGM--GEPAASIP-MIPT-TRAY-----ALVQVARLR--	-GPFSSRRARVSHMGVYASPRAGM--GEPAASIP-MIPT-TRAY-----ALVQVARLR--
R4d5	GGHTRARVRCQYVWMAKLEPKM--SFEBAAGIP-VHC-TRAY-----ALVKLAKLR--	GGHTRARVRCQYVWMAKLEPKM--SFEBAAGIP-VHC-TRAY-----ALVKLAKLR--	GGHTRARVRCQYVWMAKLEPKM--SFEBAAGIP-VHC-TRAY-----ALVKLAKLR--
Hpm8	-GHMTRARVRCQYVWMAKLEPKM--SFEBAAGIP-VHC-TRAY-----ALVKLAKLR--	-GHMTRARVRCQYVWMAKLEPKM--SFEBAAGIP-VHC-TRAY-----ALVKLAKLR--	-GHMTRARVRCQYVWMAKLEPKM--SFEBAAGIP-VHC-TRAY-----ALVKLAKLR--
PKSN	-DPTATYRPPAKGAIQVPTM--SFEBAASMP-LIFL-TRAY-----ALVYTKAKR--	-DPTATYRPPAKGAIQVPTM--SFEBAASMP-LIFL-TRAY-----ALVYTKAKR--	-DPTATYRPPAKGAIQVPTM--SFEBAASMP-LIFL-TRAY-----ALVYTKAKR--
BasB	-RSYNYVILVGGCCOVPDLSL--SFAEGASLIG-TVMA-TVYV-----GLVYDGLSIS--	-RSYNYVILVGGCCOVPDLSL--SFAEGASLIG-TVMA-TVYV-----GLVYDGLSIS--	-RSYNYVILVGGCCOVPDLSL--SFAEGASLIG-TVMA-TVYV-----GLVYDGLSIS--
Fum1P	-NCFSTOITTSAGRCQAKIPSOI--AFEDAAATMP-CVYA-TVYH-----SILLDGGGR--	-NCFSTOITTSAGRCQAKIPSOI--AFEDAAATMP-CVYA-TVYH-----SILLDGGGR--	-NCFSTOITTSAGRCQAKIPSOI--AFEDAAATMP-CVYA-TVYH-----SILLDGGGR--
Sol1	-GHFNRYTRAPANFARMLPGE--DVTVMATIP-LVGM-TRAY-----SFEQVYQIK--	-GHFNRYTRAPANFARMLPGE--DVTVMATIP-LVGM-TRAY-----SFEQVYQIK--	-GHFNRYTRAPANFARMLPGE--DVTVMATIP-LVGM-TRAY-----SFEQVYQIK--
Act2	ASAFATEVKLASVWVARIERKM--TYTDAACP-LGYC-LATY-----AF-RPARLR--	ASAFATEVKLASVWVARIERKM--TYTDAACP-LGYC-LATY-----AF-RPARLR--	ASAFATEVKLASVWVARIERKM--TYTDAACP-LGYC-LATY-----AF-RPARLR--
PKSF	-GGVAQLARCKASQIQRVPPDM--SFECAAAYP-VAFC-TRAY-----VLYQYCGIN--	-GGVAQLARCKASQIQRVPPDM--SFECAAAYP-VAFC-TRAY-----VLYQYCGIN--	-GGVAQLARCKASQIQRVPPDM--SFECAAAYP-VAFC-TRAY-----VLYQYCGIN--
Abda	-TSMNINLADIPIWVWVALDD--D-OPCDA-MLEBAG--RÖLLAR--DICNR--LP--	-TSMNINLADIPIWVWVALDD--D-OPCDA-MLEBAG--RÖLLAR--DICNR--LP--	-TSMNINLADIPIWVWVALDD--D-OPCDA-MLEBAG--RÖLLAR--DICNR--LP--
C6ea	-PKQSSRRVTRPRAIV--LPGHSHGTINENSIDLAF--HEIYAR--SILRD--VP--	-PKQSSRRVTRPRAIV--LPGHSHGTINENSIDLAF--HEIYAR--SILRD--VP--	-PKQSSRRVTRPRAIV--LPGHSHGTINENSIDLAF--HEIYAR--SILRD--VP--
Act3	-DTNASSVRISKREHFFLPHDF--SGNSATLILDT-A--NHVLA--KLIRC--IS--	-DTNASSVRISKREHFFLPHDF--SGNSATLILDT-A--NHVLA--KLIRC--IS--	-DTNASSVRISKREHFFLPHDF--SGNSATLILDT-A--NHVLA--KLIRC--IS--
F511	-TENRSRYTASHSSMTLTKQ-E-HVDADQGMSEIV--ADMIVQ--QIMYM--LP--	-TENRSRYTASHSSMTLTKQ-E-HVDADQGMSEIV--ADMIVQ--QIMYM--LP--	-TENRSRYTASHSSMTLTKQ-E-HVDADQGMSEIV--ADMIVQ--QIMYM--LP--
Py2	-SHIASQVIVPESSMCSLPDVT--SEKQOAFELHTV--FALLAG--YLPDQ--LP--	-SHIASQVIVPESSMCSLPDVT--SEKQOAFELHTV--FALLAG--YLPDQ--LP--	-SHIASQVIVPESSMCSLPDVT--SEKQOAFELHTV--FALLAG--YLPDQ--LP--
LovB	-ERNMSTIYHRPPIYTYEAD--NNISSEGGSLMVTYLAAYVAEIVYSTAK--IG--	-ERNMSTIYHRPPIYTYEAD--NNISSEGGSLMVTYLAAYVAEIVYSTAK--IG--	-ERNMSTIYHRPPIYTYEAD--NNISSEGGSLMVTYLAAYVAEIVYSTAK--IG--
Bet1	-SSTLSLRKIPLESVYIYVCH--P--GISANTYLVGA--ABELSV--AFGDS--LF--	-SSTLSLRKIPLESVYIYVCH--P--GISANTYLVGA--ABELSV--AFGDS--LF--	-SSTLSLRKIPLESVYIYVCH--P--GISANTYLVGA--ABELSV--AFGDS--LF--
E6K5	-HIASEPVSITPTGWCCHLD--KIDPVKITTVAS--AVILAS--SILER--LA--	-HIASEPVSITPTGWCCHLD--KIDPVKITTVAS--AVILAS--SILER--LA--	-HIASEPVSITPTGWCCHLD--KIDPVKITTVAS--AVILAS--SILER--LA--
C6ea	-LINSRSHLOVRSQIHFVDN-D-QITTKKALILVAV--KELLAL--ALASI--GO--	-LINSRSHLOVRSQIHFVDN-D-QITTKKALILVAV--KELLAL--ALASI--GO--	-LINSRSHLOVRSQIHFVDN-D-QITTKKALILVAV--KELLAL--ALASI--GO--
Dmb5	-TSMNSTIIVAPEKRAVAMIDE--VDIKPELTELIVPQHMAMQAVDS--AVRRH--VQ--	-TSMNSTIIVAPEKRAVAMIDE--VDIKPELTELIVPQHMAMQAVDS--AVRRH--VQ--	-TSMNSTIIVAPEKRAVAMIDE--VDIKPELTELIVPQHMAMQAVDS--AVRRH--VQ--

	Trans-ER	Active cis-ER	inactive cis-ER
F515	PHN-FD-LVKSFG--AEAVEDYRREPEDEIRKFR--NSLIVYVLDIIESEPTNQFCYKCI-ERGGGYT-ALEPPEGL-HRPTTIDPWV	PHN-FD-LVKSFG--AEAVEDYRREPEDEIRKFR--NSLIVYVLDIIESEPTNQFCYKCI-ERGGGYT-ALEPPEGL-HRPTTIDPWV	PHN-FD-LVKSFG--AEAVEDYRREPEDEIRKFR--NSLIVYVLDIIESEPTNQFCYKCI-ERGGGYT-ALEPPEGL-HRPTTIDPWV
E6K6	PRN-FE-LVKSYG--ASAVPEYNDPDCISDIKRRHT--NMIKRYALDCITSTQSPQFCYAL-GRAGGGYT-ALEPYSAAVARTRKRVDPWI	PRN-FE-LVKSYG--ASAVPEYNDPDCISDIKRRHT--NMIKRYALDCITSTQSPQFCYAL-GRAGGGYT-ALEPYSAAVARTRKRVDPWI	PRN-FE-LVKSYG--ASAVPEYNDPDCISDIKRRHT--NMIKRYALDCITSTQSPQFCYAL-GRAGGGYT-ALEPYSAAVARTRKRVDPWI
C6C6	PRN-FE-LAKEYQ--AEBIPEYHEPCQKRIKAYR--NTRIVYLDPEPTDAKSAIACCMBRAGGGYA-CLEMVPPYIVL-E-KRRLVGVFV	PRN-FE-LAKEYQ--AEBIPEYHEPCQKRIKAYR--NTRIVYLDPEPTDAKSAIACCMBRAGGGYA-CLEMVPPYIVL-E-KRRLVGVFV	PRN-FE-LAKEYQ--AEBIPEYHEPCQKRIKAYR--NTRIVYLDPEPTDAKSAIACCMBRAGGGYA-CLEMVPPYIVL-E-KRRLVGVFV
LovC	PHN-FD-LAASRG--AAEVDEYAAPIALQITRTYRK--NMIKRYALDCITSTQSPQFCYAL-GRAGGGYT-ALEPYSAAVARTRKRVDPWI	PHN-FD-LAASRG--AAEVDEYAAPIALQITRTYRK--NMIKRYALDCITSTQSPQFCYAL-GRAGGGYT-ALEPYSAAVARTRKRVDPWI	PHN-FD-LAASRG--AAEVDEYAAPIALQITRTYRK--NMIKRYALDCITSTQSPQFCYAL-GRAGGGYT-ALEPYSAAVARTRKRVDPWI
Ch6B	PGS-FD-RLRSLG--AVATPYHSPTCGSDIRRTYR--NELCALDCHADSSGNTICVIAL-SPDGGRYL-ALNPPPLRV-HRRRSVQVPRWV	PGS-FD-RLRSLG--AVATPYHSPTCGSDIRRTYR--NELCALDCHADSSGNTICVIAL-SPDGGRYL-ALNPPPLRV-HRRRSVQVPRWV	PGS-FD-RLRSLG--AVATPYHSPTCGSDIRRTYR--NELCALDCHADSSGNTICVIAL-SPDGGRYL-ALNPPPLRV-HRRRSVQVPRWV
AbdC	PHN-FN-LVKSIG--ATAPEYHSPTCGSDIRRTYR--NELCALDCHADSSGNTICVIAL-SPDGGRYL-ALNPPPLRV-HRRRSVQVPRWV	PHN-FN-LVKSIG--ATAPEYHSPTCGSDIRRTYR--NELCALDCHADSSGNTICVIAL-SPDGGRYL-ALNPPPLRV-HRRRSVQVPRWV	PHN-FN-LVKSIG--ATAPEYHSPTCGSDIRRTYR--NELCALDCHADSSGNTICVIAL-SPDGGRYL-ALNPPPLRV-HRRRSVQVPRWV
DmbC	SES-AS-PAKRLG--AAATPEYATCGRIDIRRYTV--DSLALADISESASALICYAL-GRAGGGYT-SLDPPLRV-CVRSIVPDI	SES-AS-PAKRLG--AAATPEYATCGRIDIRRYTV--DSLALADISESASALICYAL-GRAGGGYT-SLDPPLRV-CVRSIVPDI	SES-AS-PAKRLG--AAATPEYATCGRIDIRRYTV--DSLALADISESASALICYAL-GRAGGGYT-SLDPPLRV-CVRSIVPDI
Bet3	AOS-AP-LCISLIG--AVQGLCYSTTCVODIKALNAGGS-IKHALDICTIDPEPTVGLASL-ARLGGRYA-CLEMVPPYIVL-E-KRRLVGVFV	AOS-AP-LCISLIG--AVQGLCYSTTCVODIKALNAGGS-IKHALDICTIDPEPTVGLASL-ARLGGRYA-CLEMVPPYIVL-E-KRRLVGVFV	AOS-AP-LCISLIG--AVQGLCYSTTCVODIKALNAGGS-IKHALDICTIDPEPTVGLASL-ARLGGRYA-CLEMVPPYIVL-E-KRRLVGVFV
LovF	SETKRILLIDKRIHDPVSSDSSFPDGIKTRTRRGSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SETKRILLIDKRIHDPVSSDSSFPDGIKTRTRRGSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SETKRILLIDKRIHDPVSSDSSFPDGIKTRTRRGSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Az4B	TPAKRQLLHETVGIPIENNIIESSDPEFATDVHRTDGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TPAKRQLLHETVGIPIENNIIESSDPEFATDVHRTDGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TPAKRQLLHETVGIPIENNIIESSDPEFATDVHRTDGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Ca2F	SOEKRLDLREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SOEKRLDLREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SOEKRLDLREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
A6cG	SOEKRLDLREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SOEKRLDLREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SOEKRLDLREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
R4d5	TOTKRALLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TOTKRALLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TOTKRALLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Hpm8	TEPKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TEPKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TEPKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
PKSN	ADTKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	ADTKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	ADTKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
BasB	SEAKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SEAKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SEAKRQLIREYGIPEPPIERINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Fum1P	NEEKYQVINDPRLPRSRINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	NEEKYQVINDPRLPRSRINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	NEEKYQVINDPRLPRSRINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Sol1	TOEKRYQVINDPRLPRSRINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TOEKRYQVINDPRLPRSRINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TOEKRYQVINDPRLPRSRINRSDASFAVALAATGGRSDVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Act2	TEPKRQYIHOALGIRPHDIESSTPAEPDLSLCKTNNSQVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TEPKRQYIHOALGIRPHDIESSTPAEPDLSLCKTNNSQVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TEPKRQYIHOALGIRPHDIESSTPAEPDLSLCKTNNSQVYVNSLAGEP--LQESF--D-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
PKSF	SAGGADPLENSLHVPSKNSIFSTJSLDFQHGRLNNGEVAVAVVG--EDH--LQESW--P-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SAGGADPLENSLHVPSKNSIFSTJSLDFQHGRLNNGEVAVAVVG--EDH--LQESW--P-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SAGGADPLENSLHVPSKNSIFSTJSLDFQHGRLNNGEVAVAVVG--EDH--LQESW--P-CLARGRFVEIKRDLQONS--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Abda	--KA--SCTSDMIVYH--SRASRRALQSRLP--KDPFALIDTQELP--E-NILFACISLNNC--RVLNMLIHQL--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	--KA--SCTSDMIVYH--SRASRRALQSRLP--KDPFALIDTQELP--E-NILFACISLNNC--RVLNMLIHQL--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	--KA--SCTSDMIVYH--SRASRRALQSRLP--KDPFALIDTQELP--E-NILFACISLNNC--RVLNMLIHQL--LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
C6ea	OAS-----DLESEWTYH--RKAQKTEVQOALP--RNVVCFEFDGDESIAL--KIILACIPDHT--QAKKEASITIA-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	OAS-----DLESEWTYH--RKAQKTEVQOALP--RNVVCFEFDGDESIAL--KIILACIPDHT--QAKKEASITIA-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	OAS-----DLESEWTYH--RKAQKTEVQOALP--RNVVCFEFDGDESIAL--KIILACIPDHT--QAKKEASITIA-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Act3	NRE-----KQEGMGAFIYH--PHATRODIRTLP--RNVVCFEFDGDESIAL--KIILACIPDHT--QAKKEASITIA-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	NRE-----KQEGMGAFIYH--PHATRODIRTLP--RNVVCFEFDGDESIAL--KIILACIPDHT--QAKKEASITIA-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	NRE-----KQEGMGAFIYH--PHATRODIRTLP--RNVVCFEFDGDESIAL--KIILACIPDHT--QAKKEASITIA-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
F511	RSDKST--N-LISKAMVIFH--PRLNKRILIESALP--HSVTFITDGGAEVVIHE--GSHGRKHGIGLALHNSLSTGC--VKRTLODLTS-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	RSDKST--N-LISKAMVIFH--PRLNKRILIESALP--HSVTFITDGGAEVVIHE--GSHGRKHGIGLALHNSLSTGC--VKRTLODLTS-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	RSDKST--N-LISKAMVIFH--PRLNKRILIESALP--HSVTFITDGGAEVVIHE--GSHGRKHGIGLALHNSLSTGC--VKRTLODLTS-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Py2	TNN-----LDRKQAMLYH--EHSSTARQISQVLP--SDVSAVAVIDRGGGI--YRMLSLIPDPA--FRIQIIDLIVR-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TNN-----LDRKQAMLYH--EHSSTARQISQVLP--SDVSAVAVIDRGGGI--YRMLSLIPDPA--FRIQIIDLIVR-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TNN-----LDRKQAMLYH--EHSSTARQISQVLP--SDVSAVAVIDRGGGI--YRMLSLIPDPA--FRIQIIDLIVR-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
LovB	SGNRSS--VSAGDAKSMWLIH--EHSSTARQISQVLP--SDVSAVAVIDRGGGI--YRMLSLIPDPA--FRIQIIDLIVR-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SGNRSS--VSAGDAKSMWLIH--EHSSTARQISQVLP--SDVSAVAVIDRGGGI--YRMLSLIPDPA--FRIQIIDLIVR-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	SGNRSS--VSAGDAKSMWLIH--EHSSTARQISQVLP--SDVSAVAVIDRGGGI--YRMLSLIPDPA--FRIQIIDLIVR-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Bet1	TLG-TA--V-SPDVAASQIHP--MRSARSIDKALP--SDIYCVDPDSASIAQAN--VAMITLSCPYG--RREKVNITFS-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TLG-TA--V-SPDVAASQIHP--MRSARSIDKALP--SDIYCVDPDSASIAQAN--VAMITLSCPYG--RREKVNITFS-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	TLG-TA--V-SPDVAASQIHP--MRSARSIDKALP--SDIYCVDPDSASIAQAN--VAMITLSCPYG--RREKVNITFS-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
E6K5	D--BA--MKTGAKRIVD--RSPPIRITKASLP--KSAKRIIDLSQDSQKMET--SVIYMCIPDLY--ETIDPAHLFG-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	D--BA--MKTGAKRIVD--RSPPIRITKASLP--KSAKRIIDLSQDSQKMET--SVIYMCIPDLY--ETIDPAHLFG-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	D--BA--MKTGAKRIVD--RSPPIRITKASLP--KSAKRIIDLSQDSQKMET--SVIYMCIPDLY--ETIDPAHLFG-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
C6ea	--NA--VHQDVIYVH--PNSARIVTRKDLP--VJLMIIDLSQDSQKMET--SVIYMCIPDLY--ETIDPAHLFG-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	--NA--VHQDVIYVH--PNSARIVTRKDLP--VJLMIIDLSQDSQKMET--SVIYMCIPDLY--ETIDPAHLFG-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK	--NA--VHQDVIYVH--PNSARIVTRKDLP--VJLMIIDLSQDSQKMET--SVIYMCIPDLY--ETIDPAHLFG-----LDMSTVRNVSFSS-VDILTYQAK
Dmb5	HS-----AAPDMLIKVH--RLSKRFAMSQMVP--SQYGVYVLDIGETESFDD-----CETIQQSCIPPTC--TVHRLDACLIL-----SEMSQCS	HS-----AAPDMLIKVH--RLSKRFAMSQMVP--SQYGVYVLDIGETESFDD-----CETIQQSCIPPTC--TVHRLDACLIL-----SEMSQCS	HS-----AAPDMLIKVH--RLSKRFAMSQMVP--SQYGVYVLDIGETESFDD-----CETIQQSCIPPTC--TVHRLDACLIL-----SEMSQCS

"Fingerprint" region for active ER

xL1 loop NADPH binding motif

xL2 loop

図 2-6-3. 各 ER ドメインの比較 (xL1, xL2: LovC と MDR の配列比較より)

## 2-7. まとめ

第2章において、今まで不明であった **betaenone** 生合成遺伝子を同定し、その生合成マシナリーを麹菌内で再構築することに成功した。これにより、麹菌は異種糸状菌由来の巨大酵素 **PKS** の機能を忠実に再現可能であることは既に分かっていたが<sup>20, 21</sup>、炭素鎖の伸長回数制御や還元の有無を厳格に制御できることを再確認した。また、**R** ドメインがポリケタイド鎖の切り出しに関与していること、**Bet2** が多段階の酸化反応を触媒することを実験的に実証するとともに、**PKS** 内にある **ER** の活性を区別するための新たな指紋領域を確認した。さらに2章で得られた **betaenone** 類の有するデカリン骨格が非酵素的な[4+2]環化付加にて生成していることも明らかにした。これまでに知られた **lovastatin** や **solanapyrone** においては **Diels-Alderase** の関与が一般的とされてきたが、その例に当てはまらない化合物群を提唱できたとと言える。詳しくは3章にて述べる。

## References

- 1) M. N. Heneghan, A. A. Yakasai, L. B. Halo, Z. S. Song, A. M. Bailey, T. J. Simpson, R. J. Cox, and C. M. Lazarus, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1508.
- 2) R. Fujii, A. Minami, K. Gomi and H. Oikawa, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2999.
- 3) A. Ichihara, H. Oikawa, K. Hayashi, and S. Sakamura, *J. Am. Chem. Soc.* **1983**, *105*, 2908.
- 4) A. Ichihara, H. Oikawa, M. Hashimoto, S. Sakamura, T. Haraguchi, and H. Nagano, *Agric. Biol. Chem.* **1983**, *47*, 2965.
- 5) I. Barash, S. Manulis, Y. Kashman, J. P. Springer, M. H. M. Chen, J. Clardy, and A. Strobel, *Science* **1983**, *220*, 1065.
- 6) J. L. Sørensen, F. T. Hansen, T. E. Sondergaard, D. Staerk, T. V. Lee, R. Wimmer, L. G. Klitgaard, S. Purup, H. Giese, and R. J. N. Frandsen, *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 1159.
- 7) H. Oikawa, A. Ichihara, and S. Sakamura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1984**, 814.
- 8) H. Oikawa, A. Ichihara, and S. Sakamura, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1988**, 600.
- 9) K. Kasahara, T. Miyamoto, T. Fujimoto, H. Oguri, T. Tokiwano, H. Oikawa, Y. Ebizuka, and I. Fujii, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1245.
- 10) R. Fujii, A. Minami, T. Tsukagoshi, N. Sato, T. Sahara, S. Ohgiya, K. Gomi, and H. Oikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2011**, *75*, 1813.
- 11) H-C. Lin, Y. Tsunematsu, S. Dhingra, W. Xu, M. Fukutomi, Y-H. Chooi, D. E. Cane, A. M. Calvo, K. Watanabe, and Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 4426.
- 12) A. Droce, W. Saei, S. H. Jørgensen, R. Wimmer, H. Giese, R. D. Wollenberg, T. E. Sondergaard, and J. L. Sørensen, *Molecules* **2016**, *21*, 1710-1718.
- 13) H. Kobayashi, R. Sunaga, K. Furihata, N. Morisaki, and S. Iwasaki, *I. J. Antibiot.* **1995**, *48*, 42-52.
- 14) A. B. Barash, M. A. Hughes, D. J. Hawkins, W. E. Boeglin, W-C. Song, and L. Meijer, *J. Biol. Chem.* **1991**, *34*, 22926.
- 15) J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vedras, and C. R. Hutchinson, *Science* **1999**, *284*, 1368.

- 16) H. Oikawa, *Cell Chem. Biol.* **2016**, *23*, 429.
- 17) C. Filling, K. D. Berndt, J. Benach, S. Knapp, T. Prozorovski, E. Nordling, R. Ladenstein, H. Jörnvall, and U. Oppermann, *J. Biol. Chem.* **2002**, *28*, 25677.
- 18) 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. Vederase, Y. Tang, *Science* **2009**, *326*, 589.
- 19) B. D. Ames, C. Nguyen, J. Bruegger, P. Smith, W. Zu, S. Ma, E. Wong, S. Wong, X. Xie, J. W.-H. Li, J. C. Vederas, Y. Tang, and S.-C. Tsai, **2012**, *109*, 11144.
- 20) I. Fujii, N. Yoshida, S. Shimomaki, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1301.
- 21) K. Kasahara, I. Fujii, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 920.

### 第3章 本論-じゃがいも夏疫病菌 *Alternaria solani* を用いたゲノムマイニング

#### 3-1. PKS を対象としたゲノムマイニング法

2章において、麴菌における HR-PKS 産物の生産に成功した。そこで3章では麴菌を利用した PKS のゲノムマイニングを行い、さらに複雑な実験系にも適応可能なことを示すべく研究を行った。

ゲノムマイニングとは、機能未知の遺伝子クラスターを異種発現宿主に導入し、代謝産物を生産させる手法である。近年のゲノムシーケンス技術の発展に伴い、研究対象となりうる機能未知遺伝子の母数は指数関数的に増加している。さらに合成 DNA を用いることで菌株そのものがない場合、特に地球上の微生物の 99%以上を占めるといわれる難培養性および培養不能な微生物由来の生合成遺伝子であっても異種発現を検討可能である。したがって、培養可能な微生物には見られない特異な天然物ライブラリーの構築が可能となり、医薬品のリード化合物や、化学生物学研究における重要なツールとして利用されるような興味深い生物活性を示す新規天然物の取得が期待されている。

糸状菌におけるゲノムマイニングは、主に、遺伝子サイズが小さく (2 - 3 kbp)、ORF の推定やクローニングが容易で、網羅的な解析に対する労力が少なく済むテルペン環化酵素に注目して行われてきた。当研究室でも 2012 年に Chiba らが二機能性テルペン環化酵素に着目してゲノムマイニングを行い、新規セスタテルペン環化酵素を同定している<sup>1</sup>。その一方で、ポリケタイドを対象としたゲノムマイニングは限定的である。その主な原因として、テルペン環化酵素などの小さな遺伝子とは異なり酵素遺伝子サイズが 7 - 12 kbp と巨大なため、1つの遺伝子を解析するだけでもテルペン環化酵素とは比較にならないほどの時間と労力を要するためである。加えてアミノ酸配列の情報だけで PKS が機能するか否かの判断がつかないことから、ゲノムマイニングの候補としては敬遠されてきた。視点を変えると、これらの点を解決することで、PKS のゲノムマイニングも簡易化することが可能であろう。

3章では、機能不全 PKS を避けるために、2章で得られた知見からポリケタイド鎖の切り出しを担うドメインを有し、菌体内で発現している PKS を選択して麴菌を宿主としたゲノムマイニングを行い、didymellamide 生合成に関わる生合成遺伝子の特定と天然物の全生合成を達成したので報告する。

### 3-2. ゲノムマイニングの対象となる機能未知PKSの探索

標的遺伝子を探索するための糸状菌として、*Alternaria solani* A-17 を用いた。本菌は、じゃがいも夏疫病を引き起こす植物病原菌であり、植物毒素 alternaric acid (**3-1**) を生産する。**3-1** は 1949 年に Brian らによって抗真菌活性物質として単離され<sup>2</sup>、1984 年に行われた Stoessl らによる同位体標識前駆体の取り込み実験から通常のポリケタイド化合物とは異なり、2 本のポリケタイド鎖で構成されていることが明らかになっている<sup>3</sup>。1994 年には、Tabuchi らによって酸化酵素 P450 阻害剤の投与実験が行われ、酸化度の異なる 6 種の alternaric acid 類縁体が単離された<sup>4</sup>。最も酸化度の低い類縁体から主鎖構造が推定されたほか、酸化度の順番を参考に生合成経路が予想された (図 3-2-1)<sup>5</sup>。同様の構造を持つ化合物は報告されておらず、その生合成経路には興味を持たれている。

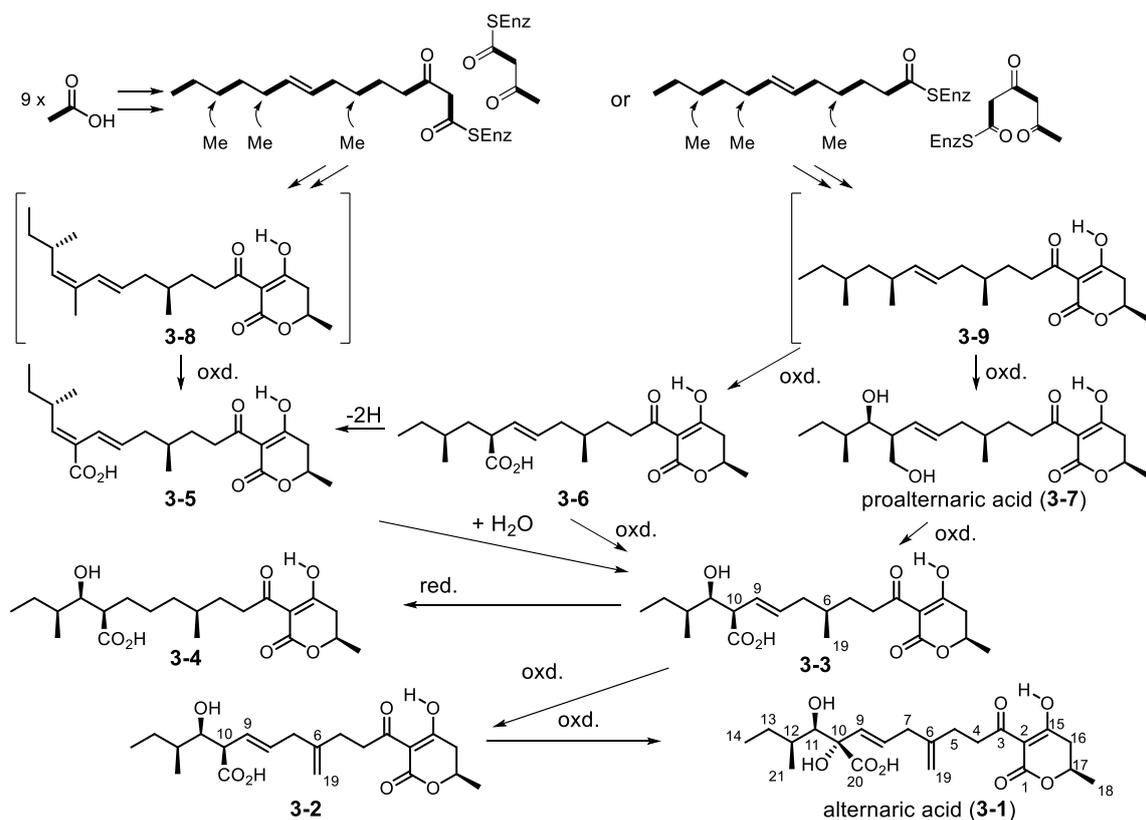


図 3-2-1. Alternaric acid の予想生合成経路

微生物の同一種において、染色体上の遺伝子配列は多く保存されているが、異種株、特に天然物の生産株と非生産株において異なる遺伝子クラスターを有している場合がある。そこで、糸状菌 *A. solani* A-17 株のドラフトゲノムシーケンス解析を行い、solanapyrone 生合成に関与する PKS である *sol1* をクエリーとした相同性検索、並びに solanapyrone

生産株 *Alternaria solani* ASP-2 株との遺伝子クラスターの比較を行った。その結果、合計 11 個の HR-PKS、PKS-NRPS が見つかった (図 3-2-2, それぞれ 1HRPKS-11PKSNRPS と仮称する)。このうち、1HRPKS は *A. solani* ASP-2 株に存在する機能解析済みの PKSN<sup>6</sup> と、10HRPKS は同様に PKSF<sup>7</sup> と 98%以上という極めて高い相同性を有していた。そのほか、機能解析済みではないものの、7HRPKS は PKSK、2HRPKS は AS1、11PKSNRPS は AS3、4HRPKS は AS4 と 96%以上という高い相同性を示し、ASP-2 株に存在が確認されている 7つの PKS (-NRPS) のうち、6 個の遺伝子は共通していることが分かった<sup>8</sup>。ASP-2 株には、PKS をコードした遺伝子 *sol1* (Sol1, solanapyrone 生合成酵素) も存在していたが、A-17 株に存在していなかった。一方で、A-17 株で見られた候補遺伝子のうち、6PKSNRPS (*asolS*) や 3HRPKS, 5HRPKS, 8HRPKS と 9HRPKS は ASP-2 株には見られなかった。

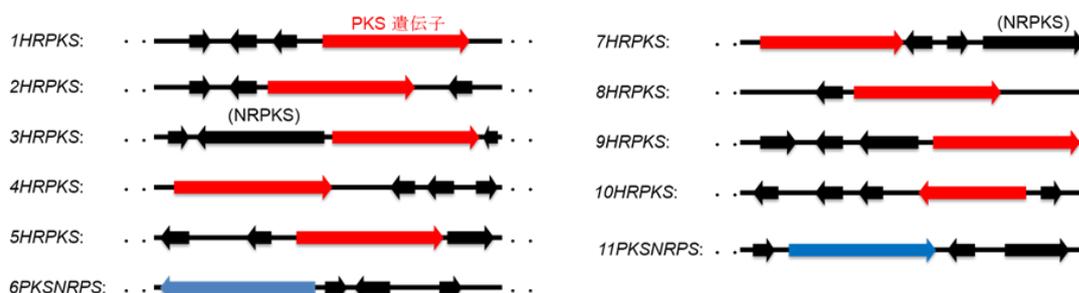


図 3-2-2. 発見した HR-PKS(-NRPS)群

残った 9 個の候補のうち、ゲノムマイニングの対象を絞り込むための指標として、alternaric acid 生産条件下での転写の有無を確認した。培養条件は、alternaric acid を生産すると報告された CDYE 培地と、alternaric acid 非生産条件である PD 培地の 2 つを試した。それぞれ培養し、得られた粗抽出物を LC-MS で解析した。この結果、PD 培地に比べて CDYE 培地では alternaric acid 類縁体の生産量が著しく増加していた (図 3-2-3)。

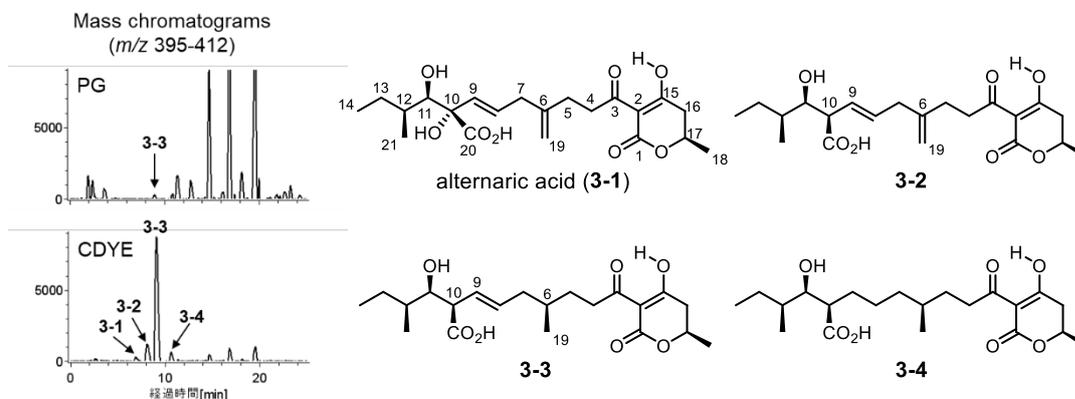


図 3-2-3. *A. solani* A-17 由来代謝産物の分析結果

このことから、CDYE, PD 培養条件間で **3-1** と類縁体の生産量の差異が明らかになり、9 個の候補 PKS についての転写量変化が期待された。CDYE と PD 培地で培養した菌体より total RNA を抽出し、逆転写で得られた cDNA をテンプレートに RT-PCR を行うことで、各 PKS について増幅を確認した。この結果、1 つの遺伝子 *aso/S* に候補が絞り込まれた (図 3-2-4)。

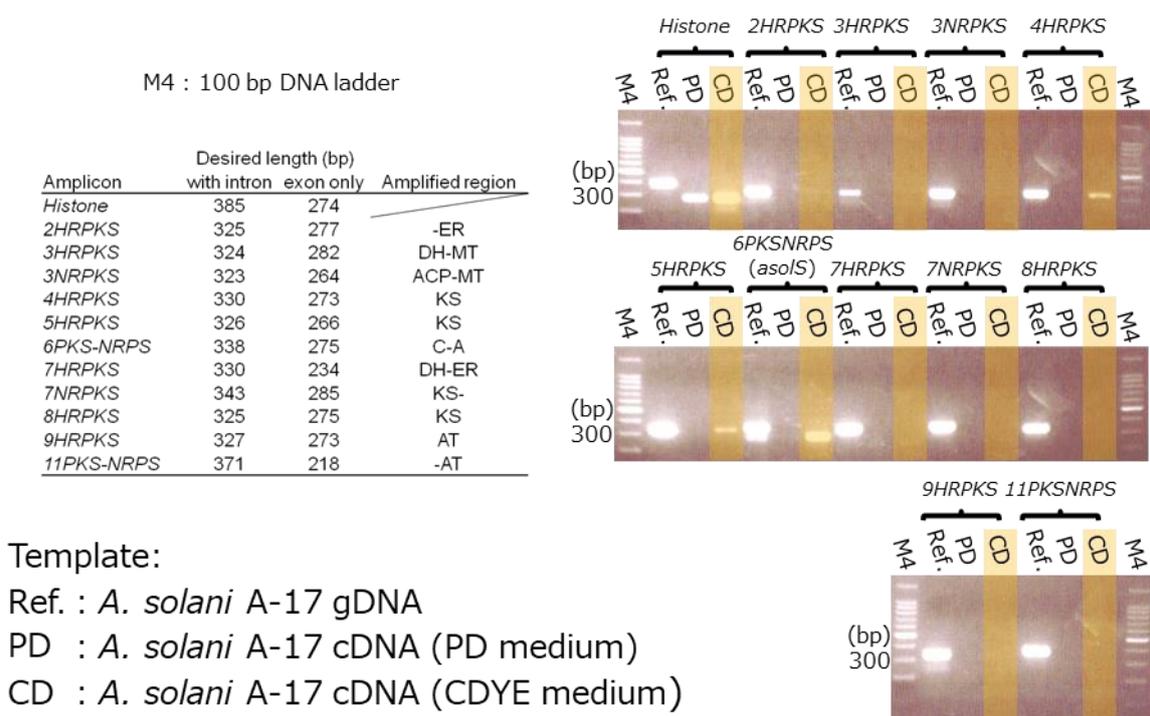


図 3-2-4. 各 PKS (-NRPS) の発現解析

*aso/S* の周辺遺伝子を 2 章で利用したウェブツールである 2ndFind (<http://biosyn.nih.go.jp/2ndfind/>) で確認したところ、trans-ER 遺伝子 *aso/C* と、2 つの P450 酸化酵素遺伝子を含んでおり、これを *asol* クラスターと命名した (表 3-2-1, 図 3-2-5)。

表 3-2-1. *asolS* 生合成遺伝子クラスターに含まれる遺伝子

	Deduced function (homologue, NCBI accession number, species)
<i>asolS</i>	Polyketide synthase-non ribosomal peptide synthase hybrid ( <i>Beauveria bassiana</i> , ADN43685.1, 67/51%)
<i>asolC</i>	Trans ER ( <i>Beauveria bassiana</i> , ADN43684.1, 66/50%)
<i>asolB</i>	P450 ( <i>Cordyceps brongniartii</i> RCEF 3172, OAA40386.1, 63/45%)
<i>orf1</i>	NADH oxidase ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense race 1, ENH70108.1, 72/55%)
<i>orf2</i>	O-methyltransferase ( <i>Talaromyces islandicus</i> , CRG87949.1, 57/39%)
<i>orf3</i>	Zn(II)2Cys6 transcription factor ( <i>Aspergillus flavus</i> , RAQ60575.1, 64/46%)
<i>orf4</i>	MFS monocarboxylate transporter ( <i>Aspergillus flavus</i> , RAQ59724.1, 78/64%)
<i>orf5</i>	Transposase-like protein ( <i>Stemphilium licopersici</i> , KNG52748.1, 80/60%)
<i>asolA</i>	P450 ( <i>Beauveria bassiana</i> , ADN43682.1, 74/60%)
<i>orf6</i>	Short-chain dehydrogenase/reductase ( <i>Penicillium occitanis</i> , PCG98794.1, 68/51%)

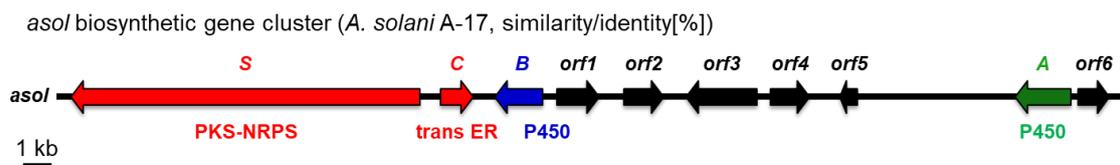


図 3-2-5. *asol* 生合成遺伝子クラスター

*asolS* の周辺に位置している trans-ER 遺伝子 *asolC*、P450 酸化酵素遺伝子 *asolA* も発現しているかを同様に RT-PCR で確認したところ、目的長が alternaric acid 生産条件下でのみ増幅されたことから、発現していることがわかった (図 3-2-6)。

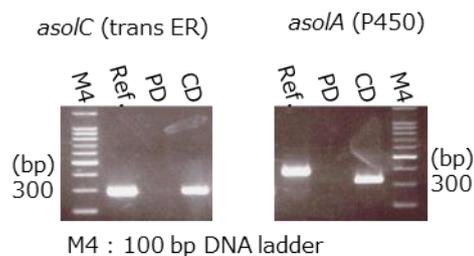


図 3-2-6. *asolC*, *asolA* の発現確認

以上より、基本骨格構築酵素遺伝子 *asolS* の周辺に存在する修飾酵素遺伝子が発現している *asol* 遺伝子クラスターをゲノムマイニングの対象にした。*AsolS* は PKS-NRPS であり、この種類の酵素はポリケタイド鎖とアミノ酸の縮合産物を生産することが知られている (図 3-2-7)。NRPS 部分の A ドメインは基質複合体の X 線結晶構造解析から、活性残基と、活性化するアミノ酸を選択する識別配列 (表 3-2-2, A ドメイン中の基質認識にかかわる 10 個のアミノ酸) の存在が示されており、ATP と特定のアミノ酸を利用して AMP 化させる。その後、T ドメインのホスホパンセテイン鎖にロードする<sup>9</sup>。

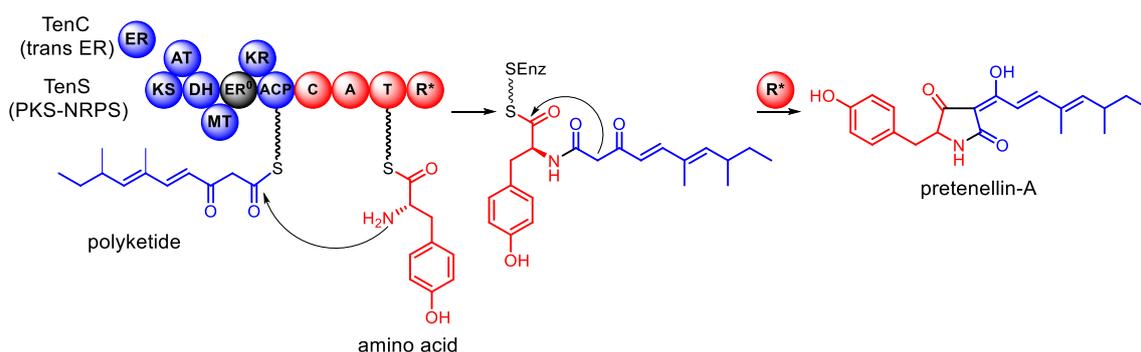


図 3-2-7. TenS による pretenellin-A の生合成

A ドメインはアミノ酸だけではなく、短鎖脂肪酸を認識して活性化する例がアシルテトロロン酸誘導体の生合成に関与する CaaA で知られている<sup>10</sup>。そのため *asol* 遺伝子クラスターが、アミノ酸を構造中に含まない alternaric acid (**3-1**) の生合成に関与しているか判断するため、AsolS の A ドメインが実際にどのアミノ酸を活性化しているか推測した。AsolS の A ドメインの配列を、機能既知の A ドメインと比較した結果、AsolS の A ドメインに存在するアミノ酸識別配列は TenS, ApdA とよく似ていたため、Tyr をロードすると推測された (表 3-2-2)。さらに、本酵素の末端には化合物を切り出すための R\*ドメインが存在したことから、生成物を与える確率が高いと判断した。

表 3-2-2. 各 A ドメインのアミノ酸配列比較

	Substrate	186	187	190	229	256	258	282	290	291	486
AsolS	?	D	M	I	I	C	G	C	A	A	K
CaaA	malic acid	N	H	D	K	F	G	S	I	S	K
FusA	homoserine	D	M	T	F	S	A	G	I	A	K
TenS	tyrosine	D	M	V	I	C	G	C	A	I	K
ApdA	tyrosine	D	M	V	I	C	G	C	A	A	K
PsoA	phenylalanine	D	A	Y	T	M	A	A	I	S	K
CcsA	tryptophan	D	M	S	E	V	G	C	F	S	K
CpaA	tryptophan	D	M	A	L	C	G	S	A	T	K
CheA	phenylalanine	D	M	I	I	C	G	C	A	A	K
Pks3	serine	D	L	L	M	G	G	W	I	T	K

### 3-3. 麹菌異種発現系を用いた *asol* 遺伝子クラスターの機能解析

#### 3-3-1. AO-*asolCS* からの代謝産物の抽出

まず、化合物の基本骨格を生産すると予想される *asolC*, *asolS* を麹菌に導入し機能解析を行った。形質転換体 AO-*asolCS* より得られた代謝産物を HPLC で分析すると、野生株には見られない新たなピーク (**3-10**, 保持時間 24 分) が観測された (図 3-3-1)。本化合物の分子式は、HR-MS より  $C_{24}H_{29}NO_4$  と決定した。単離して  $^1H$ -NMR 解析を行うと、パラ-2 置換ベンゼンに由来する 2H 分のダブルットシグナルが 2 つ ( $\delta_H$  7.02, 6.74) と、窒素に結合した 1H 分のシングレットシグナル ( $\delta_H$  6.14)、オレフィンプロトンに相当するマルチプレットシグナル ( $\delta_H$  5.56) とブロードダブルットシグナル ( $\delta_H$  5.42) がそれぞれ 1 つ、メチル基に相当するダブルットシグナルが 2 つ ( $\delta_H$  0.94, 0.91) 存在していた。 $^1H$ -NMR で観測されたシグナルは積分値比 7:2 で 2 セット観測されたので、溶液中で構造異性体が生じていることが示唆された (図 3-3-2)。この現象はテトラミン酸構造を有する preaspyridone の NMR 解析においても観測されていたのに加え、**3-10** の分子式から窒素を含んでいることを合わせてテトラミン酸構造の存在を示唆していた<sup>11</sup>。さらに H8-C7, H8-C3, H5-C2, H5-C4 の HMBC 相関と NOE 相関から、トランスデカリン骨格とテトラミン酸構造を有する新規化合物 protodidymellamide  $\alpha$  (**3-10**, 123 mg from 1 kg 固体培地) であると決定した。

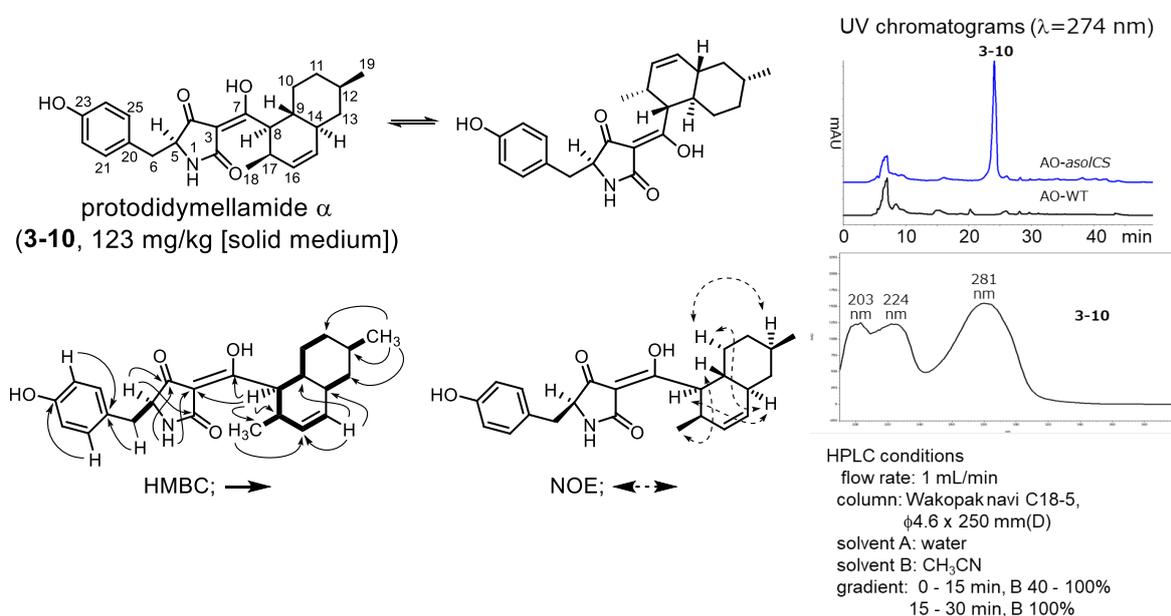


図 3-3-1. AO-*asolCS* の代謝産物解析

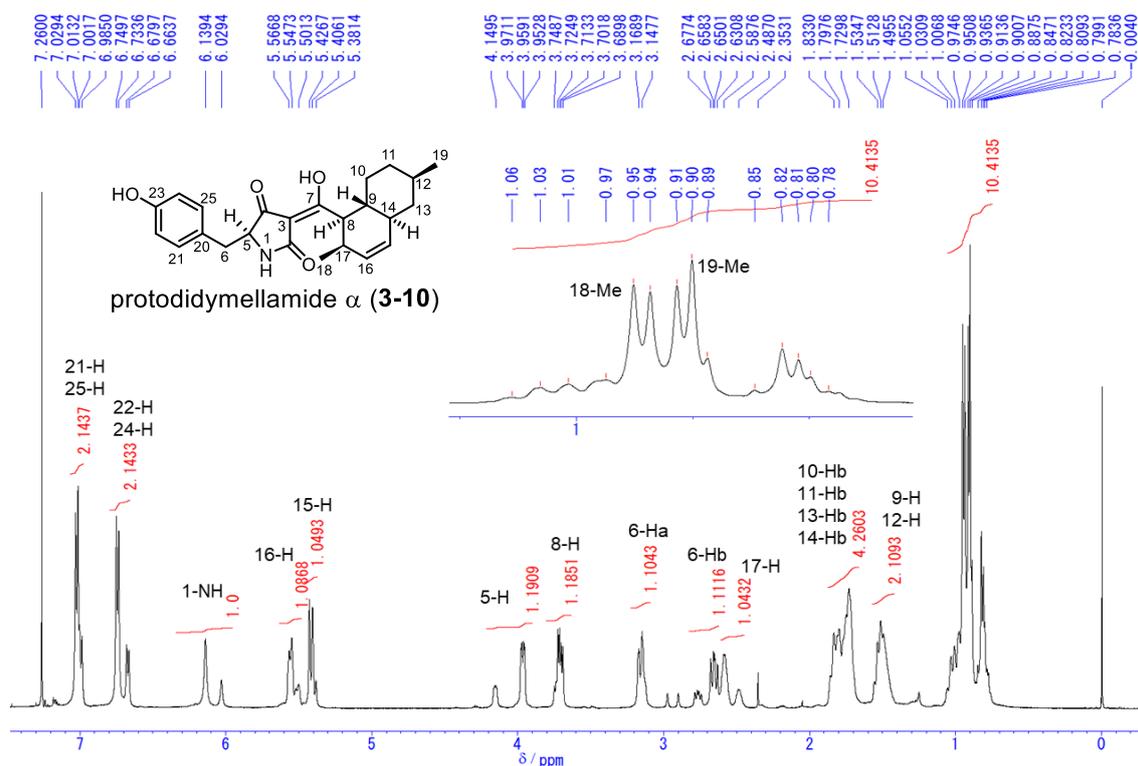


図 3-3-2. protodidymellamide  $\alpha$  (**3-10**) の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (in  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

**3-10** の構造から、alternaric acid 生産条件で発現していた *asolA* は alternaric acid の生合成遺伝子ではないことが判明した。報告済みの天然物の構造と比較したところ、**3-10** は糸状菌由来のポリケタイド系天然物 didymellamide の前駆体であると考えられた。しかし、*A. solani* より didymellamide 類の単離報告例はないこと、当研究室での代謝産物解析においても検出可能レベル以下の生産能であったことから、*asol* 遺伝子クラスターは培地の違い等、培養条件の変化で発現し極微量の代謝産物を生産すると推測できる。

機能解析に成功した *AsolS*, *AsolC* は、tenellin 生合成酵素 *TenS*, *TenC* とそれぞれ 65% 程度の相同性を示した。*Tenellin* 生合成では、**3-10** と同様にテトラミン酸構造をもつ pretenellin-A が生産された後、P450 酸化酵素 *TenA* による酸化的な環拡大反応によって 4-hydroxy-2-pyridone 構造を有する pretenellin-B へと変換される。その後、もう一つの P450 酸化酵素 *TenB* によって窒素に水酸基が導入されてヒドロキサム酸構造を有する天然物 tenellin へと変換される (図 3-3-3)<sup>12</sup>。*tenA*, *tenB* と類似した遺伝子の有無を確認したところ、*asolS* の近傍に位置する *asolA* が 74% の相同性を示したことから、*AsolA* が化合物 **3-10** を基質として環拡大反応を触媒すると考えられた。

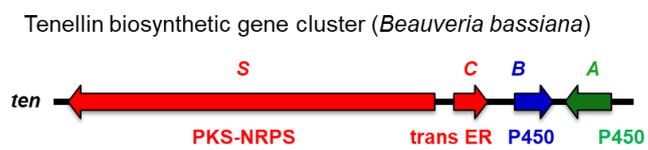
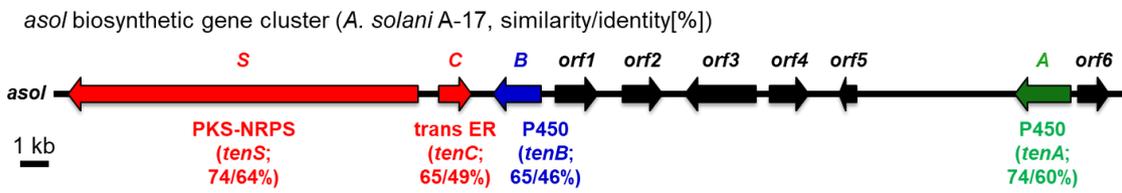
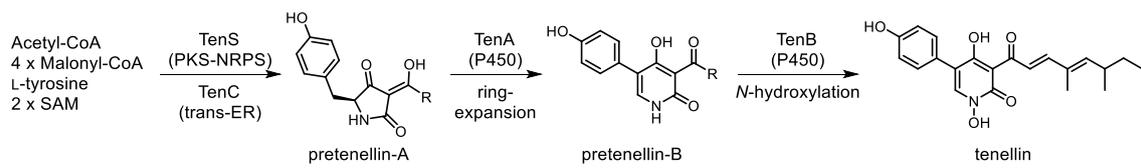


図 3-3-3. Tenellin 生合成経路および *asol* クラスターとの比較

### 3-3-2. AO-asolCSA からの代謝産物の抽出

前項 3-3-1 において酸化的な環拡大反応を触媒すると予想した *asolA* を、**3-10** を生産する麹菌 AO-*asolCS* に追加導入した。得られた AO-*asolCSA* の代謝産物を HPLC で解析したところ、AO-*asolCS* には見られない新たな 2 つのピーク (**3-11** (保持時間 17 分), **3-12** (保持時間 26.5 分)) が観測された (図 3-3-4)。それぞれの分子式は、HR-MS より  $C_{24}H_{29}NO_5$ ,  $C_{24}H_{27}NO_4$  と決定した。**3-11**, **3-12** の UV スペクトルは極大吸収波長が 340 nm 付近であり、**3-10** ( $\lambda_{max}$  280 nm) に比べて大幅な長波長シフトが見られた。

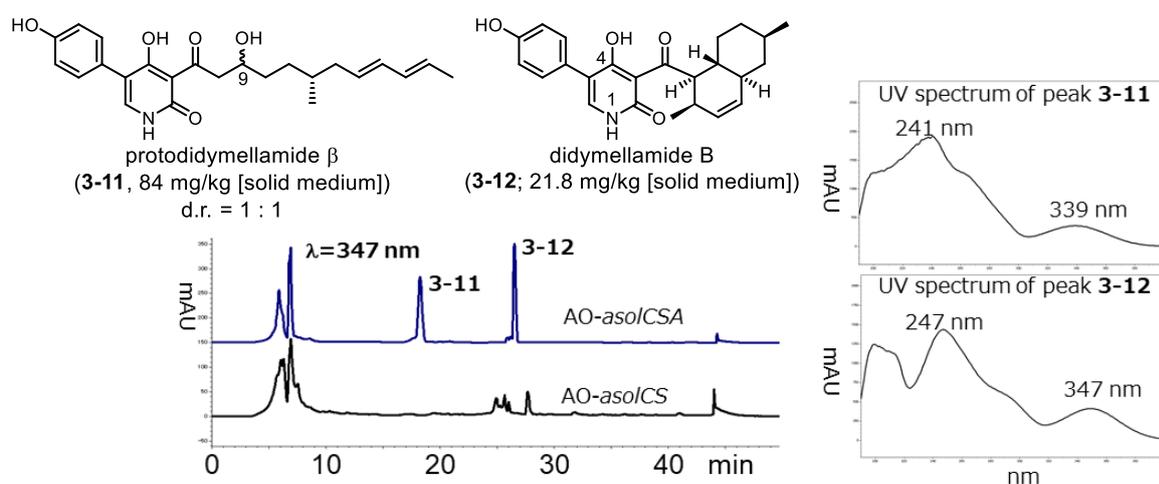


図 3-3-4. AO-*asolCSA* の代謝産物 HPLC 解析

保持時間 17 分のピークを単離し、 $^1H$ -NMR 解析を行うと、パラ-2 置換ベンゼンに由来する 2H 分のダブルットシグナルが 2 つ ( $\delta_H$  7.21, 6.76) と、4-ヒドロキシ-2-ピリドンのアミドプロトンに相当する 1H 分のシングレットシグナル ( $\delta_H$  11.57) と 6 位オレフィンプロトンに相当する 1H 分のシングレットシグナル ( $\delta_H$  7.48) が観測された。さらにオレフィンプロトンに相当する合計 4H 分のマルチプレットシグナルが 3 つ ( $\delta_H$  5.98, 5.56, 5.47) とアリル位のメチル基に相当するダブルットシグナルが 1 つ ( $\delta_H$  1.68) が観測されたことから、鎖状構造であることを強く示唆していた (図 3-3-5)。加えてオキシメチンに相当する 1H 分のマルチプレットシグナル ( $\delta_H$  4.55) が観測され、HSQC 解析において 9 位オキシメチンと相関がみられた  $^{13}C$ -NMR における炭素シグナルが 2 つ ( $\delta_C$  78.6, 78.4)、同強度で見られたことから、1:1 のジアステレオマー混合物であると推定した (図 3-3-6, 3-3-7)。さらに、COSY から推定された 3 種の部分構造をつなぐ HMBC 相関が観測されたことから、直鎖アルコールと 4-ヒドロキシ-2-ピリドン環が結合した新規化合物 protodidymellamide  $\beta$  (**3-11**, 84 mg from 1 kg 固体培地) であると決定した。

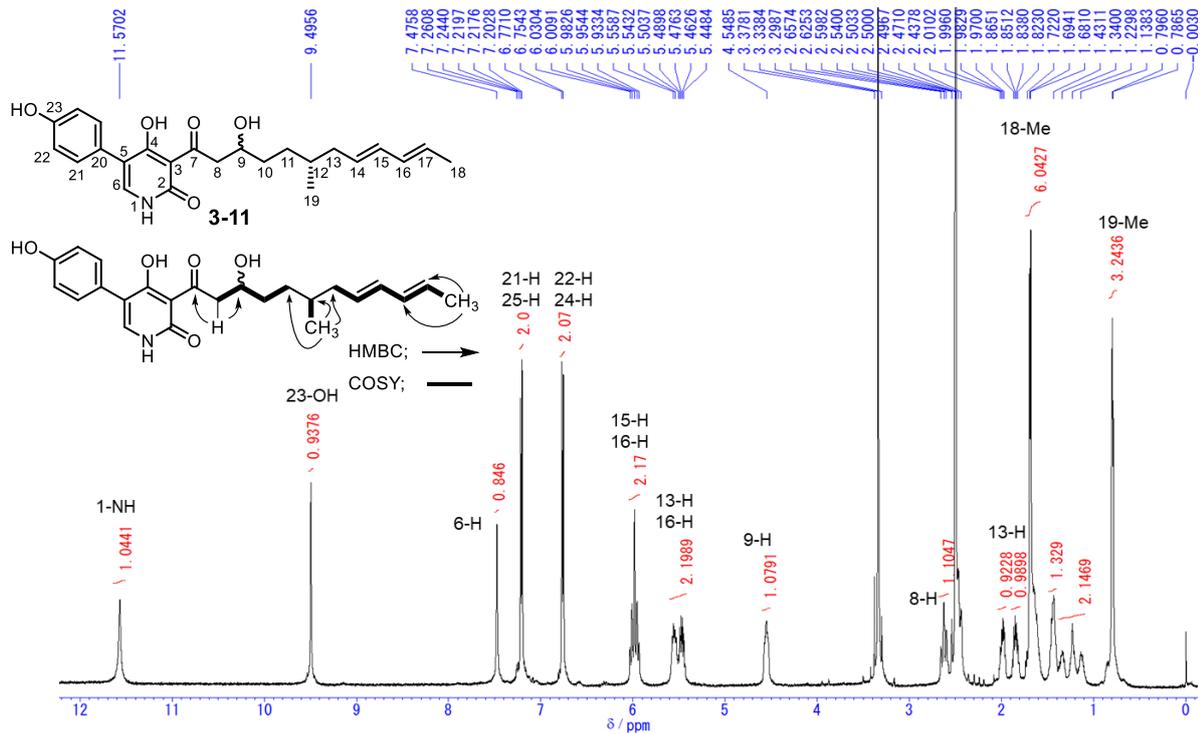


図 3-3-5. **3-11** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (in DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

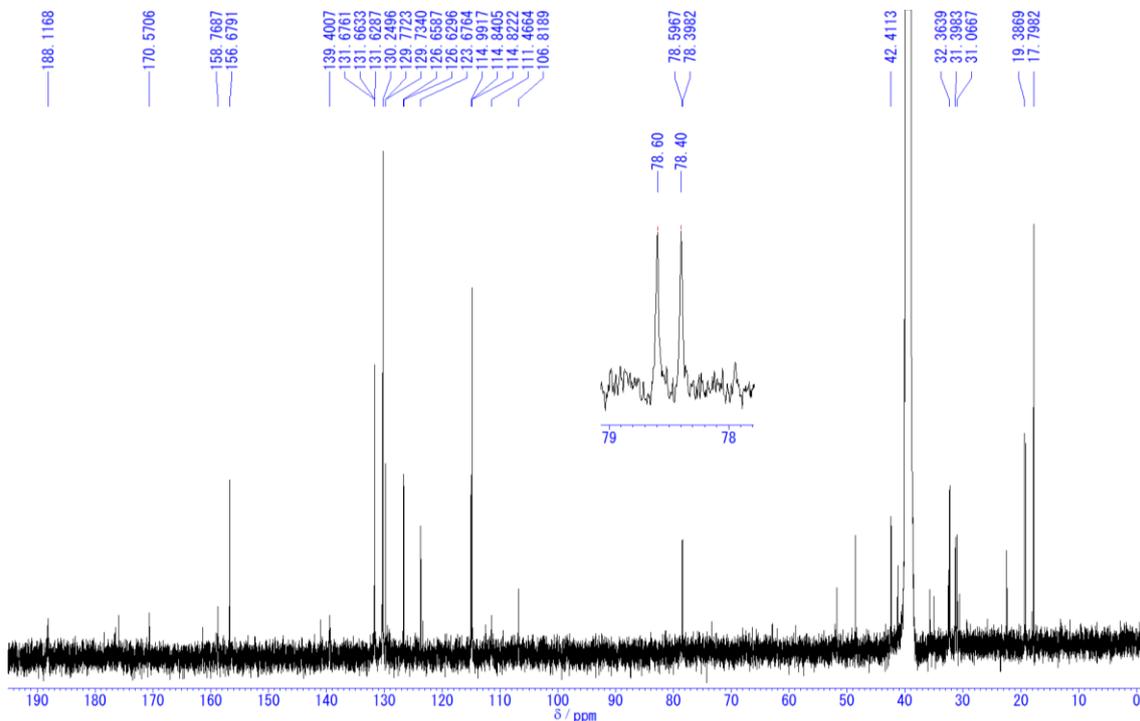


図 3-3-6. **3-11** の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトル (in DMSO- $d_6$ , 500 MHz)

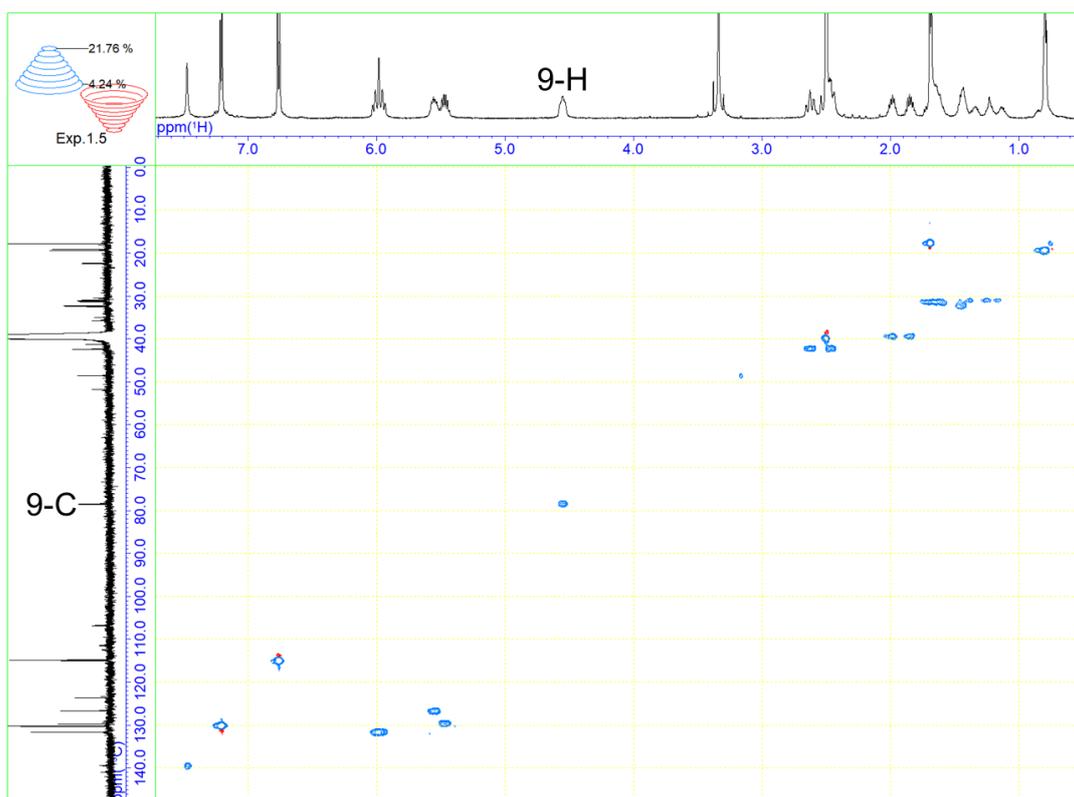


図 3-3-7. **3-11** の HSQC スペクトル (in DMSO-d<sub>6</sub>)

一方、保持時間 26.5 分のピークを単離し、<sup>1</sup>H-NMR 解析を行うと、パラ-2 置換ベンゼンに由来する 2H 分のダブルットシグナルが 2 つ ( $\delta_{\text{H}}$  7.25, 6.77) に加えて 4-ヒドロキシ-2-ピリドンのアミドプロトンに相当する 1H 分のシングレットシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  11.57) と 6 位オレフィンプロトンに相当する 1H 分のブロードシングレットシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  7.55) と、水素結合で低磁場シフトした 1H のブロードシングレットシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  16.90) が観測された (図 3-3-8)。さらにアリル位のメチル基に相当するシグナルが観測されない代わりにメチル基に相当するダブルットが 2 つ ( $\delta_{\text{H}}$  0.88, 0.75) 観測されたことから、[4+2]環化付加体であることを強く示唆していた。以上を参考に文献調査を行うと、糸状菌由来天然物 didymellamide B (**3-12**)<sup>13</sup> と <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-NMR の化学シフトが良い一致を示し、単一のジアステレオマーとして得られたことが分かった。

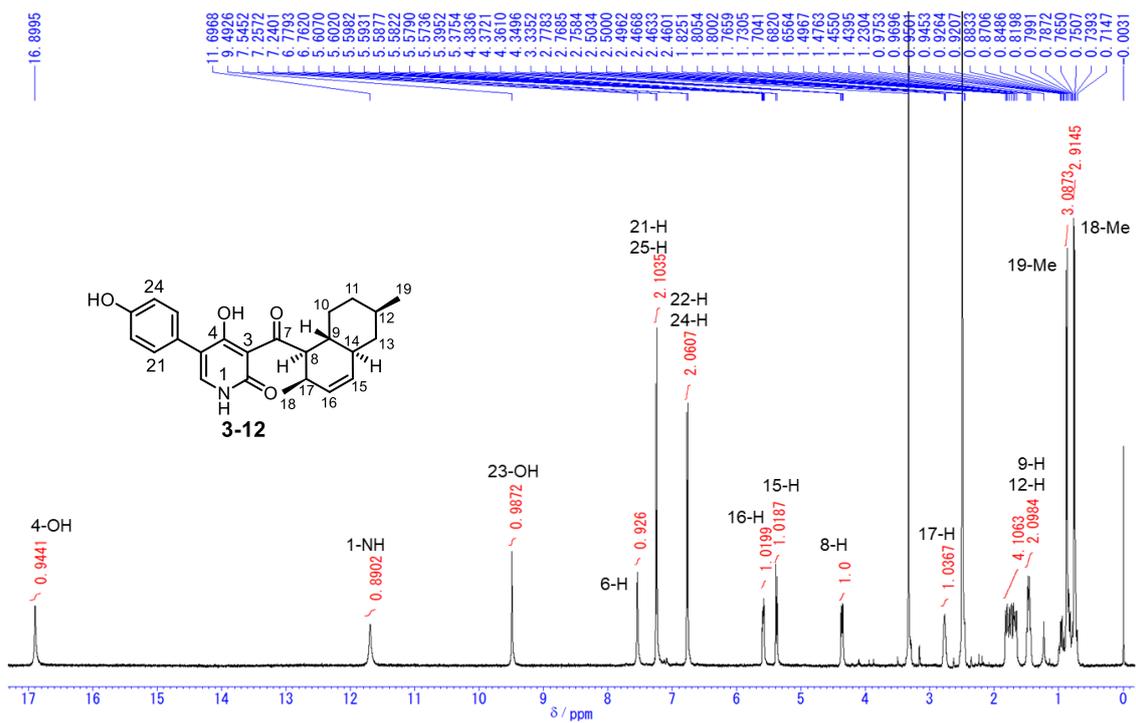


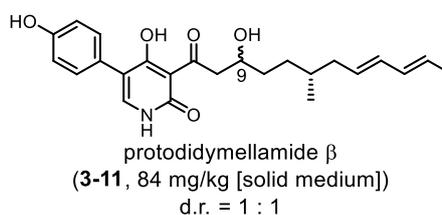
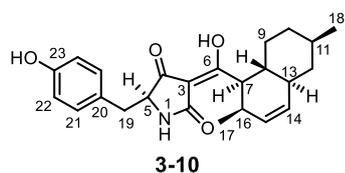
図 3-3-8. **3-12** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (in  $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz)

表 3-3-1. **3-10**, **3-11** の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR ケミカルシフト

	protodidymellamide $\alpha$ ( <b>3-10</b> ) <sup>#</sup>		protodidymellamide $\beta$ ( <b>3-11</b> ) <sup>*</sup>	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicity, $J$ in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (multiplicity, $J$ in Hz)
1		6.14 (s)		11.57 (s)
2	175.3		158.8	
3	101.9		106.8	
4	194.0		170.6	
5	63.5	3.97 (dd, 9.2, 3.2)	111.5	
6	37.3	2.65 (brdd, 13.8, 9.2) 3.16 (m)	139.4	7.48 (s)
7	192.0		188.1	
8	46.4	3.71 (dd, 11.8, 6.0)	42.4	2.54 (m)
9	33.2	1.51 (m)	78.4 (78.6)	4.55 (m)
10	29.9	0.94 (m) 1.77 (m)	31.3 (31.4)	1.65 (m) 1.65 (m)
11	33.0	1.00 (m) 1.73 (m)	31.0 (31.1)	1.23 (m) 1.23 (m)
12	35.2	1.51 (m)	32.3 (32.4)	1.43 (m)
13	41.5	0.81 (m) 1.73 (m)	39.5 <sup>  </sup>	1.85 (m) 1.92 (m)
14	41.8	1.83 (m)	129.7 (129.8)	5.47 (m) <sup>§</sup>
15	130.8	5.42 (brd, 10.3)	131.6 (131.7)	5.98 (m) <sup>§</sup>
16	131.0	5.56 (m)	131.6 (131.7)	5.98 (m) <sup>§</sup>
17	35.6	2.59 (m)	126.6 (126.7)	5.56 (m) <sup>§</sup>
18	17.9	0.94 (Me, d, 7.2)	17.8	1.68 (Me, d, 6.6)
19	22.5	0.91 (Me, d, 6.5)	19.2 (19.4)	0.79 (Me, m)
20	127.8		123.7	
21	130.3	7.02 (d, 8.1)	130.2	7.21 (d, 8.4)
22	115.7	6.74 (d, 8.1)	114.8	6.76 (d, 8.4)
23	155.1		156.7	
24	115.7	6.74 (d, 8.1)	114.8	6.76 (d, 8.4)
25	130.3	7.02 (d, 8.1)	130.2	7.21 (d, 8.4)

\*The chemical shifts shown in parentheses are for another diastereomer of **3-11**.

<sup>||</sup>Overlapped signal with the solvent peak. <sup>§</sup>Chemical shifts of olefin protons are nearly identical to those of prosolanapyrones<sup>14</sup>.



鎖状化合物 **3-11** は 1:1 のジアステレオマー混合物であることから、相対配置の決定は困難であった。そこでβ-ヒドロキシケトン部の脱水と、それに続く Diels-Alder 反応により環化体へ変換し、その構造を確認することとした。反応の進行は TLC で確認した (CHCl<sub>3</sub>/MeOH=6)。最初に水酸基の脱離を容易にするためアセチル化を行ったところ、原料 **3-11** に相当するスポット (R<sub>f</sub>=0.15) が消失し、モノアセチル体 **3-11a** に相当するスポット (R<sub>f</sub>=0.37) が生じた。これは反応性の高いフェノール性水酸基がアセチル化されたものの、9 位水酸基は未反応であることを示していた。そこで加熱条件下で反応を行ったところ、アセチル化と酢酸の脱離、続く Diels-Alder 反応が一挙に進行し、環化体 **3-13** (R<sub>f</sub>=0.75, 橙色の油状, 1.0 mg) を与えた (図 3-3-9)。

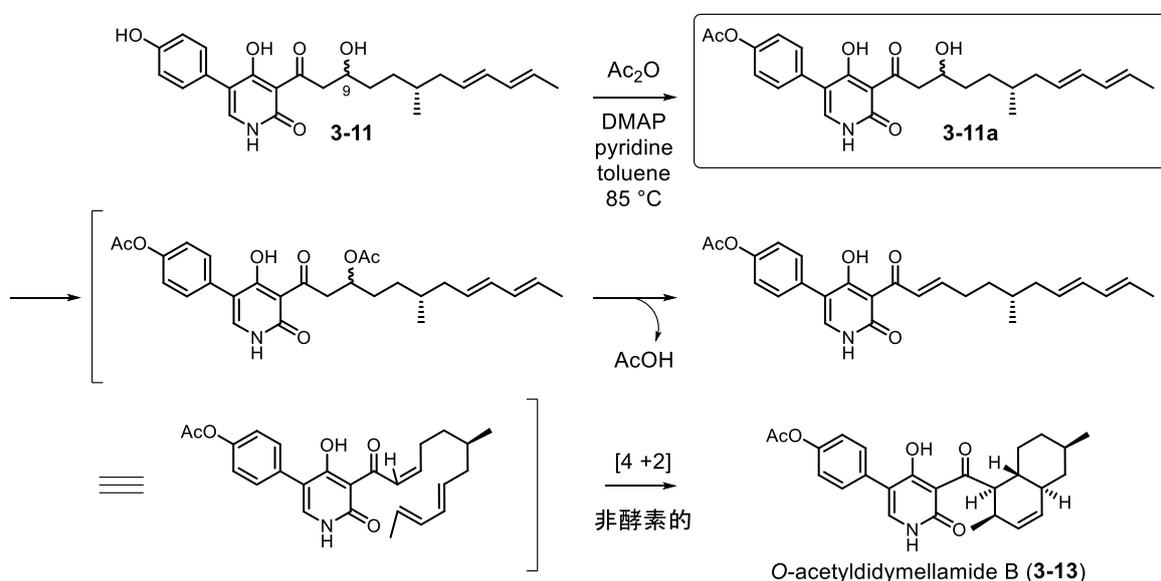


図 3-3-9. **3-11** のアセチル化と **3-13** の生成

環化体 **3-13** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを **3-12** のものと比較すると、23 位のフェノール性水酸基のシグナルが消失し、代わりに 2.25 ppm 付近にアセチル基由来の 3H 分のシングレットシグナルが生じた (図 3-3-10)。このことから、鎖状化合物 **3-11** のジアステレオマー混合物は 9 位水酸基の立体化学の違いによるものであり、その構造を確認することができた。

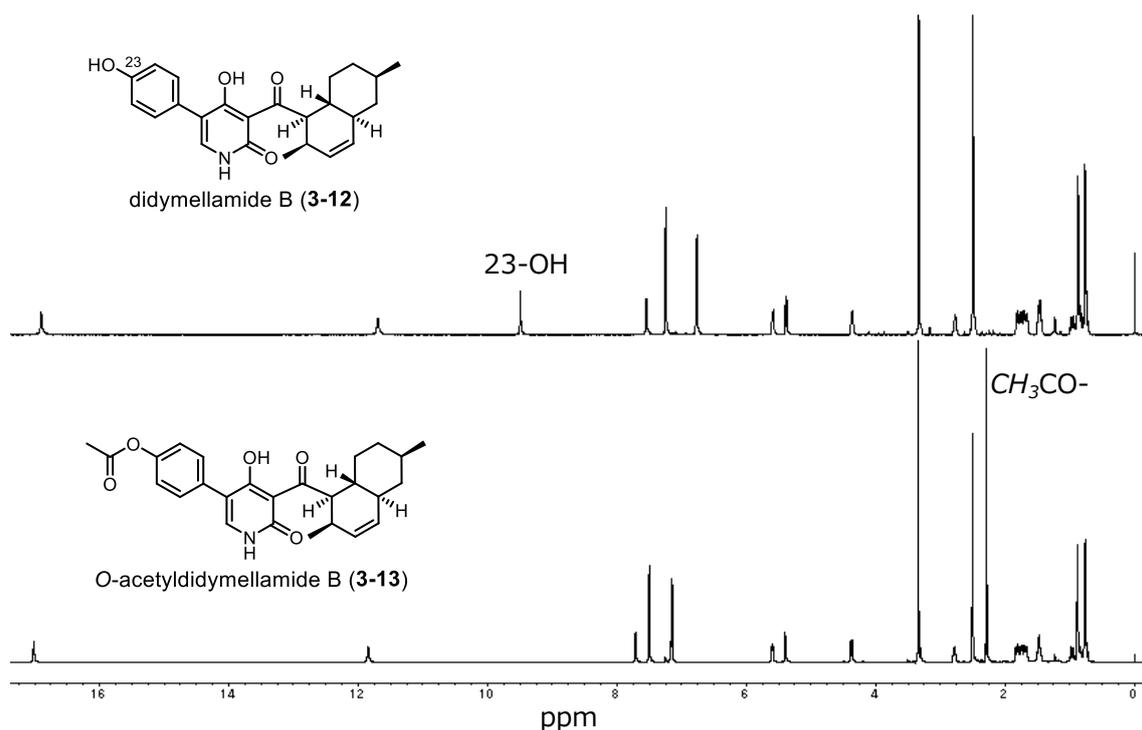


図 3-3-10.  $^1\text{H-NMR}$  spectra (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )

本アセチル化反応においてジアセテートが確認できず、後続の環化体が直接生成した理由として、9位水酸基がアセチル化するエネルギー障壁が、続く反応よりも高いため、いったんアセチル化すると直ちに脱離、[4+2]環化付加反応が進行したことが考えられる。

以上の結果に基づいて、通常のPKSの反応で、中間体がジアステレオマーとして生成するとは考え難く、ジエノフィルとなる $\alpha,\beta$ -不飽和ケトン構造を有する仮想中間体**3-14**が生合成され、[4+2]環化体**3-10**を与えたと考えるのが妥当である。これが正しいとした上で、**3-10**、**3-11**、**3-12**の生合成経路について考察する。**3-10**を生産する麹菌に対し*asolA*を追加導入すると環拡大反応が進行し2-ピリドン構造が形成され、**3-11**と**3-12**が得られた。**3-11**が形成されるためには、仮想中間体**3-14**から環拡大反応が進行して推定中間体**3-15**へ変換された後に、8,9位のジエノフィルが水和されれば良い。一方で水和されずに[4+2]環化付加反応が進行すると**3-12**に変換される(図3-3-11)。

環化体**3-12**の生合成経路は2種類考えられる。①先に述べた通り推定中間体**3-15**からの[4+2]環化付加による変換反応、もう1つは②既にデカリン骨格を形成しているテトラミン酸**3-10**から環拡大反応が進行する経路である。①の経路での生合成は**3-11**が得られたことから確かめられている。そこで②の経路でも反応が進行しているかを確認するため、微生物変換を行った。

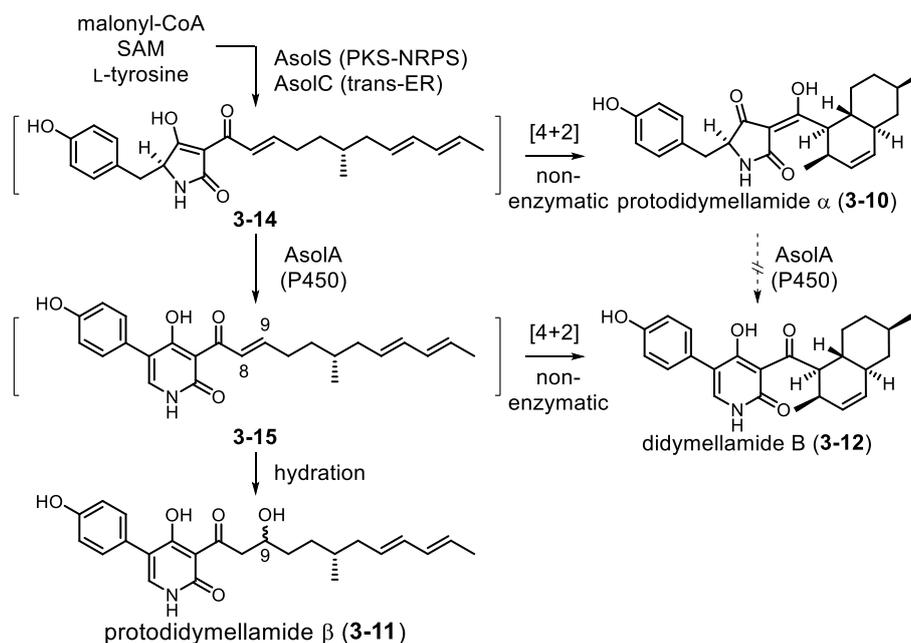


図 3-3-11. 化合物 **3-10**, **3-11**, **3-12** の生合成経路

環拡大酵素 *AsoA* が環化体 **3-10** を基質として受容するかを微生物変換によって確かめた。*AO-asoA* に対して **3-10** を投与し培養し、得られた代謝産物を LC-MS で解析したが、**3-10** の消失、並びに **3-12** の生成は確認できなかった (図 3-3-12)。以上より、*AsoA* の真の基質は単離不能な中間体 **3-14** であり、**3-10**, **3-11** は副生成物であることがわかった。

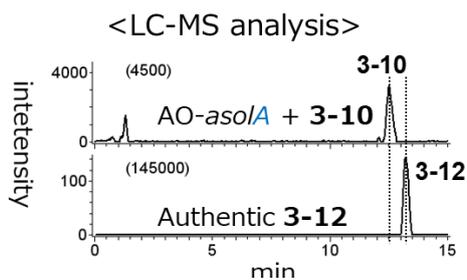


図 3-3-12. *AO-asoA* を用いた微生物変換

### 3-4. 考察

天然からは、*didymellamide* 類のようなデカリン骨格を有するピリドン化合物が比較的多く単離されており、例として糸状菌 *Apiospora*

*montagnei* から単離された *apiosporamide* (**3-16**)<sup>15</sup>, *Neosartorya fischeri* から単離された *fischerin* (**3-17**)<sup>16</sup> が挙げられる (図 3-4-1)。

*Didymellamide* 類や *apiosporamide* (**3-16**) は *endo* 付加体であるトランスデカリン骨格を有するのに対し、*fischerin* (**3-17**) では *exo* 付加体に相当するシスデカリンを有している (図 3-4-2)。一般的に Diels-Alder 反応は *endo* 則に従って *endo* 付加体の生成が優先することが知られており、水中での反応では *endo* 選択性が顕著に増大することも報告されている<sup>17</sup>。*Didymellamide* の生合成経路では、Diels-Alderase (DAase) に相当する遺伝子配列がクラスター内に存在せず、非酵素的に *endo* 付加体 **3-10** や **3-12** が単一の生成物として得られた事実と矛盾しない。一方で *fischerin* (**3-17**) は、*didymellamide* 類のデスマチル体に対応する鎖状中間体から、エネルギー的に不利な *exo* 付加体が唯一の化合物として得られることから、その生合成経路には DAase が関与し *exo* 選択的な環化反応を触媒すると推測される。実際に *fischerin* と同様にシスデカリンを有する *solanapyrone* の [4+2]環化付加におけるジアステレオマーの生成比について検討されている。異なる溶媒中で、DAase の存在/非存在下で検討したところ、DAase である Sol5 非存在条件下では非酵素的な環化が進行し、天然では存在比が少ない *endo* 付加体が優先的に生成する。一方で Sol5 が存在する場合には天然での存在比が多い *exo* 付加体の生成が優先すると報告されている<sup>17</sup>(図 3-4-2)。

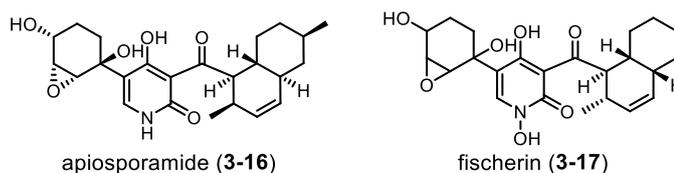


図 3-4-1. デカリン骨格を有する 2-ピリドン化合物

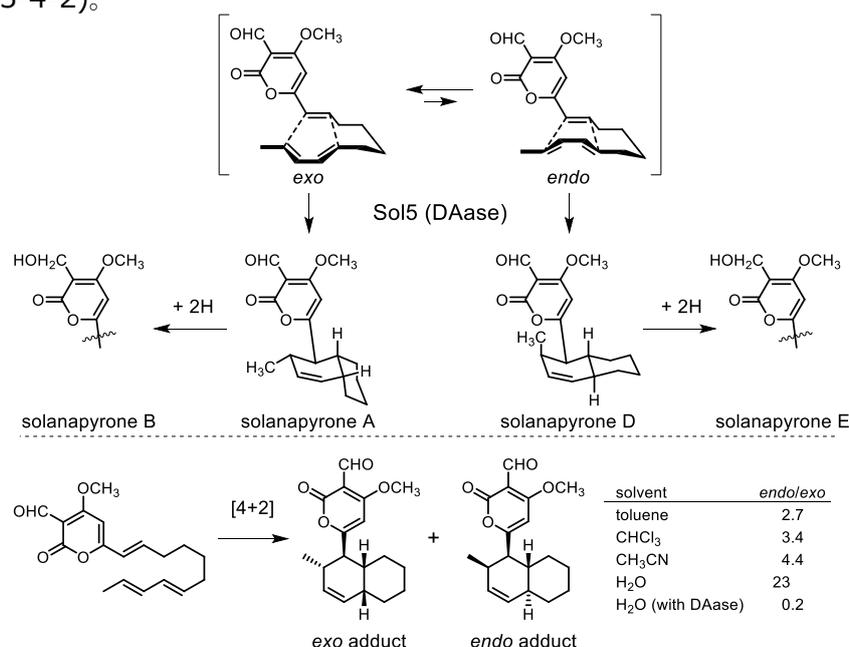


図 3-4-2. Diels-Alderase (Sol5) の有無による *endo/exo* 付加体の生成比 (水中)

Fischerin 生合成遺伝子クラスター中に DAase が存在するか確かめるため、ゲノム公開株である *Neosartorya fischeri* NRRL 181 のゲノムデータに対して *asolS* による相同性検索を行った。その結果、たった 1 つの PKS-NRPS を含む遺伝子クラスターを発見したが、[4+2]環化付加が生合成機構に関与しない aspyridone 生合成遺伝子クラスター (*apd*) と遺伝子の種類と配置が一致し、その相同性は約 90% と高く、aspyridone 系天然物の生合成遺伝子クラスターであることを支持していた<sup>11</sup>。前節 3-2 において言及した solanapyrone 生合成遺伝子のように、属、および種まで一致した微生物であっても、株の違いにより遺伝子クラスター自体が存在しないという例があるため、fischerin 生合成遺伝子クラスターも同様であると考えられる。

3 章において、alternaric acid (**3-1**) の生合成遺伝子特定も試みたが、予期せず didymellamide 類の生合成遺伝子クラスターの機能を解析した。今後、ゲノムワイドな発現解析などを行うことで alternaric acid 生合成遺伝子クラスターの発見が期待される。

### 3-5. まとめ

本研究では、テルペン環化酵素のようなアミノ酸配列から機能の有無をある程度判断可能な配列よりも難易度の高い PKS-NRPS について、発現解析と切り出しに関与するドメインが存在しているかの解析を行い、機能する可能性が高い配列を絞り込んでゲノムマイニングに供した。その結果、導入した生合成遺伝子は忠実に機能し、新規化合物である **3-10** および **3-11** の単離に成功したほか、天然物である **3-12** を異種生産することができた。本研究を通して、生産菌において発現が確認できているにもかかわらず、著量の化合物を生産していない遺伝子クラスターであっても、麹菌において異種発現することで代謝産物の構造決定が可能であることを示した。

本研究で得られた **3-10** のように、デカリン骨格を有する天然物は数多く知られており<sup>18,19</sup>、この一群の生合成経路には DAase が関与すると考えられていた。例えば **3-10** と同様にデカリンとテトラミン酸構造を有する Fusarisetin は、2011 年に Jang らによって糸状菌 *Fusarium* sp. FN080326 より単離された 5 環性の複雑な骨格を有するポリケタイド系天然物である<sup>20</sup>。2015 年には Kato らによる遺伝子破壊実験から fusarisetin 生合成遺伝子クラスター (*fsa* クラスター) が発見され、*fsa* クラスターから DAase 遺伝子である *fsa2* が見出された<sup>21</sup>。Fusarisetin の生合成中間体である trichosetin と、そのジアステレオマーの生成比は、Fsa2 非存在下では *exo/endo* = ~3 であるのに対し、Fsa2 存在下では天然型である *endo* 付加体が 100% で生成する。この環化体生成比は先に述べた *endo* 則に合致しない結果であるが、分子内 Diels-Alder 反応では分岐メチル基の影響により、必ずしも *endo* 体が優先しない。しかし DAase は、活性部位における疎水性相互作用などによって基質単独ではエネルギー障壁が大きく不安定なコンフォメーションの形成を補助すると考えられており、この作用により不利な環化様式で反応を進行させると推定された。以上から、テトラミン酸とデカリンを有する天然物の生合成において、[4+2]環化前駆体の構造と DAase の有無が最終生成物の立体化学に重大な影響を与える。

2 章、3 章で得られたデカリン構造を有する化合物は、全て単一の立体構造で得られており、DAase の非存在下で [4+2]環化が進行する初めての例となった。これにより、糸状菌由来ポリケタイドに数多く存在する [4+2]型付加物は、酵素的及び非酵素的環化の 2 種の様式があることが提唱できた。さらに、デカリン骨格を有するポリケタイド系天然物が多いことから、Bet1 や AsolS を含む PKS が [4+2]環化付加反応に都合の良い鎖状中間体の生成を優先していることが示された。従来は lovastatin のように、PKS と共有結合した鎖状中間体にジェノフィルが生じた時点でデカリン骨格を形成する経路が一般的と言われてきた。しかし、今回の betaenone, didymellamide 類の生合成研究においては、炭素鎖伸長が終了した後に環化が進行していたため、lovastatin とは異なり、こちらの反応機構の方が一般的であると推定できた。

以上、第 3 章では、第 2 章での標的化合物を設定した PKS 異種発現よりも難易度の高いゲノムマイニングを成功させた。このことから、麹菌異種発現系は PKS のような複雑な機能を有する酵素についても、その活性を忠実に再現可能なことが改めて証明された。

## References

- 1) R. Chiba, A. Minami, K. Gomi, and H. Oikawa, *Org. Lett.* **2012**, *15*, 594.
- 2) P. W. Brian, P. J. Curtis, H. G. Hemming, C. H. Unwin, J. M. Wright, *Nature* **1949**, *164*, 534.
- 3) A. Stoessl, and J. B. Stothers, *Can. J. Chem.* **1984**, *62*, 549.
- 4) H. Tabuchi, H. Oikawa, and A. Ichihara, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 125.
- 5) H. Tabuchi, H. Oikawa, and A. Ichihara, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1994**, 2833.
- 6) I. Fujii, N. Yoshida, S. Shimomaki, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1301.
- 7) K. Kasahara, I. Fujii, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 920.
- 8) K. Kasahara, Doctoral thesis, University of Tokyo, **2007**.
- 9) K. Eppelmann, T. Stachelhaus, and M. A. Marahiel, *Biochemistry* **2002**, *41*, 9718.
- 10) X-L. Yang, T. Awakawa, T. Wakimoto, and I. Abe, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1583.
- 11) W. Xu, X. Cai, M. E. Jung, and Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 13604.
- 12) M. N. Heneghan, A. A. Yakasai, L. B. Halo, Z. S. Song, A. M. Bailey, T. J. Simpson, R. J. Cox, and C. M. Lazarus, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1508.
- 13) A. Haga, H. Tamoto, M. Ishino, E. Kimura, T. Sugita, K. Kinoshita, K. Takahashi, M. Shiro, and K. Koyama, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 750.
- 14) K. Kasahara, T. Miyamoto, T. Fujimoto, H. Oguri, T. Tokiwano, H. Oikawa, Y. Ebizuka, and I. Fujii, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1245.
- 15) A. A. Alfatafta, J. B. Gloer, *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1696.
- 16) H. Fujitomo, M. Ikeda, K. Yamamoto, and M. Yamazaki, *J. Nat. Prod.* **1993**, *56*, 1268.
- 17) H. Oikawa, T. Kobayashi, K. Katayama, Y. Suzuki, and A. Ichihara, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8748.
- 18) H. Oikawa and T. Tokiwano, *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 321.
- 19) G. Li, S. Kusari, and M. Spiteller, *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31*, 1175.

20) J-H. Jang, Y. Asami, J-P. Jang, S-O. Kim, D. O. Moon, K-S. Shin, D. Hashizume, M. Muroi, T. Saito, H. Oh, B. Y. Kim, H. Osada, and J. S. Ahn, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 6865.

21) N. Kato, T. Nogawa, H. Hirota, J-H. Jang, S. Takahashi, J. S. Ahn, and H. Osada, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *460*, 210.

## 第4章 本論-抗腫瘍活性ポリケタイド cyclohelminthol 類の生合成研究

### 4-1. Cyclohelminthol および類縁体の生合成に関する研究の背景

2017年にTanakaらは、糸状菌 *Helminthosporium velutinum* yone96より抗腫瘍活性ポリケタイド cyclohelminthol X (4-1) を単離した (図 4-1-1)<sup>1</sup>。本化合物は、スクシンイミドとシクロペンテン構造が連結した 6 置換シクロプロパン骨格を有する点が特徴的である。類似の構造は、2014年にQuesadaらが海産糸状菌 *Paraconiothyrium* sp. HL-78-gCHSP3-B005より単離した AD0157 (4-2)<sup>2</sup>にも存在するが、塩素が置換した炭素周りの化学シフトが異なっていたことから、両者は異なる構造であると結論付けられている。また、*H. velutinum*からはシクロペンテン骨格を有する cyclohelminthol I (4-3) および塩素化類縁体 (4-4, 4-5, 4-6) も単離されている (図 4-1-1)<sup>3</sup>。その炭素骨格が 4-1 に存在するシクロペンテン構造と類似していたことに加え、天然から terrein (4-7) や palmaenone A (4-8) などのシクロペンテン骨格を有する化合物が単離されていることから、スクシンイミドとシクロペンタジエノンが各々生合成された後、生合成の最終工程で各ユニットが連結する収束型の生合成経路が提案されている (図 4-1-2)<sup>1</sup>。すなわち、PKS-NRPS の作用によってトランスデカリン骨格が構築された後、①ピロリノン環上でのセミピナコール様の転移反応<sup>4</sup>、②デカリン環上でのピナコール様の転移反応を経て、マレイミド構造をもつユニット A が生合成される。次いで、別途生合成されたシクロペンタジエノンユニット B との間でマイケル付加反応を起点とした 3 員環の構築により 6 置換シクロプロパン骨格が構築されるという生合成経路である。

この生合成仮説が正しければ、基本炭素骨格構築後の修飾反応には有機化学的にも興味深い変換反応が多く、複雑な化学反応を触媒する酵素の特定や機能解析における麹菌異種発現系の有用性を立証するのに適した研究対象であると考えられた。後節 4-2 で述べるように、cyclohelminthol X の生合成遺伝子クラスターを特定したのと時を同じくして、マレイミド構造をもつユニット A と類似した天然物の生合成経路が明らかにされた。そこで 4 章では主にシクロペンタジエノンユニット B、並びにその構造類縁体である terrein (4-7) の生合成酵素遺伝子 (骨格構築酵素遺伝子及び修飾酵素遺伝子) の特定と機能解析の結果について記載する。

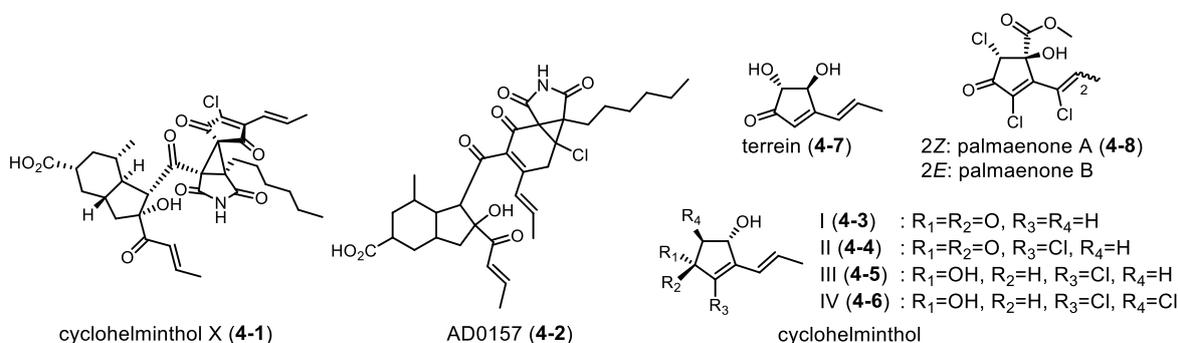


図 4-1-1. Cyclohelminthol 類の類縁体

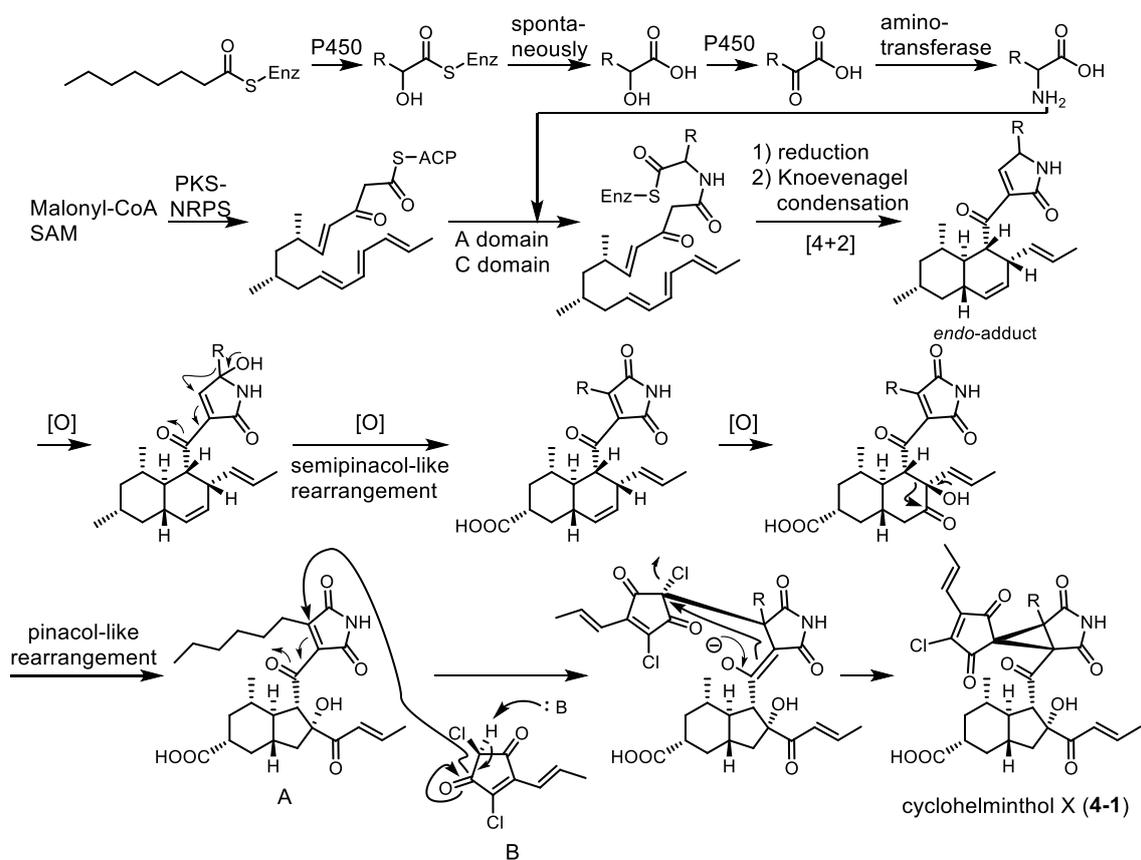


図 4-1-2. Cyclohelminthol X (**4-1**)の推定生合成経路

## 4-2. Cyclohelminthol 類合成遺伝子の探索

Cyclohelminthol 類の生合成遺伝子を探索するため、生産菌 *H. velutinum* yone96 のドラフトゲノムシーケンスを行った。前節 4-1 にて述べた予想生合成経路が正しければ、スクシンイミド側鎖のアルキル鎖を合成する PKS と、6,5-縮環骨格の構築に関わる PKS-NRPS が近傍に存在するはずである。相同性探索の結果、両者が近傍に存在する *chx* クラスターを発見した (図 4-2-1, 上段)。*chx* クラスターの発見と同時に、cyclohelminthol X の構造中に見られる 5,6 員環とスクシンイミド構造を有する天然物 oxaleimide B (4-9) の生合成遺伝子クラスター (*pox* クラスター) が特定された (図 4-2-1, 下段)<sup>5</sup>。*pox* クラスターは HR-PKS である *poxF*、PKS-NRPS である *poxE*、trans-ER である *poxP*、3つの P450 酸化酵素遺伝子 *poxC*, *D*, *M*、Diels-Alderase 遺伝子 *poxQ*、ピロリノン骨格生成を担う $\alpha,\beta$ -ヒドロラーゼ (加水分解酵素) 遺伝子 *poxO*、アミノ基転移酵素遺伝子 *poxL* と、その他の自己耐性、修飾酵素遺伝子で構成されていた。*chx* クラスターと *pox* クラスターで共通する遺伝子間ではそれぞれ 70%前後の高い相同性が見られたため、4-1 の生合成に関与していると示唆された (図 4-2-1)。しかし、*chx* クラスターのみ存在する遺伝子には cyclohelminthol I-IV の生合成に関わる骨格構築酵素遺伝子が存在しなかったこと、oxaleimide に相当する部分構造が cyclohelminthol 生産菌から単離されていないことから、penitrem などで見られるように、生合成遺伝子クラスターが分断されていると考えられた<sup>6</sup>。そこで、cyclohelminthol I-IV の生合成遺伝子の探索を行うことにした。

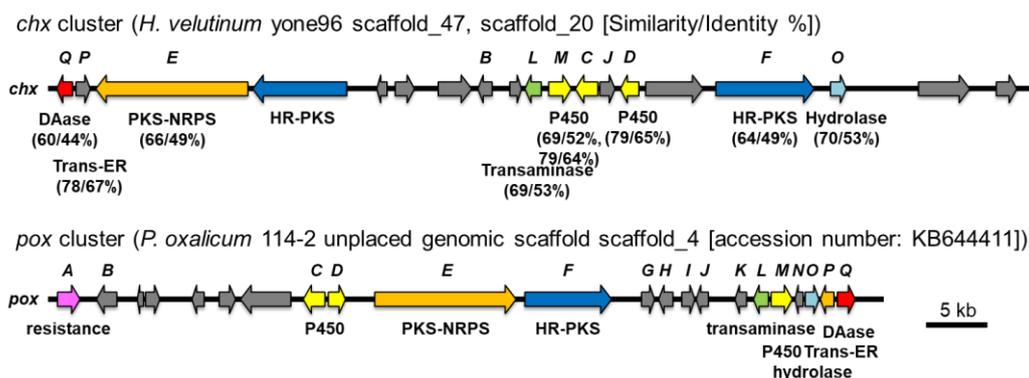
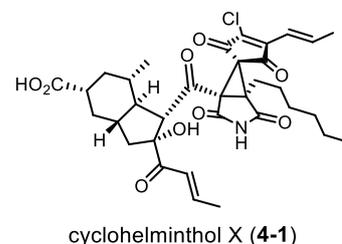
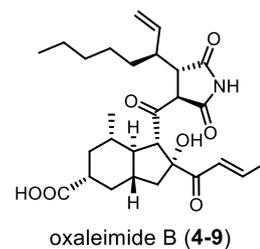


図 4-2-1. *P. oxalicum* 由来の *pox* クラスターと *H. velutinum* 由来の *chx* クラスター

Cyclohelminthol I-IV は、1935 年に Raistrick と Smith によって *Aspergillus terreus* から単離された (+)-terrein (4-7) と類似したシクロペンテン骨格を有する<sup>7</sup>。その生合成経路は、1981 年の Hill らによる<sup>13</sup>C 同位体標識実験から、ポリケタイドである

6-hydroxymellein (**4-10**) が中間体であると明らかにされている<sup>8</sup>。また、2014年に Zaehle らは、遺伝子破壊実験を基に terrein 生合成遺伝子クラスター (*ter* クラスター) を特定し、*Aspergillus niger* での異種発現から共通中間体 **4-10** の構築に NR-PKS である *terA* と DH-KR ジドメインである *terB* が関与することを明らかにした<sup>9</sup>。標識酢酸の取り込み様式を考慮すると、**4-10** から **4-7** への変換には、①酸化を伴う脱炭酸反応、②2,4位炭素間での環縮小反応 (ファボルスキー様転位)、③脱炭酸反応が進行すると考えられたが (図 4-2-2, 上図)、その詳細は解明されていない。類似の環縮小反応は、2015年に Ferreira らが糸状菌 *Rousoella* sp. DLM33 より単離した roussoellatide の生合成においても提唱されている (図 4-2-2, 下図)<sup>10</sup>。しかしラベルパターンは terrein と異なり 3,5位炭素間での環縮小反応を示唆しており、異なる酵素で環縮小が触媒されると考えられる。

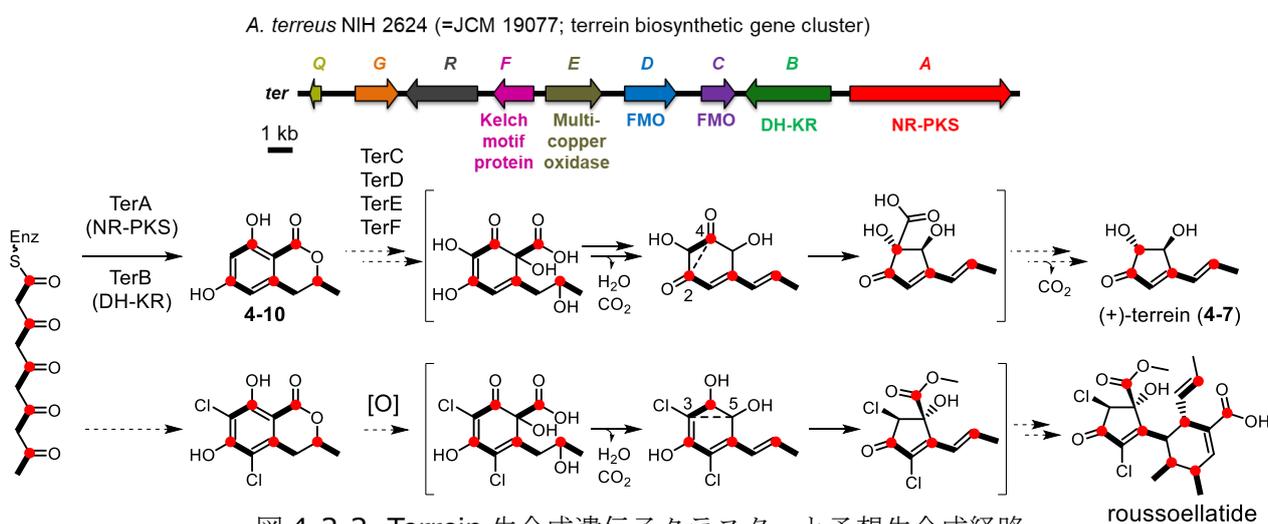


図 4-2-2. Terrein 生合成遺伝子クラスターと予想生合成経路

以上の推定から、**4-10** の生産に必要な NR-PKS である *terA*、DH-KR ジドメインである *terB* ホモログをクエリーとして cyclohelminthol I-IV の生合成遺伝子クラスターを探索したところ、以下の *chm* クラスターが得られた。*chm* 遺伝子クラスターは、*terA*、*terB* と 54% の identity を示す *chmA*、*chmB* に加え、フラビン依存酸化酵素 (FMO) 遺伝子である *terC* と相同性を示す *chmC* と、2つのフラビン依存ハロゲン化酵素遺伝子 *chmK*、*chmN*、メチル基転移酵素遺伝子 *chmP*、その他 4つの修飾酵素遺伝子で構成されていた (図 4-2-3)。

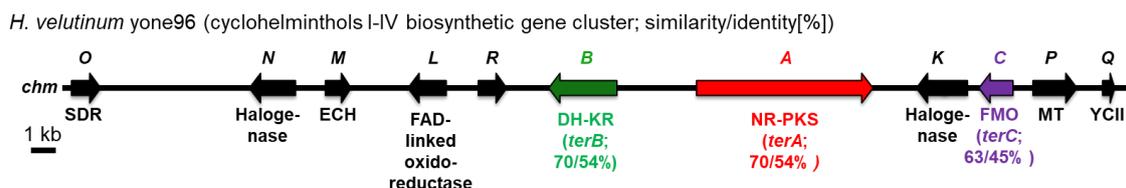


図 4-2-3. Cyclohelminthols 予想生合成遺伝子クラスター (*chm*)

特定した *chm* 遺伝子クラスターには Cyclohelminthol 類の生合成に必要なと考えられる遺伝子が含まれていたが、*terrein* の生合成遺伝子と共通する酵素遺伝子は *chmABC* の 3 種のみであった。生合成遺伝子破壊実験から *terrein* の生合成に関与すると提唱されていた 6 つの遺伝子のうち、*terDEF* が *chm* 遺伝子クラスターの近傍に位置していなかったことから遺伝子クラスターが分断されているなどの可能性を考慮し、シクロペンテン骨格を有する天然物 palmaenone の生合成遺伝子クラスターの探索も行った。

Palmaenone は、2011 年に Matsumoto らによって糸状菌から単離されたポリケタイド系天然物である。Terrein や cyclohelminthol と同じシクロペンテン骨格を有するが、シクロペンテン骨格上にメチルエステルと 2 つの塩素が置換されていることに加え、側鎖にも塩素が置換されている点が異なる (図 4-2-4)<sup>11</sup>。Palmaenone 生産菌である *Lachnum palmae* NBRC 106495 のドラフトゲノムシーケンス解析を行い、*chmA* を指標とした相同性検索を行うと、以下の *plo* クラスターが得られた。得られた *plo* クラスターにおいても、先に述べた 3 種の酵素遺伝子のホモログである *ploABC* が隣り合って存在していたが、*terDEF* ホモログは近傍に位置していなかった。その代わりに、*chm* クラスターに存在したメチル基転移酵素遺伝子のホモログである *ploP*、フラビン依存ハロゲン化酵素遺伝子のホモログである *ploK* が隣接していた。さらに、*chm* クラスターに存在する修飾酵素遺伝子をクエリーとすることで、異なるコンティグではあるものの、もう 1 つのフラビン依存ハロゲン化酵素遺伝子 *ploN* やその他 3 つの修飾酵素遺伝子 *ploLMD* を発見した (図 4-2-4, 下図)。図 4-2-2, 4-2-3 で示した *ter*, *chm* クラスターも再度示す。各遺伝子の下にはホモログ酵素の種類と相同性を記載した。

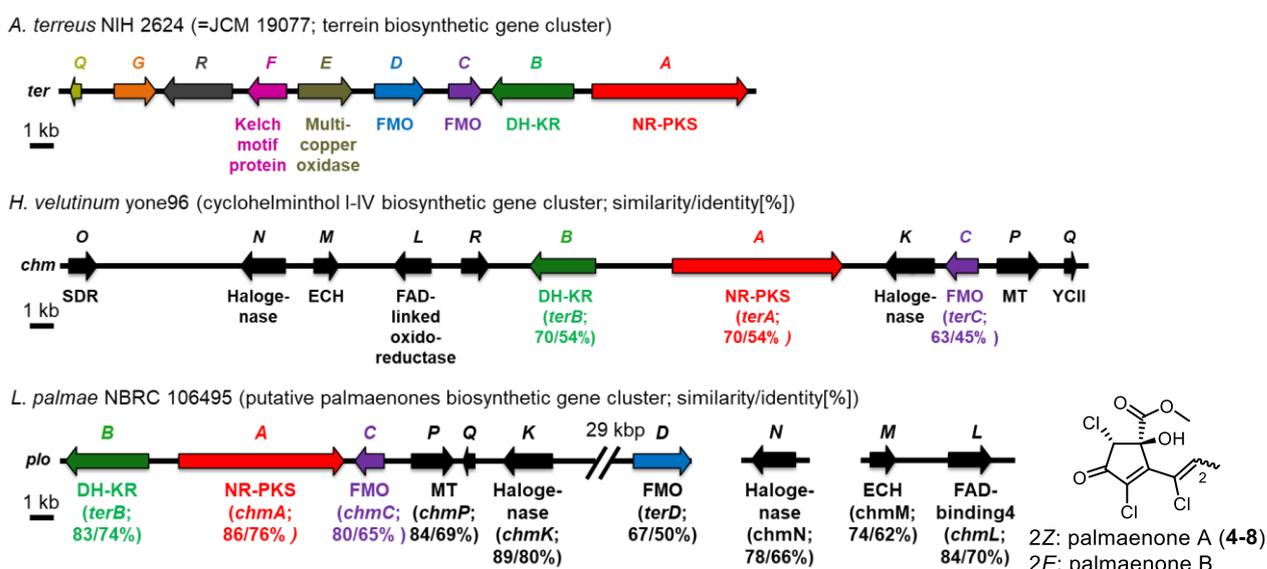


図 4-2-4. Palmaenone 予想生合成遺伝子クラスター (*plo*) と *ter*, *chm* クラスター

表 4-2-1 には、注目した *chm*, *ter*, *plo*, 3 つのクラスターにある遺伝子の相同性をまとめた。3 者に共通して保存されている *chmA*, *B*, *C* ホモログは共通経路の反応を触媒する酵素であると予想され、また、*plo* と *chm* クラスターにのみ共通する *chmK*, *N* (ハロゲン化酵素遺伝子) と *chmL*, *M*, *P* は cyclohelminthol と palmaenone の生合成にのみ共通する修飾反応を触媒すると予想された。特定のクラスターにのみ存在する遺伝子は、①経路特異的な反応に関与する、②反応には関与しない、のいずれかであると考えた。

*chmQ* に関しては、全ての遺伝子クラスターにホモログが保存されているものの、当初は生合成に関与していないと考えていた。着目した経緯と機能解析については後節 4-3 で述べる。

表 4-2-1. *chm* クラスターにおける生合成遺伝子の保存性と相同性

	Deduced function (homologue, NCBI accession number, species)	Homologue in <i>ter</i> cluster Similarity/Identity	Homologue in <i>plo</i> cluster Similarity/Identity
<i>chmO</i>	Short-chain dehydrogenase ( <i>Talaromyces cellulolyticus</i> , GAM33752.1, 88/76%)	-	-
<i>chmN</i>	Tryptophan halogenase ( <i>Aspergillus oryzae</i> , OOO09522.1, 65/50%)	-	<i>ploN</i> 78/66%
<i>chmM</i>	Enoyl-CoA hydratase ( <i>Trichoderma Gamsii</i> , XP_078663240.1, 55/39%)	-	<i>ploM</i> 74/62%
<i>chmL</i>	Isoamyl alcohol oxidase ( <i>Phialosimplex</i> sp. HF37, RMJ24924.1, 58/41%)	-	<i>ploL</i> 84/70%
<i>chmR</i>	Hypothetical protein ( <i>Periconia macrospinosa</i> , PVH98313.1, 86/85%)	-	-
<i>chmB</i>	KR-DH-domain containing protein ( <i>Cladonia uncialis</i> , ANM27729.1, 72/57%)	<i>terB</i> 70/54%	<i>ploB</i> 83/74%
<i>chmA</i>	Polyketide synthase ( <i>Cladonia uncialis</i> , ANM27730.1, 75/59%)	<i>terA</i> 70/54%	<i>ploA</i> 86/76%
<i>chmK</i>	Tryptophan-2-halogenase ( <i>Tolypocladium ophioglossoides</i> , KND87338.1, 75/63%)	-	<i>ploK</i> 89/80%
<i>chmC</i>	Para-nitrophenol 4-monoxygenase ( <i>Aspergillus lentulus</i> , GAQ03944.1, 66/48%)	<i>terC</i> 63/45%	<i>ploC</i> 80/65%
<i>chmP</i>	O-methyltransferase ( <i>Periconia macrospinosa</i> , PVH98318.1, 99/99%)	-	<i>ploP</i> 84/69%
<i>chmQ</i>	YCII-related domain protein ( <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , EQB43918.1, 50/34%)	<i>terQ</i> 56/35%	<i>ploQ</i> 76/60%

*chm* クラスターが cyclohelminthol 類の生合成に関与していることを確かめるため、生産菌での発現解析を行った。文献記載の条件にて *H. velutinum* yone96 を培養し、得られた粗抽出物を UPLC-MS で解析した結果、保持時間 2.66 分に 4-1 のピークを観測した。この化合物を単離して <sup>1</sup>H-NMR を測定したところ、文献値と良い一致を示した<sup>1</sup> (図 4-2-5)。

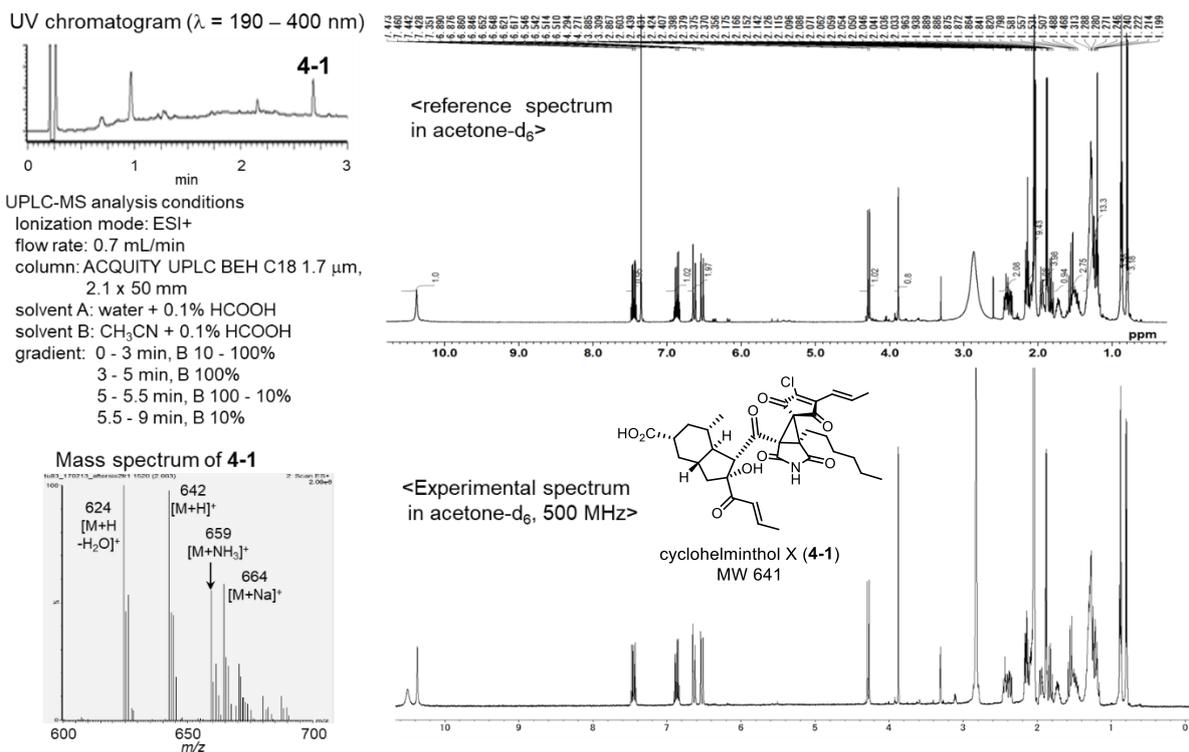


図 4-2-5. *H. velutinum* yone96 における **4-1** の生産性確認

Cyclohelminthol X (**4-1**) の生産が確認できたことから *chx* クラスターは発現していることが支持された。しかし *chm* クラスターも共発現しているかは不明であったので、この条件で培養した生産菌から total RNA を抽出し、逆転写後、*chmC*、*chmK*、*chmQ* について RT-PCR を行った。その結果、目的サイズの DNA 断片が検出されたことから、着目している *chm* クラスターの遺伝子の転写と cyclohelminthol X (**4-1**) の生産が対応していることがわかった (図 4-2-6)。

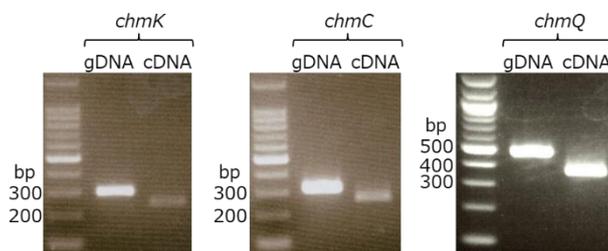


図 4-2-6. *chm* 遺伝子の発現確認

### 4-3. 異種発現系を利用した *terrein* 系天然物生合成遺伝子の機能解析

前節 4-2 で取得した *chm* 遺伝子クラスターについて機能解析を行った。基本骨格である **4-10** の生産に関与すると予想された、分断された PKS である *chmA* と *chmB* を麹菌発現用ベクター pUARA2 (*argB*) の、でんぷんやマルトースで発現が誘導されるプロモーター *PamyB* 制御下にそれぞれ導入した。続く生合成前期の修飾反応を触媒すると予想されたハロゲン化酵素遺伝子 *chmK*, *chmN* もしくは *chmK* のホモログである *plOK* はそれぞれ pUSA2 (*sC*) へ導入した。生合成後期の修飾反応を触媒すると予想されたフラビン依存酸化酵素遺伝子 *chmC*, メチル化酵素遺伝子 *chmP*, フラビン依存酸化還元酵素遺伝子 *chmL* を pAdeA2 (*adeA*) に導入し、酸化還元酵素遺伝子 *chmO*, 水和酵素遺伝子 *chmM* を pUNA2 (*niaD*) へ導入し、YCII superfamily タンパク質遺伝子 *chmQ* を pDP103 (CRISPR/Cas9 donor) へ導入した。さらに、*chmC*, *Q*, *D* のホモログである *terC*, *Q*, *D* を pDP103 に導入した。構築したプラスミドを用いて、2, 3 章と同様の手法で麹菌形質転換体を調製した。

#### 4-3-1. *Cyclohelminthol* 類の生合成前期に関与する生合成遺伝子の機能解析

本項では AO-*chmAB*, AO-*chmABK*, AO-*chmABN*, AO-*chmABKN* に関する実験結果を記載する。麹菌形質転換体は全て米培地で培養し代謝産物を得ている。詳細は図 4-3-1-1 にまとめた。

最初に基本骨格 **4-10** を生産すると予想された AO-*chmAB* を調製し、代謝産物を UPLC で解析した結果、目的通りに **4-10** と、野生株には見られない **4-11** のピークが観測された (**4-10**: 234 mg, **4-11**: 115 mg / kg)。HR-MS より、それぞれの分子式は **4-10**: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>, **4-11**: C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> と決定した。**4-10** の <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-NMR スペクトル<sup>12</sup> と旋光度 ([α]<sub>D</sub><sup>26</sup> -60.0 (c 2.0 MeOH)) が 6-hydroxymellein の文献値 ([α]<sub>D</sub><sup>22</sup> -57 (c 0.07 MeOH)<sup>13</sup>) と良く一致したことから、(3*R*)-6-hydroxymellein であることがわかった。**4-11** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトルは共通中間体 **4-10** と類似していたが、芳香族領域でのシグナルが 1H 分しか観測されなかった。分子式とあわせて考えると芳香環に水酸基が置換していると考えられたため、関連化合物の NMR スペクトルと比較した結果、既知化合物 (3*R*)-5,6-dihydroxymellein (**4-11**) と良い一致を示した (図 4-3-1-2)<sup>14</sup>。AO-*chmAB* には酸化酵素を導入していないことを考えると、5 位への水酸基の導入は麹菌由来の酸化酵素によるものと考えている。類似の酸化反応は、前述した *A. niger* における *terA*, *B* の異種発現でも確認されている<sup>9</sup>。

続いて、ハロゲン化酵素遺伝子 *chmK* を導入した 3 重形質転換体 AO-*chmABK* を調製し、その代謝産物を UPLC で解析したところ、共通中間体 **4-10** に加えて、新たなピークが保持時間 4.25 分に観測された。HR-MS よりその分子式を C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>ClO<sub>4</sub> と決定し、その <sup>1</sup>H-NMR スペクトルを **4-10** のスペクトルと比較した結果、芳香環に塩素が置換していることが支持された (図 4-3-1-3)。置換位置を特定するために文献調査を行うと、

(3*R*)-5-chloro-6-hydroxymellein (**4-12**: 142 mg / kg) と  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルが共に良い一致を示した<sup>14</sup>。同様に、もう 1 つのハロゲン化酵素遺伝子 *chmN* を導入した AO-*chmABN* を調製して代謝産物を UPLC で解析した結果、新たに 2 つのピーク (**4-13** (保持時間 4.15 分)、**4-14** (保持時間 4.33 分)) が観測された。質量分析から、**4-13** の分子式は  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClO}_4$  ( $m/z$  227 [M-H]) と予想し、**4-14** の分子式は HR-MS から  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_4$  と決定した。**4-14** の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定したところ、芳香族領域にシグナルが観測されなかった (図 4-3-1-4)。分子式の情報を加味し、その構造を (3*R*)-5,7-dichloro-6-hydroxymellein (**4-14**: 123 mg / kg) と決定した。**4-13** は、固体培地での長期間培養では蓄積しなかったことから単離できていないものの、①マスマスペクトルが 5 位モノクロロ体 **4-12** と一致したのに対して UV スペクトルと保持時間は異なっていたこと (図 4-3-1-5)、②5,7 位ジクロロ体 **4-14** へ変換されたと考えると、(3*R*)-7-chloro-6-hydroxymellein であると推定される。以上の結果から、ChmK は 5 位に、ChmN は 7 位に塩素を導入する塩素化酵素であることがわかった。さらに、2 つのハロゲン化酵素遺伝子を導入した AO-*chmABKN* を構築したところ、**4-14** を単一の化合物として取得することができた。これより、cyclohelminthol 生合成では、共通中間体 **4-10** に対する 2 度の塩素化により 5,7 位ジクロロ体 **4-14** が生成した後、脱炭酸反応などの修飾反応が進行することが予想された。

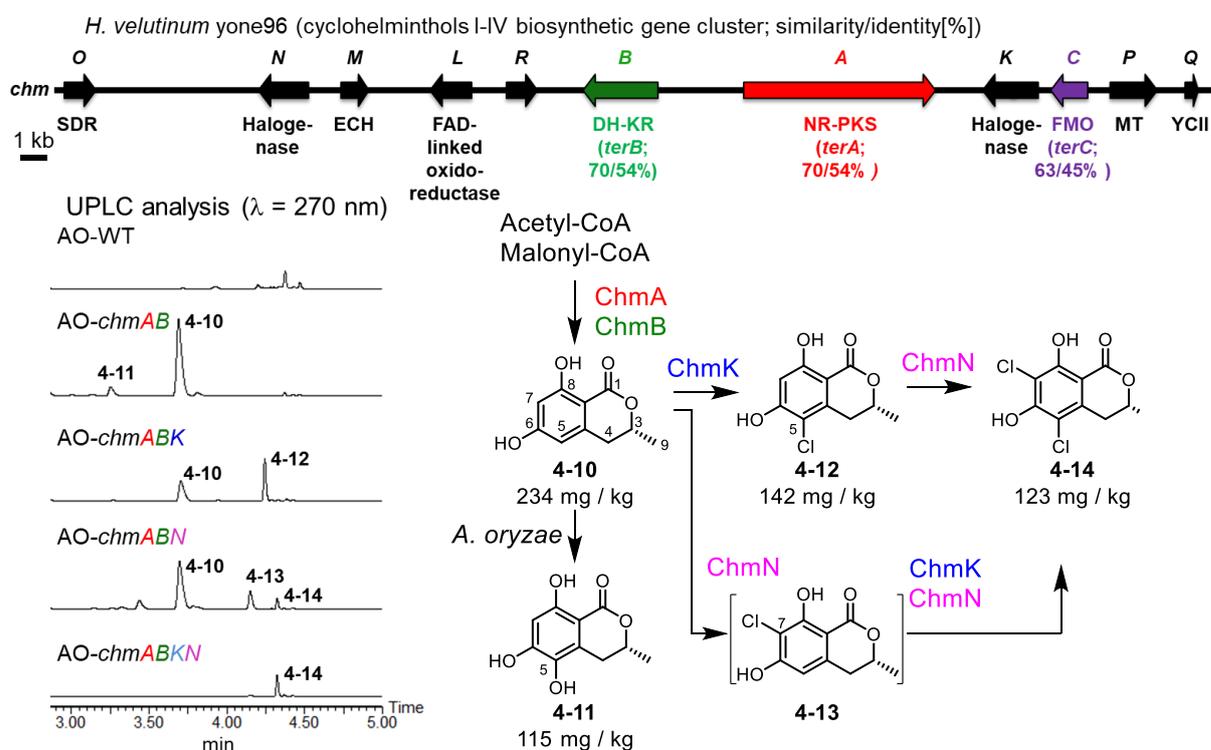


図 4-3-1-1. 各形質転換体の代謝産物分析と化合物 **4-14** の生合成経路

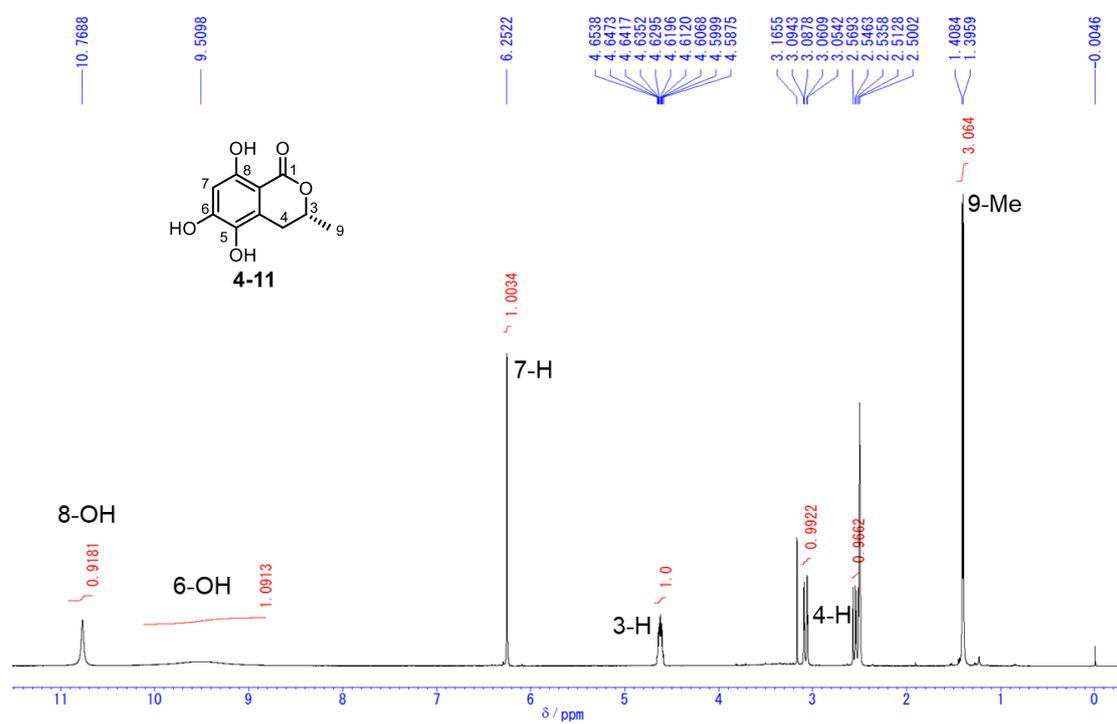


図 4-3-1-2. 4-11 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (in DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)

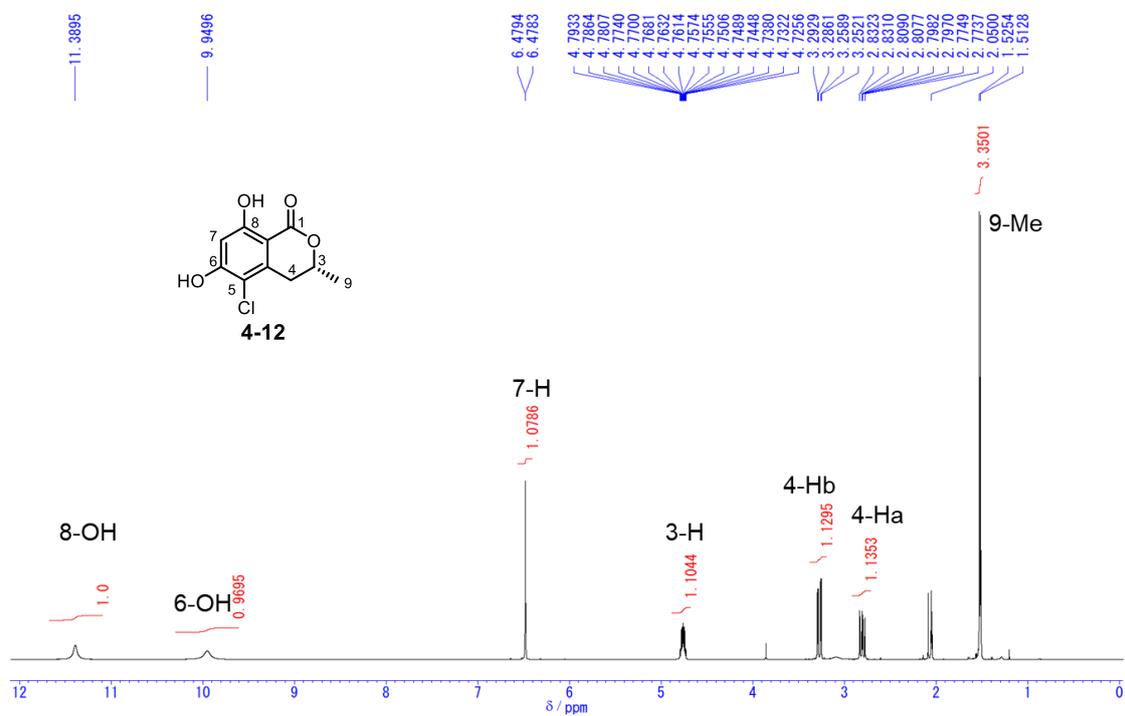


図 4-3-1-3. 4-12 の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (in acetone-d<sub>6</sub>, 500 MHz)

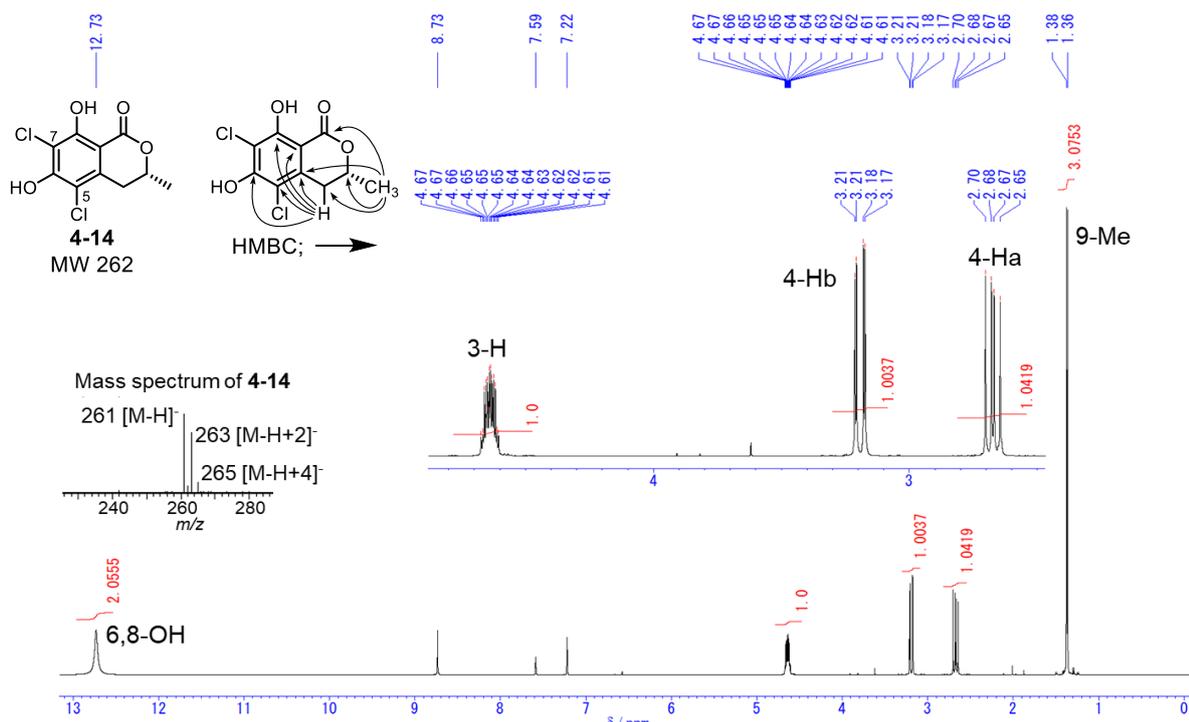


図 4-3-1-4. **4-14** のマススペクトルと <sup>1</sup>H-NMR 解析 (in pyridine-d<sub>5</sub>, 500 MHz)

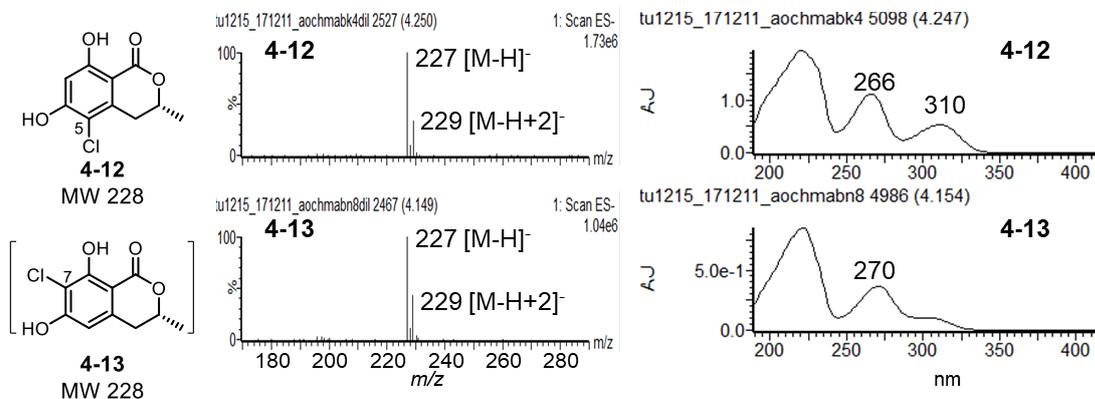


図 4-3-1-5. モノクロ化合物 **4-12** と **4-13** の UV、マススペクトル

*In vivo* での実験で2つのハロゲン化酵素遺伝子 *chmK*, *chmN* の機能解析を行ったので、大腸菌発現系を用いて組み換え酵素を調製し、*in vitro* 解析を行った。それぞれを pMAL-c4E に導入することで Maltose-binding protein (MBP) との融合タンパク質として強制発現させた。大腸菌を超音波破碎して得られた Cell Free Extract を、amylose 樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供して精製酵素を得た。MBP-ChmK, MBP-ChmN とともに

黄色溶液として精製されたため、UV-Vis 測定を行ったところ、450 nm 付近に極大吸収が観測された。以上の性質が FAD 依存型酸化酵素 Lsd18 と酷似していたことから、フラビンの結合が確かめられた (図 4-3-1-6)<sup>15</sup>。

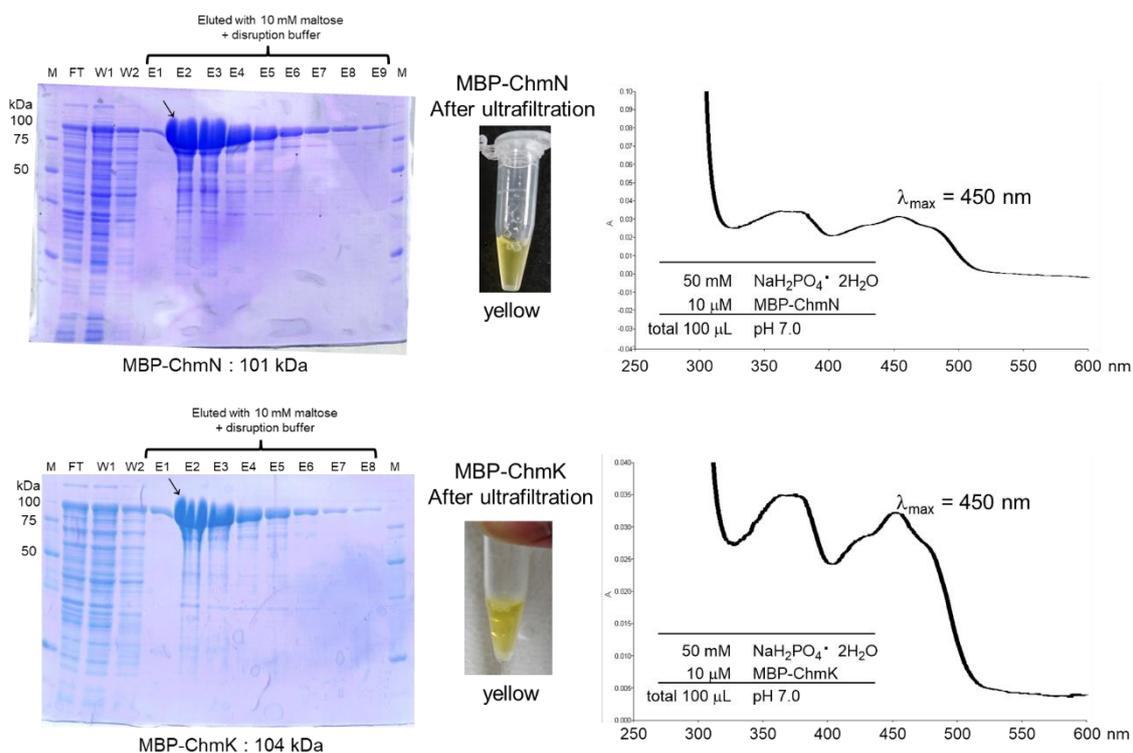


図 4-3-1-6. MBP-ChmN, MBP-ChmK の精製

フラビン依存ハロゲン化酵素は、還元型フラビン、酸素、塩化物イオンを用いてハロゲン化を触媒することが知られている<sup>16</sup>。そこで、還元型フラビンの生成に必要な大腸菌由来のフラビン還元酵素 (Fre) を用いて酵素反応を行った。

まず基質として共通中間体 **4-10** を用いた。MBP-ChmK の反応においては AO-*chmABK* の生産物と同様に 5 位モノクロロ体 **4-12** が単独で得られた (図 4-3-1-7, II)。一方 MBP-ChmN の反応においては 7 位モノクロロ体 **4-13** だけではなく 5,7 位ジクロロ体 **4-14** が得られたことから、ChmN が単独で 7 位,5 位の順番で塩素化を触媒することを明らかにした (図 4-3-1-7, III)。MBP-ChmK, MBP-ChmN の二酵素反応においては、3 つの塩素化類縁体 **4-12**, **4-13**, **4-14** の全てが生成した。この中でも特に化合物 **4-14** のピーク面積が ChmN 単独反応に比べて大きく、逆に化合物 **4-13** のピーク面積が ChmN 単独反応に比べて小さいことから、ChmK は化合物 **4-13** を基質として受容し化合物 **4-14** へ変換すると考えられる (図 4-3-1-7, IV)。

次に、基質として5位モノクロロ体**4-12**を用いた。MBP-ChmNと反応させると、**4-12**を基質として受容し5,7位ジクロロ体**4-14**の生成が確かめられた(図4-3-1-7, VI)。以上より、ChmN、ChmKの基質認識は厳密ではなく、化合物**4-10**、**4-12**、**4-13**に対して並行に作用していることが明らかになった。また、共通中間体**4-10**に対してChmK、ChmNのどちらが優先して反応するかについては、図4-3-1-7のII, IIIのクロマトグラムを見比べると、ChmKを作用させた場合に共通中間体**4-10**のピーク面積が減少していることから、ChmKが優先していると考えられる。

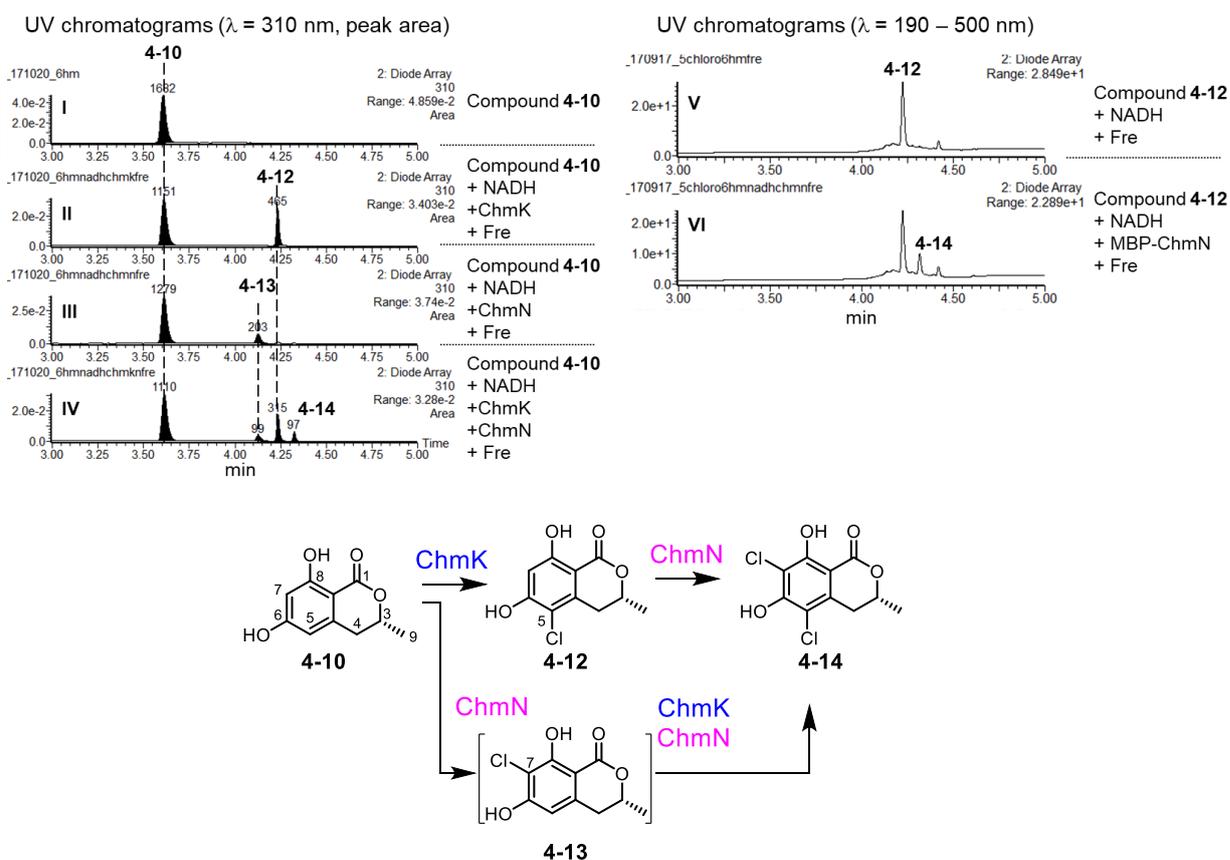


図 4-3-1-7. MBP-ChmK, MBP-ChmN の酵素反応生成物

#### 4-3-2. Palmaenone 類の生合成前期に関与する生合成遺伝子の機能解析

Palmaenone の生合成前駆体は、cyclohelminthol 類と同様に芳香環 5 位、7 位に塩素が置換していることに加え、側鎖 4 位にも塩素が置換していると想定される。従って、palmaenone 生合成遺伝子クラスターには 3 種のハロゲン化酵素遺伝子が存在すると考えられたが、前節 4-2 で述べたバイオインフォマティクス解析では、*plo* クラスターにおいて *chmK*, *chmN* と相同性を示す *ploK*, *ploN* の 2 種のハロゲン化酵素しか見いだせなかった (図 4-2-4)。そこで、いずれかの酵素が 4 位への塩素の導入も触媒する可能性を考慮し、共通中間体 **4-10** の生産株に *ploK* を導入し AO-*chmAB/ploK* を調製した。得られた代謝産物を UPLC で解析しところ、新たな 2 つのピーク (**4-15** (保持時間 4.14 分)、**4-16** (保持時間 4.37 分)) を観測した (図 4-3-2-1)。HR-MS 解析により **4-15** の分子式は  $C_{10}H_9ClO_4$ 、**4-16** の分子式は  $C_{10}H_8Cl_2O_4$  と決定した。このうち **4-15** の  $^1H$ -NMR スペクトルでは、芳香族領域に 2H 分のシグナル ( $\delta_H$  6.35) が観測されたのに対して、ベンジル位である 4 位メチンに相当するシグナルが低磁場シフトして 1H 分のダブルットとして観測された ( $\delta_H$  4.81) (図 4-3-2-2)。そこで、4 位に塩素が置換したと推定し既知化合物 (3*R*,4*R*)-4-chloro-6-hydroxymellein (**4-15**: 13 mg / kg) と NMR スペクトルを比較したところ、両者は良い一致を示した<sup>17</sup>。**4-16** の  $^1H$ -NMR スペクトルでは、4 位モノクロロ体 **4-15** と同様に低磁場シフトした 4 位メチンに相当する 1H 分のダブルットシグナル ( $\delta_H$  5.14) が存在したのに対して、芳香族領域には 1H 分のシングレットシグナル ( $\delta_H$  6.70) しか観測されなかったことから、**4-15** の塩素化体であることが示唆された (図 4-3-2-3)。芳香環での塩素の置換位置は、H4-C5、H7-C5、OH8-C7 の HMBC 相関が観測されていることなどから、5 位であると決定した。以上より、**4-16** を (3*R*,4*R*)-4,5-dichloro-6-hydroxymellein (1 mg / kg) と決定した。

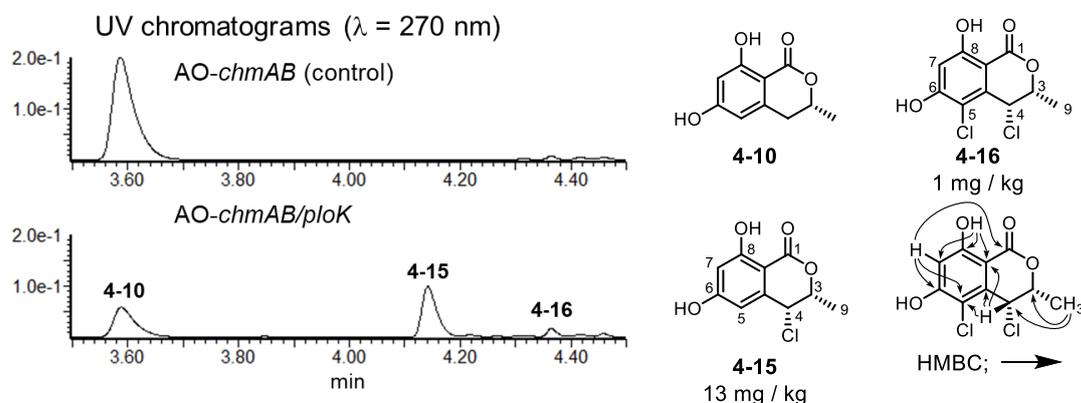
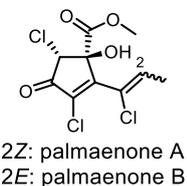


図 4-3-2-1. AO-*chmAB/ploK* の代謝産物解析

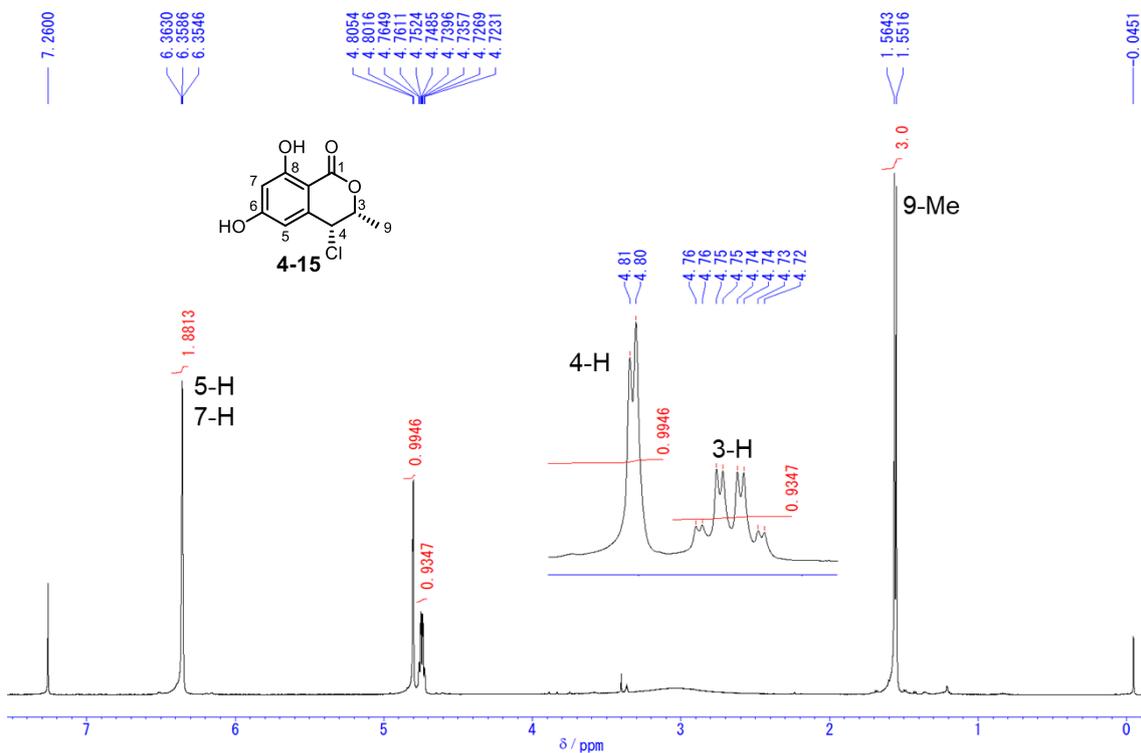


図 4-3-2-2. **4-15** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (in  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD} = 20, 500 \text{ MHz}$ )

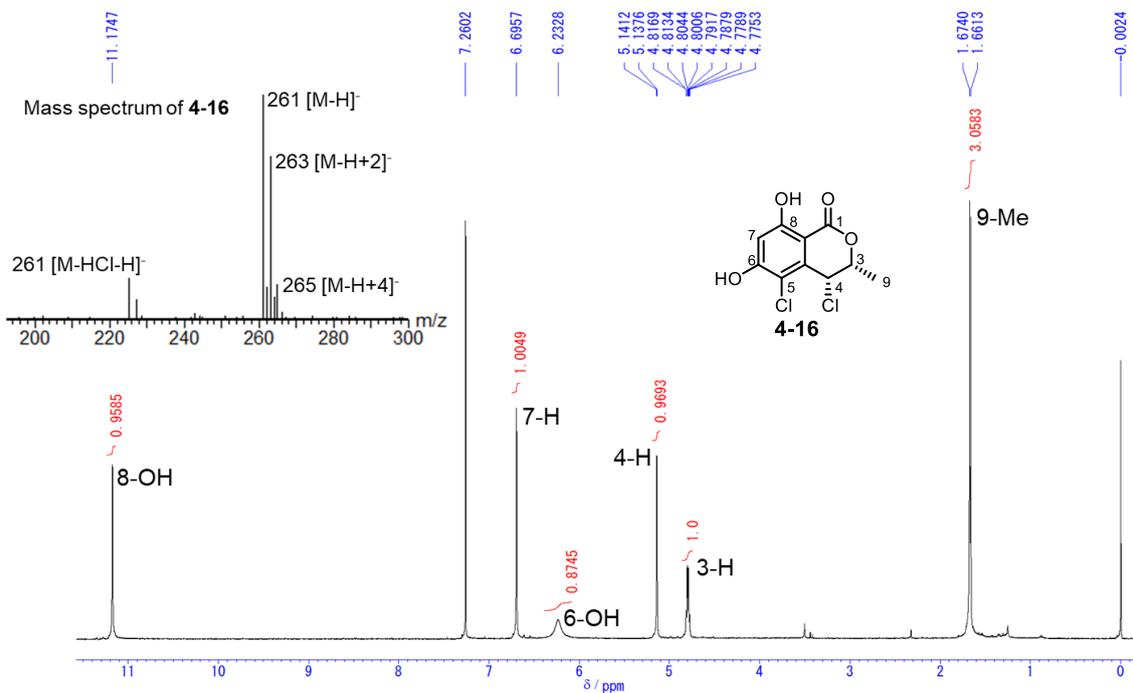


図 4-3-2-3. **4-16** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (in  $\text{CDCl}_3, 500 \text{ MHz}$ )

以上の結果から、PloK は 4 位を立体選択的に塩素化したのち、5 位の塩素化も触媒することが分かった。芳香環上に 2 つの塩素を導入する酵素として、ポリケチド系天然物 DIF-1 の生合成における塩素化酵素 ChIA が知られているが<sup>18</sup>、化学的性質の異なるベンジル位と芳香環に塩素を導入する酵素は極めて珍しい。また、もう 1 つのハロゲン化酵素 PloN は ChmN と 66% の identity であることから、7 位、5 位の塩素化活性を有していると考えられる。以上より、palmaenone の生合成では、PloK, PloN によって 4,5,7 位トリクロロ体 4-17 が生成すると考えられる (図 4-3-2-4)。

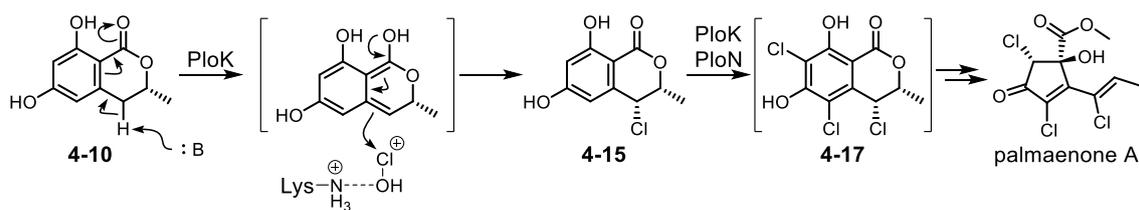


図 4-3-2-4. 推定トリクロロ中間体 4-17

### 4-3-3. Terrein 類の生合成前期に関与する生合成遺伝子の機能解析

Cyclohelminthol, palmaenone 類の生合成前期に関与する生合成遺伝子の解析が終了したので、terrein についても同様の解析を行った。Terrein の構造と、図 4-2-2 にて推定されていた反応機構から、真の生合成中間体は共通中間体 **4-10** の 7 位が水酸化された (3*R*)-6,7-dihydroxymellein (**4-18**) であると推定された (図 4-3-3-1)。本水酸化反応を触媒する酵素は terrein 生合成遺伝子クラスター中に 2 つ存在する FMO が考えられた (TerC, TerD)。このうち、TerC は *chm*, *ter*, *plo* クラスターにホモログが保存されていたため、全ての化合物に共通する生合成反応を触媒すると推定された。そこで、TerD が terrein の生合成経路において特異的な 7 位水酸化反応を触媒すると予想した。

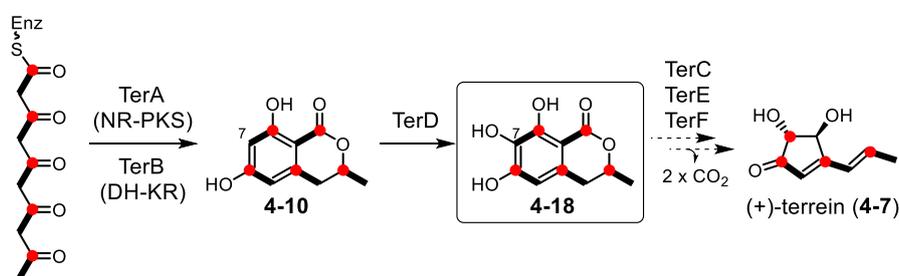


図 4-3-3-1. Terrein 推定生合成前駆体 **4-18**

TerD は前項 4-3-2 と同様に pMAL-c4E に導入することで MBP との融合タンパク質として強制発現させた。大腸菌を超音波破碎して得られた Cell Free Extract を、amylose 樹脂を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供して精製酵素を得た。MBP-TerD は黄色溶液として精製されたため、UV-Vis 測定を行ったところ、425 nm 付近に極大吸収が観測されたため、フラビンの結合が確かめられた (図 4-3-3-2)<sup>15</sup>。

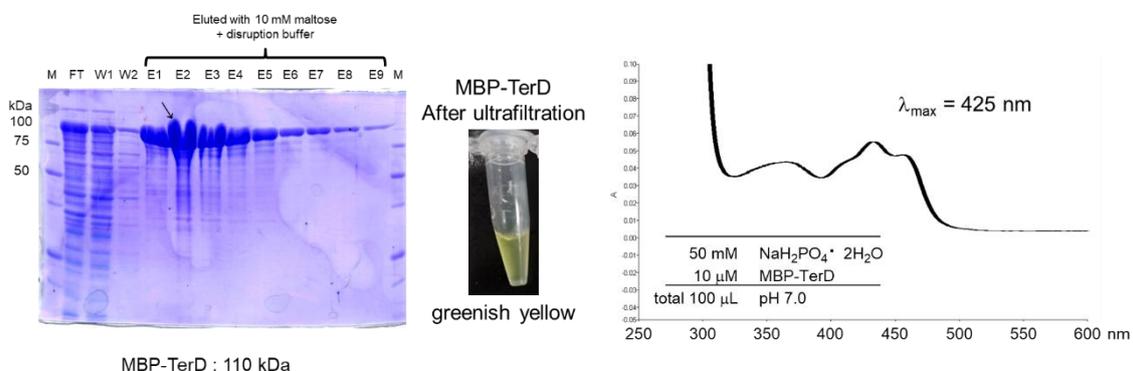


図 4-3-3-2. MBP-TerD の精製

精製した酵素を用いて反応を行った。MBP-TerD に対してジヒドロイソクマリン **4-10** を反応させ、生成物を UPLC で解析したところ、新たなピーク (**4-18**, 保持時間 2.95 分) が観測された (図 4-3-3-3, 上部クロマトグラム)。本化合物の分子式は HR-MS より  $C_{10}H_{10}O_5$  と決定した。大スケールでの酵素反応で生成物を単離し  $^1H$ -NMR スペクトルを解析すると、5 位モノヒドロキシ体 **4-11** と同様に芳香族領域に 1H 分のシングレット ( $\delta_H$  6.26) が観測されたが、ベンジル位に相当する 2H 分のシグナル ( $\delta_H$  2.77, 2.85) の化学シフトが、図 4-3-1-2 に示したスペクトルのシグナルと大きく異なっていた (図 4-3-3-3, 下部スペクトル)。分子式と合わせて考えると芳香環に水酸基が置換していると考えられたため、関連化合物の NMR スペクトルと比較した結果、真の生合成中間体と予測していた既知化合物 (3R)-6,7-dihydroxymellein (**4-18**) と良い一致を示した。7 位モノヒドロキシ体 **4-18** は *A. terreus* 由来の副生成物として報告されていたが、今回初めて TerD が 7 位へ水酸基を導入する酵素であると明らかにした<sup>9</sup>。

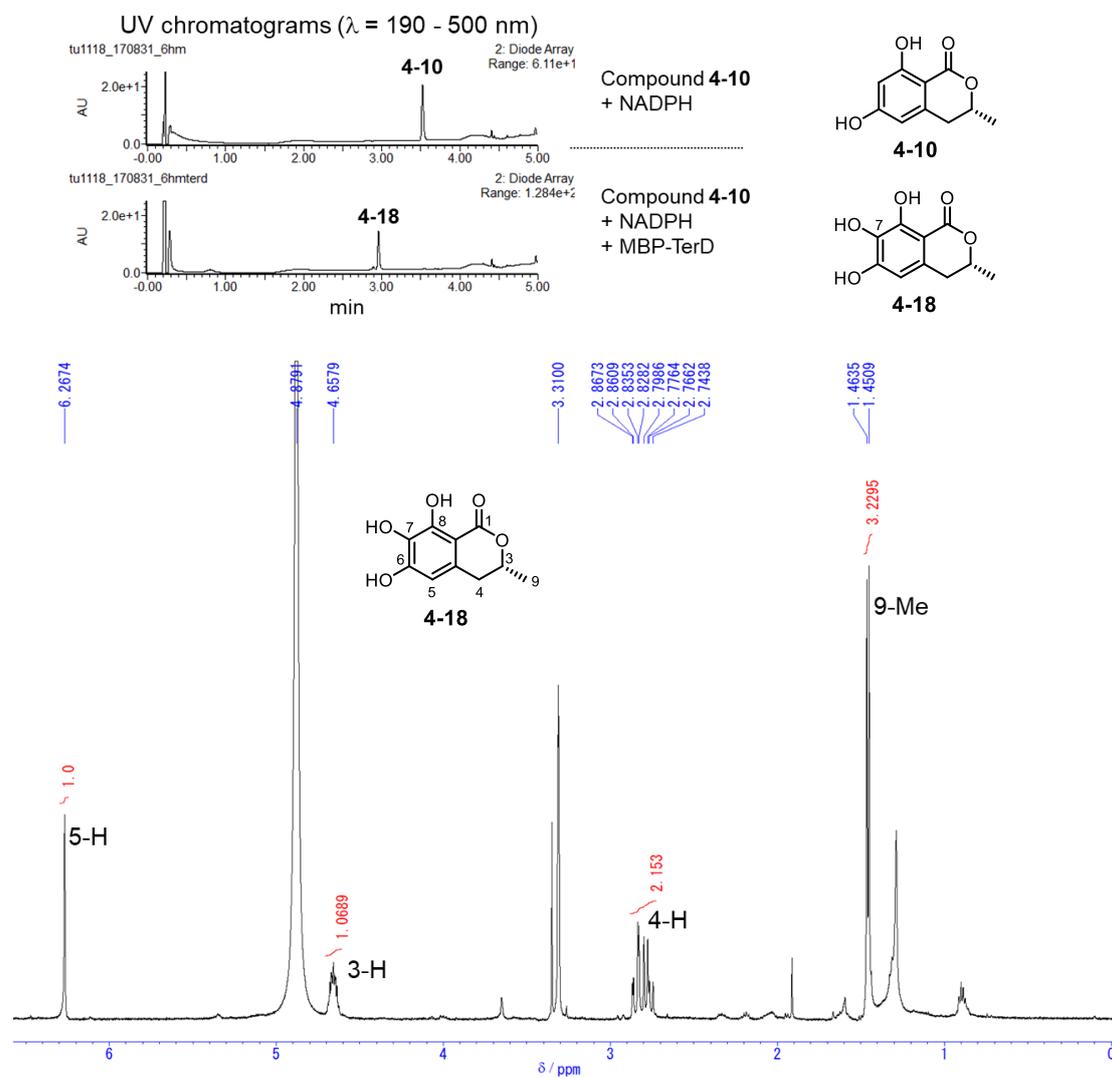


図 4-3-3-3. MBP-TerD の酵素反応と **4-18** の  $^1H$ -NMR スペクトル (in  $CD_3OD$ , 500 MHz)

一方で、共通中間体 **4-10** を生産する *AO-chmAB* に対して *terD* を導入して調製した *AO-chmAB/terD* の代謝産物を分析すると、**4-18** の生産は確認できたものの、5 位モノクロロ体 **4-12** などと比較するとピーク面積が小さい (図 4-3-3-4)。このことから、TerD は terrein に特異的な水酸基の導入に関与しているが、その活性は *in vivo* において他の生合成前期に関与する生合成酵素に比べて低い、もしくは基質が **4-10** ではない可能性が推定される。

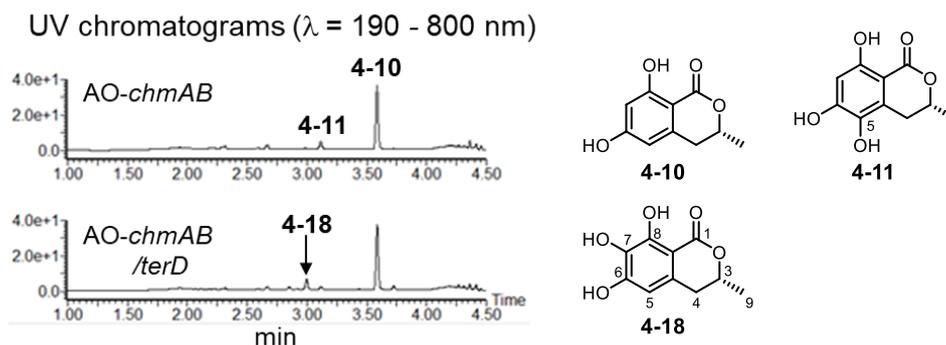


図 4-3-3-4. *AO-chmAB/terD* の代謝産物解析

#### 4-3-4. Terrein 系天然物の生合成後期に關与する生合成遺伝子の機能解析

シクロペンテン骨格を有する天然物の中間体を生産する生合成前期の酵素について機能解析が終了したので、続いて生合成後期に關与する生合成遺伝子の機能解析を試みた。それに先立ち、シクロペンテン骨格を有する天然物の生合成後期に關する研究例について紹介する。前節 4-2 でも述べたが、2014 年に Zaehle らは **terrein (4-7)** 生産菌である *Aspergillus terreus* において *ter* 遺伝子ク

ラスタの破壊実験を行っている<sup>9</sup>。生合成後期の修飾を行うと予想された *terC*, *D*, *E*, *F* をそれぞれ破壊したところ、全ての破壊株において **terrein (4-7)** の生産が消失することが明らかになり、一方で生合成中間体に相当する化合物は観測されていない。さらに、*terD*, *E*, *F* の破壊株では培地の色が赤色を呈した一方で、*terC* 破壊株では呈色していない (図 4-3-4-1)。このことから、*terD*, *E*, *F* の破壊株において、TerC による生成物が分解して赤色を呈したと推定される。つまり、**terrein** 生合成経路において、共通中間体 **4-10** から最終生成物 **4-7** の間には、7 位モノヒドロキシ体 **4-18** を除いて安定な化合物が存在していないことを示唆している。つまり、単純な構造の天然物の生合成は、一見すると容易と考えられがちであるが、単純がゆえに反応性の高い中間体が生じるため、触媒反応の各段階を追跡するのは逆に難易度の高い研究であることを示している。実際に、AO-*terCDEF* に対して共通中間体 **4-10** を投与したが、先行研究と同様に基質が消失したものの生成物は観測できなかった。

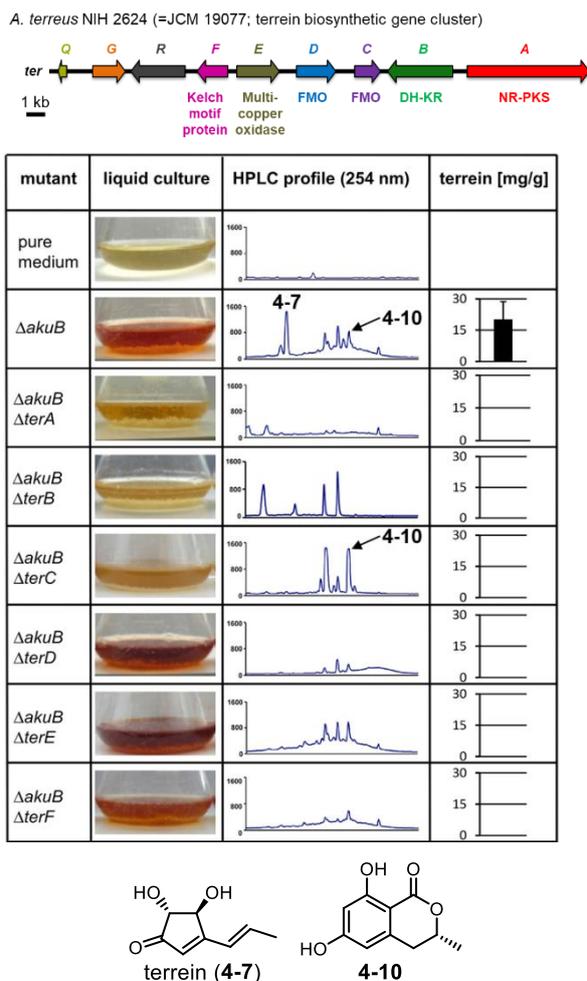


図 4-3-4-1. *A. terreus* における *ter* 遺伝子クラスタの破壊実験

FMO である TerC の反応生成物は、上記の **terrein** に關する生合成研究では単離できていないが、共通中間体 **4-10** の類似化合物を基質とした FMO の反応が **cercosporin** 生合成において報告されている<sup>19</sup>。2016 年に Newman と Townsend は、糸状菌 *Cercospora nicotianae* より単離されたポリケタイド化合物 **cercosporin** の生合成酵素 CTB3 について *in vitro* 解析を行っている。本酵素はメチル基転移酵素である CTB3-MT と FMO である

CTB3-MO の 2 つのドメインで構成されており、CTB3-MO ドメインが toralactone を基質として受容し、ラクトンα位での酸化反応、加水分解反応、脱炭酸反応が連続的に進行した後、生じた 1,2-ジヒドロキシナフタレンが空気酸化によって *o*-ナフトキノンへと酸化された cercoquinone C を生成物として与えることを報告している (図 4-3-4-2)。

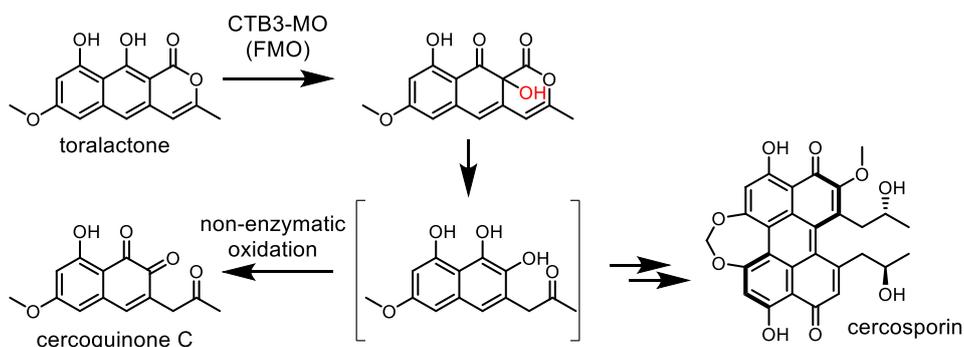


図 4-3-4-2. CTB3-MO の反応機構

以上の terrein, cercosporin における 2 例の先行研究から、cyclohelminthol IV の後期生合成経路を予想した (図 4-3-4-3)。まず、FMO である ChmC によって酸化的な脱炭酸反応が進行して不安定なヒドロキノン中間体に変換され、脱水反応によって 1-プロペニル側鎖が生成する。その後にファボルスキー様の転位反応によって生じた 3,5 員環中間体に水が付加して環縮小反応が進行し、生じたカルボン酸の脱炭酸によってシクロペンテン骨格が生成する。この予想反応経路を解明するため、まずは AO-*chmABKNC* を調製したが、terrein の系と同様に ChmC による生成物の不安定性のためか、検出できなかった。そこで安定中間体へ変換することを期待して、残りの 4 つの修飾酵素遺伝子 *chmPLMO* も一挙に導入した。

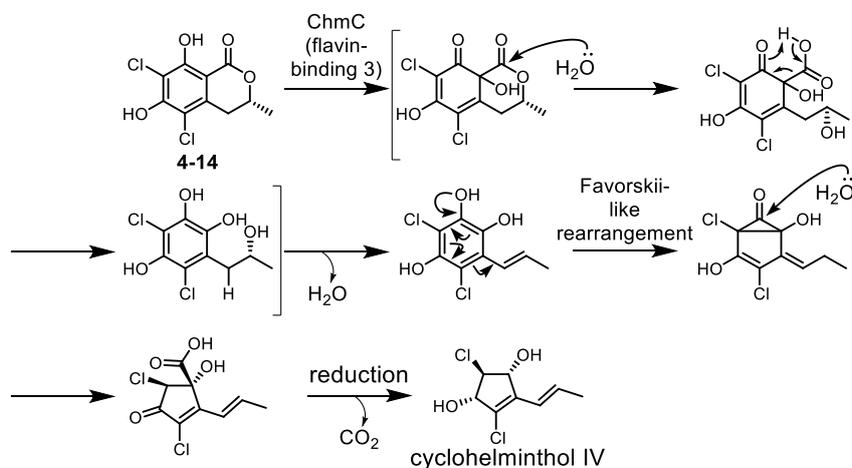


図 4-3-4-3. Cyclohelminthol 類の予想後期生合成

<chmPLMO 追加導入株を用いた未知遺伝子の機能解析>

7位モノクロロ体 **4-13** を生産する AO-*chmABN* に *chmC* (FMO 遺伝子)、*chmP* (メチル基転移酵素遺伝子)、*chmL* (フラビン依存酸化還元酵素遺伝子)、*chmM* (エノイル-CoA 水和酵素)、*chmO* (酸化還元酵素) を導入し、AO-*chmABNCPLMO* を調製した。培養して得られた代謝産物を UPLC で解析した結果、形質転換前には見られなかった新たなピーク (**4-19**, 保持時間 2.95 分) が観測された (図 4-3-4-4, 上部)。本ピークの分子式は HR-MS より  $C_{10}H_{13}ClO_4$  と決定した。このピークを単離し、 $^1H$ -NMR 解析を行ったところ、芳香族領域に 1H 分のシングレットシグナル ( $\delta_H$  6.49) と、フェノール性水酸基のメチルエーテルに由来する 3H 分のシングレットシグナル ( $\delta_H$  3.79) が観測されたほか、H7-C6、H10-C3 の HMBC 相関が観測されたことなどから、新規化合物 **4-19** (57 mg / kg) であると決定した (図 4-3-4-4, 下部)。

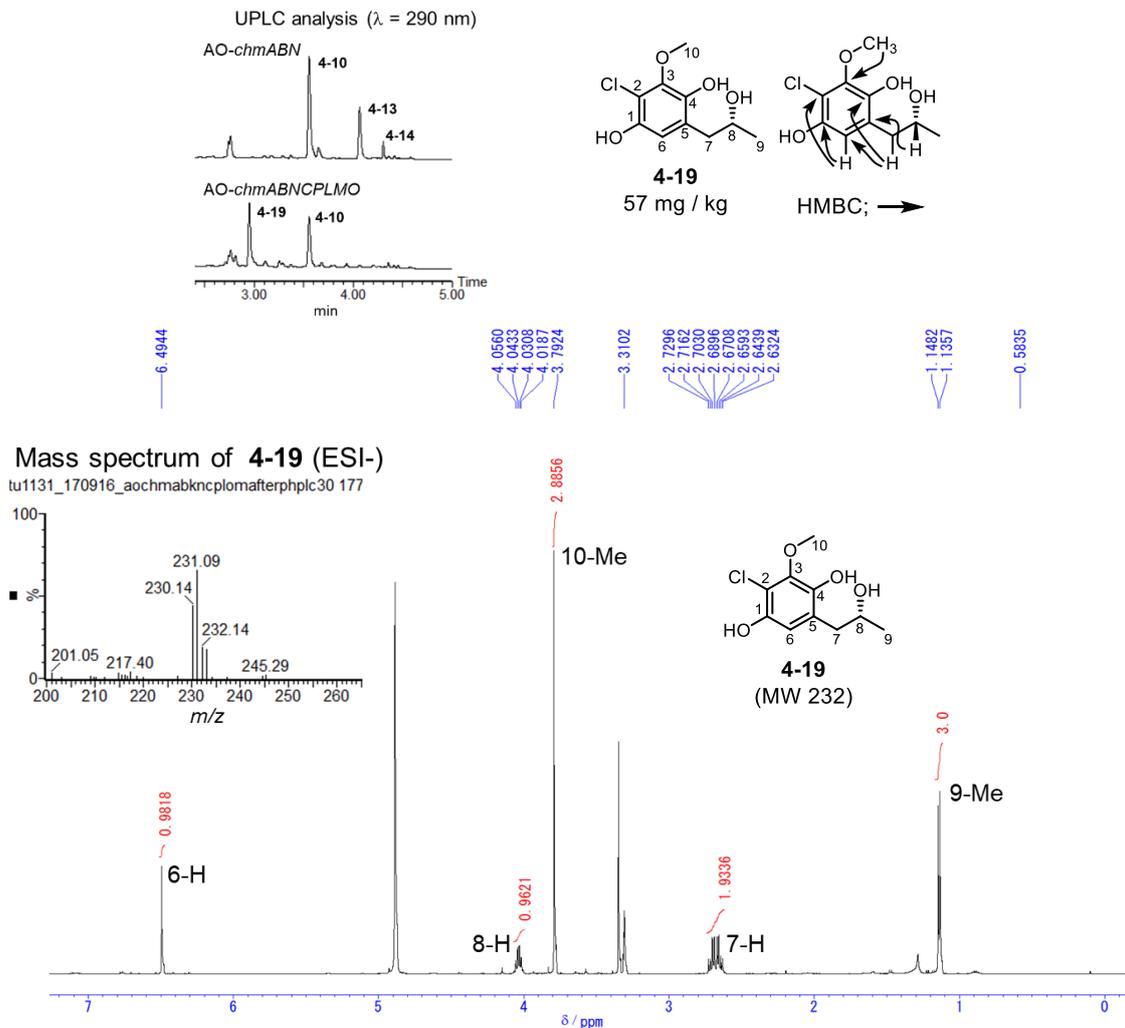


図 4-3-4-4. AO-*chmABNCPLMO* の代謝産物解析と **4-19** の  $^1H$ -NMR スペクトル (in  $CD_3OD$ , 500 MHz)

メチルエーテル **4-19** の構造、および追加で導入した 5 つの遺伝子の予想機能を考慮すると、FMO である ChmC に加えて、推定生合成経路では生合成への関与が不明であった ChmP (メチル基転移酵素) が機能していると示唆された。メチルエーテル **4-19** は、7 位モノクロロ体 **4-13** に対し、ChmC が CTB3-MO と同様にラクトン  $\alpha$  位を酸化した後に脱炭酸反応が進行することで反応性の高いヒドロキノン中間体が生成した後、ChmP によるメチル化を経て生成したと考えられる (図 4-3-4-5)。本実験において、はじめて ChmC ホモログによる生成物を単離することに成功した。

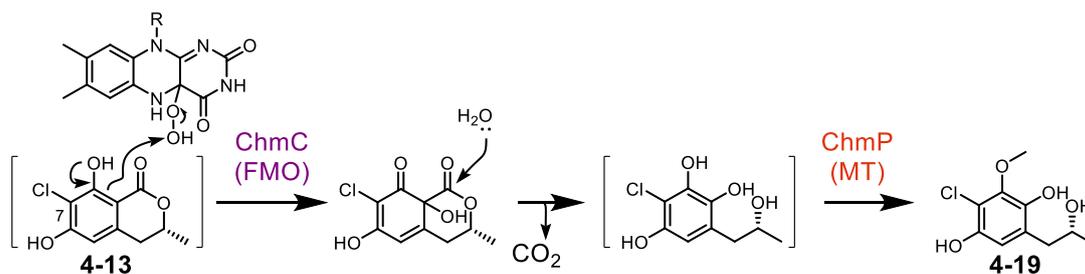


図 4-3-4-5. 化合物 **4-19** の推定生合成機構

#### <ChmC/TerC の *in vitro* における機能解析>

これまでの麹菌を用いた *in vivo* での解析において、ChmC が CTB3-MO と同様の活性を示してヒドロキノン中間体を生成していると予想された。そこで ChmC が実際に反応を触媒しているか確認するために、*in vitro* でも解析を行った。FMO である *chmC* に加えて、*ter* クラスターに存在するホモログ遺伝子 *terC* も同様に *in vitro* での解析を行った。それぞれ MBP との融合タンパク質として大腸菌発現系を用いて調製した。2 つの組み換え酵素 MBP-ChmC, MBP-TerC は黄色溶液として精製され、UV-Vis 測定の結果 450 nm 付近に極大吸収を持っていたことから、フラビンとの結合を確認した (図 4-3-4-6)<sup>15</sup>。

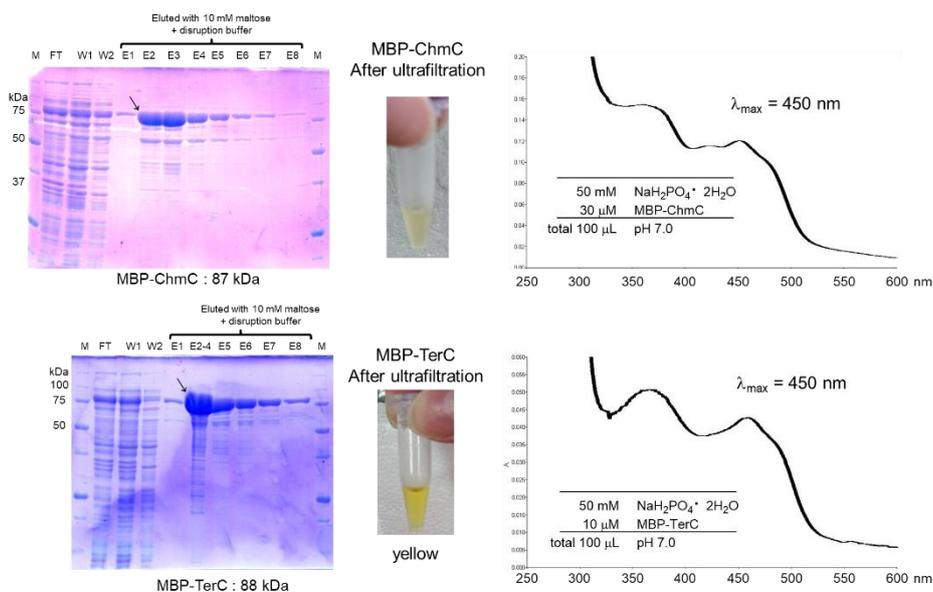


図 4-3-4-6. MBP-ChmC, MBP-TerC の精製

次に MBP-TerC, MBP-ChmC の反応について解析した。それぞれ共通中間体 **4-10**, 5 位モノクロロ体 **4-12**, 5,7 位ジクロロ体 **4-14** を基質として反応を行った。その結果、TerC は全ての基質を効率よく変換し生成物 **4-20**, **4-21**, **4-22** を与えたのに対し、ChmC は共通中間体 **4-10** に対して全く活性を示さず、塩素置換数に比例して活性が上昇したものの、TerC より著しく弱い活性であった (図 4-3-4-7)。

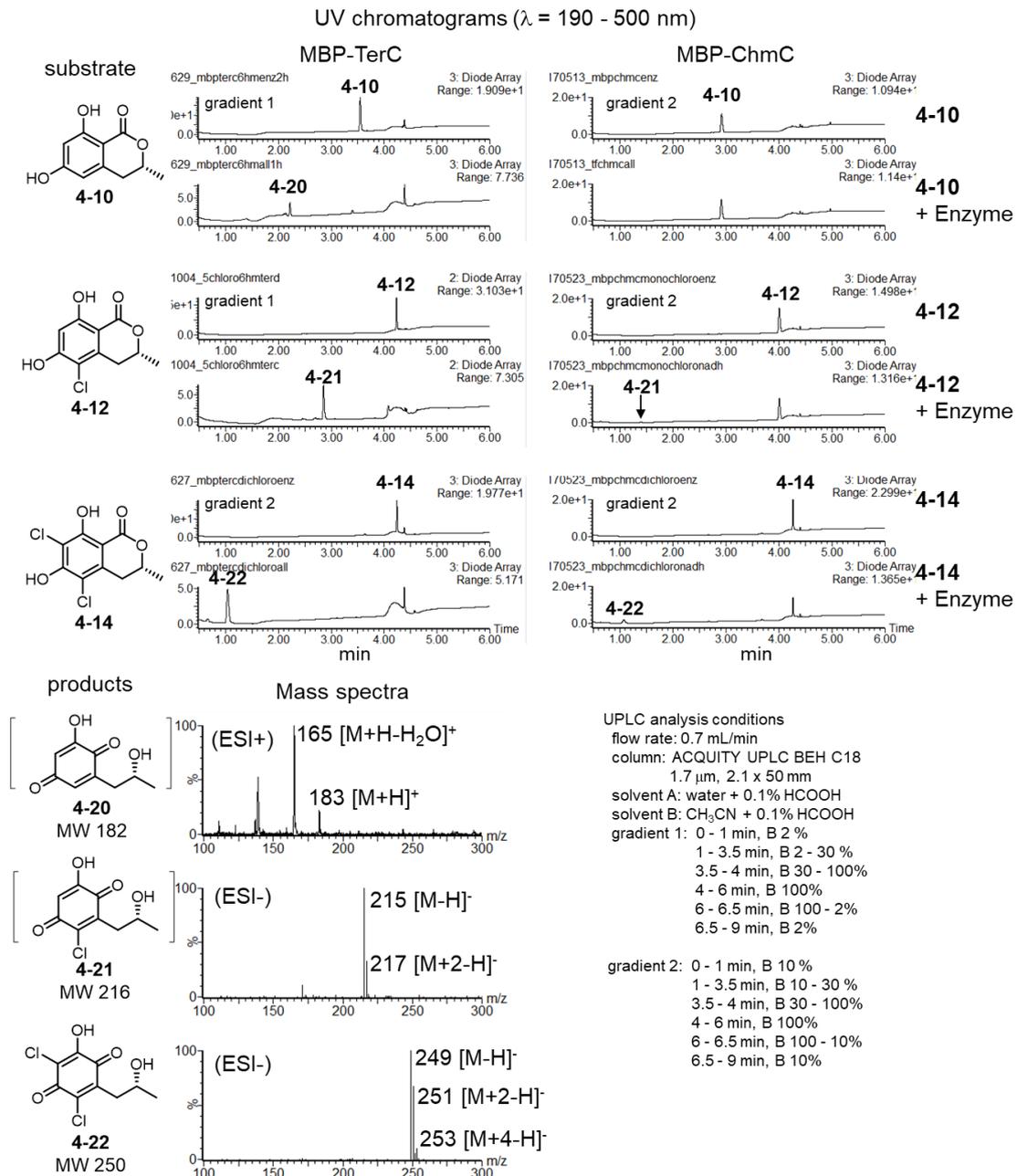


図 4-3-4-7. MBP-ChmC, MBP-TerC の酵素反応生成物

MBP-TerCについて、5,7位ジクロロ体 **4-14** を基質として大スケールでの酵素反応を行った。生成物である **4-22** は、UV-Vis スペクトルに示す通り 520 nm 付近に極大吸収を持ち、紫色を呈すると予想された (図 4-3-4-8)。そこで色を指標とした C18 オープンカラム精製によって酵素反応に用いた緩衝液に含まれる塩類を除いた後、HPLC にて単離した。得られた **4-22** は推定通り紫色を呈した。 $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトルを図 4-3-4-9 に示す。

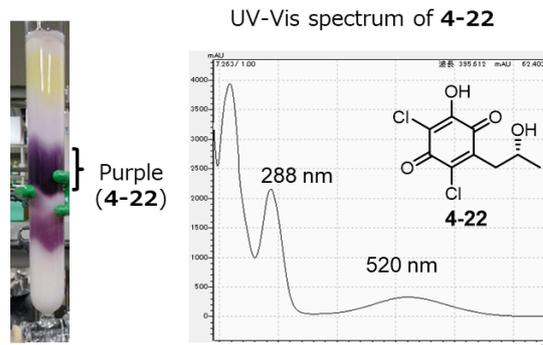


図 4-3-4-8. 化合物 **4-22** の呈色

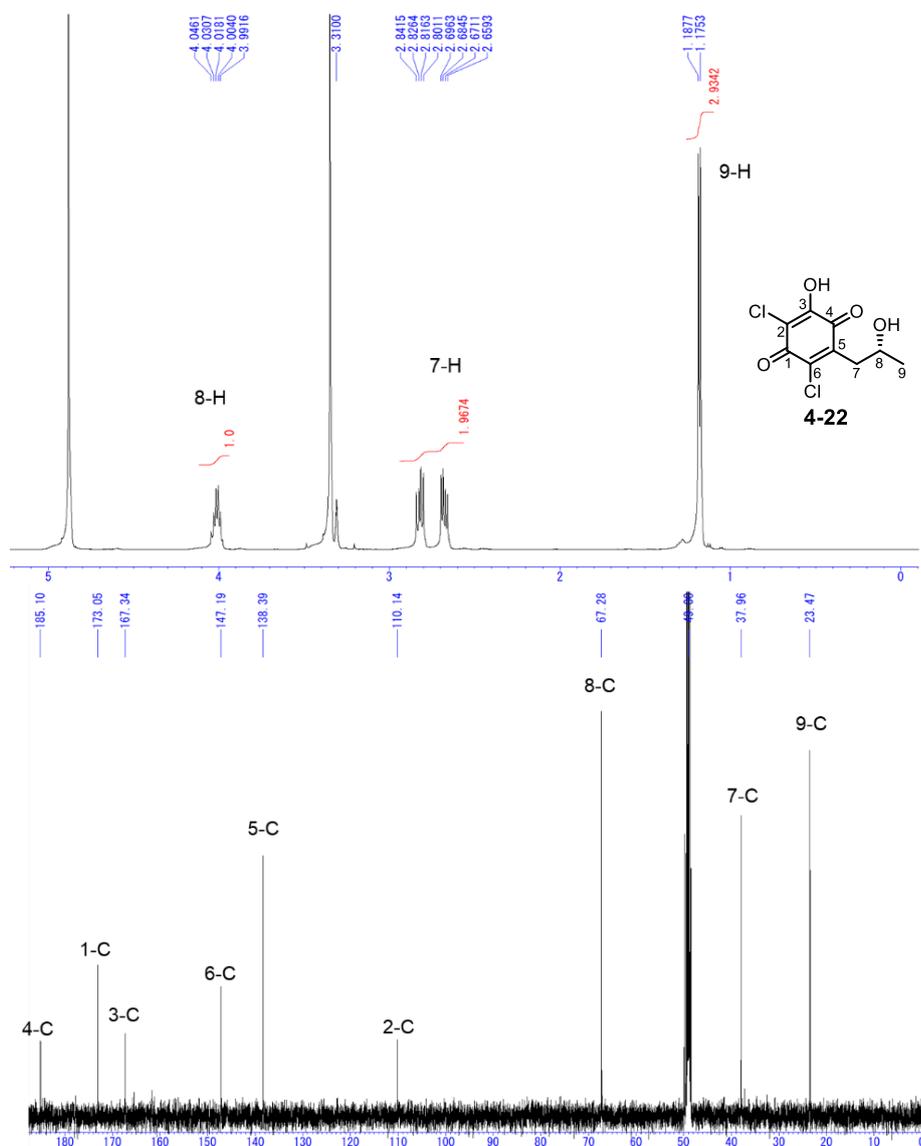


図 4-3-4-9. **4-22** の NMR スペクトル ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz, in  $\text{CD}_3\text{OD}$ )

TerC 反応生成物 **4-22** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルはメチルエーテル **4-19** と類似していたが、芳香族領域にシグナルがないことと、HR-MS 解析から決定した分子式  $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_4$  から 6 置換ベンゼンであることが推定された。さらに  $^{13}\text{C-NMR}$  においてカルボニル基の領域まで低磁場シフトした 2 つの炭素シグナル ( $\delta_{\text{C}}$  185.1, 173.1, 図 4-3-4-9) が観測されたことから、生成物は **4-19** のようなヒドロキノン構造を有しておらず、空気酸化によって生じたキノンであることが分かった。この時、*o*-キノンと *p*-キノンが生成しうるが、*p*-キノンは水素結合が可能であるのに対し *o*-キノンは不可能であるため、TerC 反応生成物は *p*-キノンであると推定した (図 4-3-4-10)。生成物がヒドロキノンで得られず空気酸化されたことは、図 4-3-4-2 で示した Cercosporin 生合成酵素 CTB3-MO の *in vitro* 解析でも観測されている。

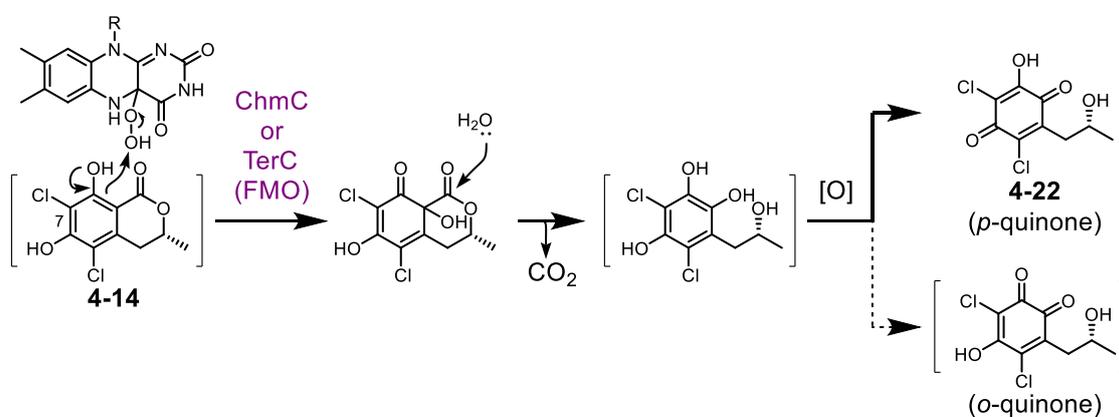


図 4-3-4-10. ChmC ホモログの *in vitro* 反応機構

TerC の反応生成物のうち、5,7 位ジクロロ体 **4-14** を基質にした場合の生成物である **4-22** のみが単離可能だった。一方で、塩素で置換されていない **4-10** を基質にした場合の生成物 **4-20**, 5 位モノクロロ体 **4-12** を基質にした場合の **4-21** は精製中に消失してしまうほど不安定であった。この不安定さは、本項 4-3-4 の冒頭、図 4-3-4-1 で述べた通り、TerC の反応生成物はベンゼン環上に電子供与性の水酸基が増えるために反応性が高まり、分子状酸素などと反応してしまうためであると考えられる。そのような状況下で *p*-キノン **4-22** を単離できたのは、2 つの電子求引基である塩素が化合物の安定化に寄与しているためと考えられた。

<ChmQ/TerQ の機能解析>

ここで、*ter*, *chm*, *plo* クラスタ内にも共通して存在する遺伝子について一通り解析が終了したものの、鍵反応と予想されたファボルスキー様の環縮小反応が進行していない。よって酵素遺伝子の見落としが有ると考え、もう一度 *ter*, *chm*, *plo* クラスタを精査したところ、~120 アミノ酸の小さなタンパク質に翻訳される ORF である *chmQ* を発見した。ChmQ は YCII superfamily に属する酵素であり、そのホモログである TftG がバクテリアである *Burkholderia phenoliruptrix* より見いだされ、5-chloro-1,2,4-triol-benzene の脱塩化水素反応を触媒して 2-hydroxy-*p*-quinone へ変換することが 2013 年に報告されている (図 4-3-4-11)<sup>20</sup>。

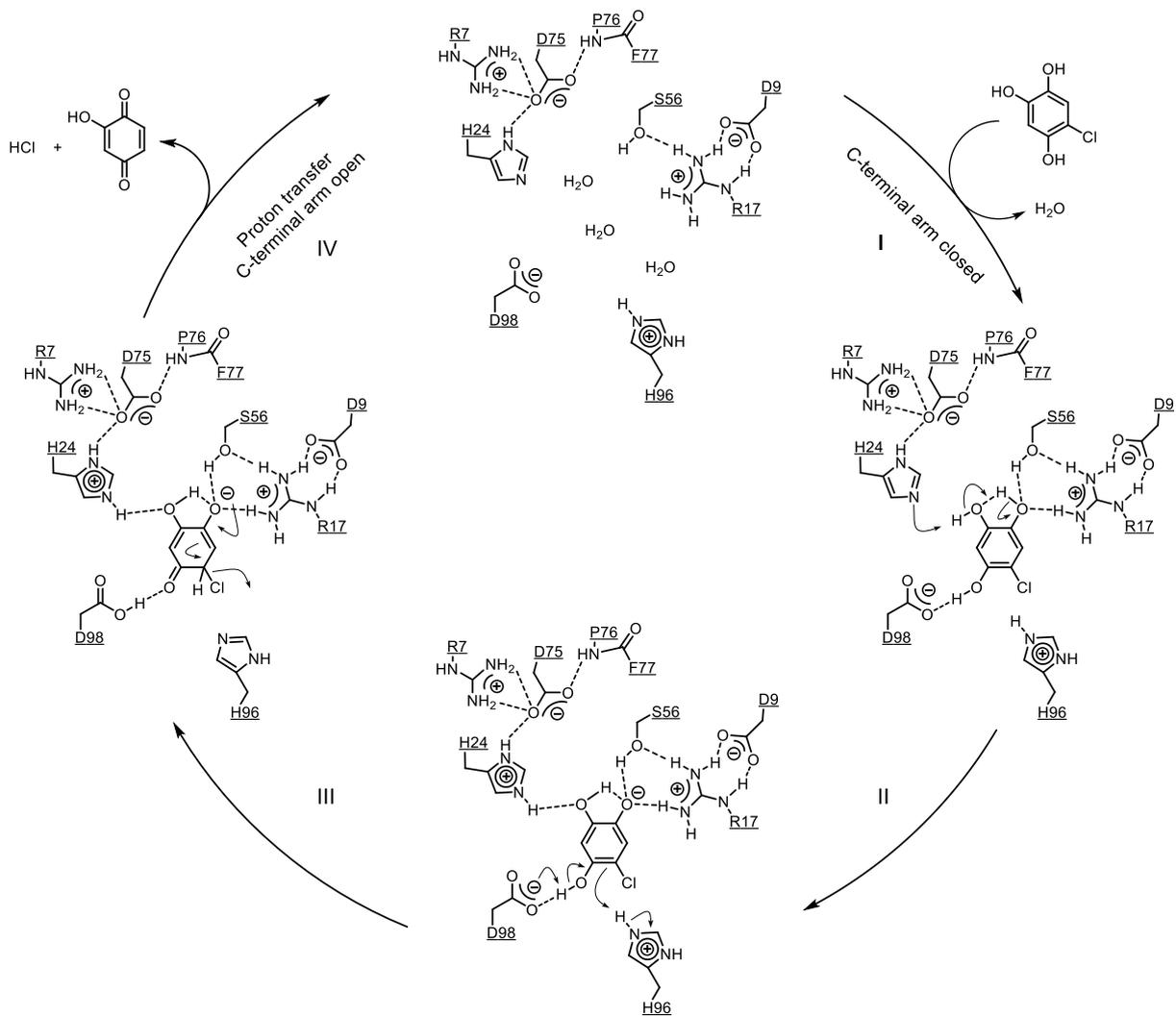


図 4-3-4-11. TftG の推定反応機構

表 4-2-1 から、*chmQ* のホモログは *ter*, *plo* クラスターに保存されているため、生合成に関与していることが支持された。さらに、先述した TftG は X 線結晶構造解析も行われており、活性に重要な残基も特定されている。報告された活性部位において水素の受け渡しに関与する残基の中で、ChmQ ホモログで保存されているものを黄色でハイライトした。図 4-3-4-11 の反応機構と比較すると、基質が結合した直後に起こる水素を引き抜く反応に用いられる活性残基は高く保存されている一方で、塩化水素の脱離反応に関与すると予想されている残基 (D98, H96) が保存されていなかった (図 4-3-4-12)。

	D9	H24	
TftG	-----MLFLIYRKDRPGSLQVR--IDNYAAHLAYLEPL-----KAKIQVGGPTLGAGTG		47
ChmQ	MAQRYEYLFIAIY--DYPGVMEA--KLKLVEAHEDTIKQDKANGSSVEWLAGGPPFF-KEHG		55
TerQ	MPEKHEFLFILP--DGPEGLKNRE--SWTDPHERFV-----ERESEYWLAGGPMY-DNHE		50
PloQ	MAQNYEFLFIVY--DTPGEAAHQAKMAQVEAHENMIKEEMQAGKS-MLLAGGPHF-KEHG		56
	**:	* * :	***
	S56	D75, P76, F77	
TftG	TDDKDMTGSFLIMEAESWDEVHSFVENDPFTKAGLFAATIVERWKHGKHNSK-----		100
ChmQ	TMPPEIIGSWGILYAPTKQDAVERLKNDPFTTGTGIWD-----WDKLTIVDSVSGMRLPL		109
TerQ	EN--IERGSWVLVQAHDKNEALNLLQRDPFTVGVKVD-----WEKAQVLSIKSGLRVPF		102
PloQ	SATPEMIGSWMILFAPSQQAIDRMKRDPFTYTEKVD-----WDRTQIFNTVSGMRLPL		110
	**:: * : . . : . **	::	*.: .
TftG	-----	100	
ChmQ	PNPGMDNMGRNLQ---	122	
TerQ	VKSSINFPPQTKMNGGS	118	
PloQ	PNPGTTDMGRI-----	121	

Similarity / Identity (%)	ChmQ	PloQ	TerQ	TftG
ChmQ		76 / 60	56 / 35	45 / 28
PloQ			55 / 33	44 / 29
TerQ				42 / 25
TftG				

図 4-3-4-12. TftG と ChmQ ホモログのアミノ酸配列比較

以上より ChmQ の機能解析を行った。メチルエーテル **4-19** を生産する AO-*chmABNCPLMO* に対して、*chmQ* をゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて染色体上へ位置特異的に挿入した。標的位置として、2 章において構築した betaenone B (**2-2**) の高生産株である AO-*bet132* のドラフトゲノムシーケンス解析を行い、染色体上に非特異的に挿入された *bet1*, *3*, *2* が、実際どの遺伝子座に挿入されているかを確認し、外来遺伝子の高発現領域 SC103 を見出した。そこで、CRISPR/Cas9 を用いた部位特異的な DNA の二本鎖切断と、それに続く相同組み換えによって *chmQ* を SC103 領域へ導入した。

調製した形質転換体 AO-*chmABNCPLMOQ* から抽出した代謝産物を UPLC で解析すると、形質転換前には見られなかった新たなピーク (**4-23**, 保持時間 4.11 分) が観測された (図 4-3-4-13, 上段)。本ピークの分子式は HR-MS 解析より C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>ClO<sub>3</sub> と決定した。単離して <sup>1</sup>H-NMR 解析を行うと、アリル位のメチル基に相当する 3H 分のダブルダブレットシグナル (δ<sub>H</sub> 1.90) と、トランスオレフィンの 8 位に相当する 1H 分のダブルカルテットシグナル (δ<sub>H</sub> 6.28) が観測された。加えて 7 位に相当し、隣接した 8 位との間でトランスオレフィンの結合定数を持ち、9 位のアリル位のメチル基と遠隔カップリングしている 1H 分

のダブルカルテットシグナル ( $\delta_H$  6.58) が観測されたので、メチルエーテル **4-19** の側鎖 8 位の水酸基が脱水して 1-プロペニル基が生成したことが分かった。加えて、 $D_2O$  添加条件で消失し、重水素交換性を示す 2 つの 1H 分のシングレットシグナル ( $\delta_H$  5.09, 5.48) が観測された。さらに H7-C6, H10-C3, OH4-C3, H6-C3 の HMBC 相関が観測されたことなどから、1-プロペニル構造を有するヒドロキノン **4-23** (24 mg / kg) であると決定した (図 4-3-4-13, 下段)。このことから、ChmQ が脱水酵素として機能することを初めて明らかにし、*terrein* や *palmaenone* の構造中にも同様の不飽和アルキル側鎖が存在することから *chmQ* のホモログである *terQ*、*ploQ* は類縁体の生合成に必須であると言える。

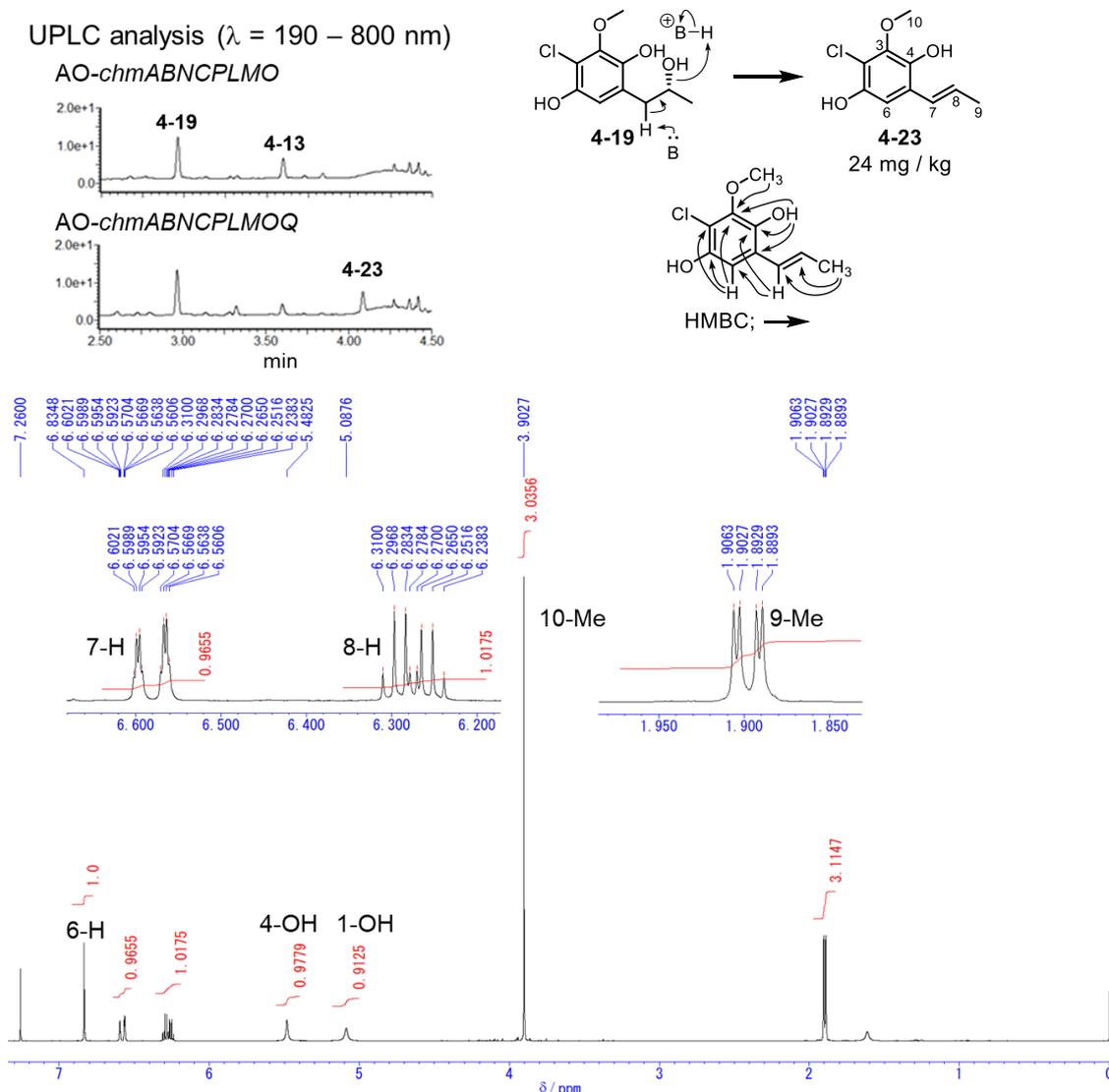


図 4-3-4-13. AO-*chmABNCPLMOQ* の代謝産物解析 (**4-23**,  $^1H$ -NMR in  $CDCl_3$ , 500 MHz)

ここまでの機能解析によって、各遺伝子クラスターに存在する共通遺伝子は網羅したにもかかわらず、シクロペンテン骨格は得られていない。環縮小に必要なフェボルスキー様の転位反応は、メチルエーテル **4-19**, および **4-23** におけるメチル基が導入されている 3 位フェノール性水酸基の酸素原子からの電子の押し込みによって開始すると予想している。このメチル基が後続の反応を阻害しているとも考えられたことから、*terrein* 生合成遺伝子クラスター中の *terC, D, Q* を、ジヒドロイソクマリン **4-10** 生産株である *AO-chmAB* に対して導入した。このとき、先述した *chmQ* の導入と同様にゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて染色体上のホットスポットである SC103 領域に部位特異的に挿入した。調製した *AO-chmAB/terCQD* の代謝産物を UPLC で解析したところ、共通中間体 **4-10**, 5 位モノヒドロキシ体 **4-11** の生産が完全に消失し、形質転換前には見られなかった新たな 2 つのピーク (**4-24** (保持時間 2.32 分)、**4-25** (保持時間 3.83 分)) が観測された (図 4-3-4-14)。それぞれ **4-24** の分子式は、HR-MS より  $C_{16}H_{16}O_8$ 、**4-25** の分子式は HR-MS より  $C_{11}H_{10}O_4$  と決定した。保持時間 2.5 分の\*記号で示したピークは精製中に消失した。

保持時間 2.32 分のピークを精製し  $^1H$ ,  $^{13}C$ -NMR を解析すると、*kojic acid* のスペクトルとよく一致するシグナルが観測された (図 4-3-4-15, 表 4-3-4-1, 2'位-4'位, 6'-7'位)<sup>21</sup>。さらに H9-C7, H8-C5, H10-C7, H7-C6, H2-C6 の HMBC 相関が観測されたことなどから、メトキシジヒドロベンゾフラン構造を有する化合物 **4-24** (30 mg / kg) だと決定した。 $^1H$ -NMR において、隣接位にもかかわらず 7,8 位のオキシメチン間でカップリングしていないのは、二面角が  $\sim 90^\circ$  であるためだと思われる。

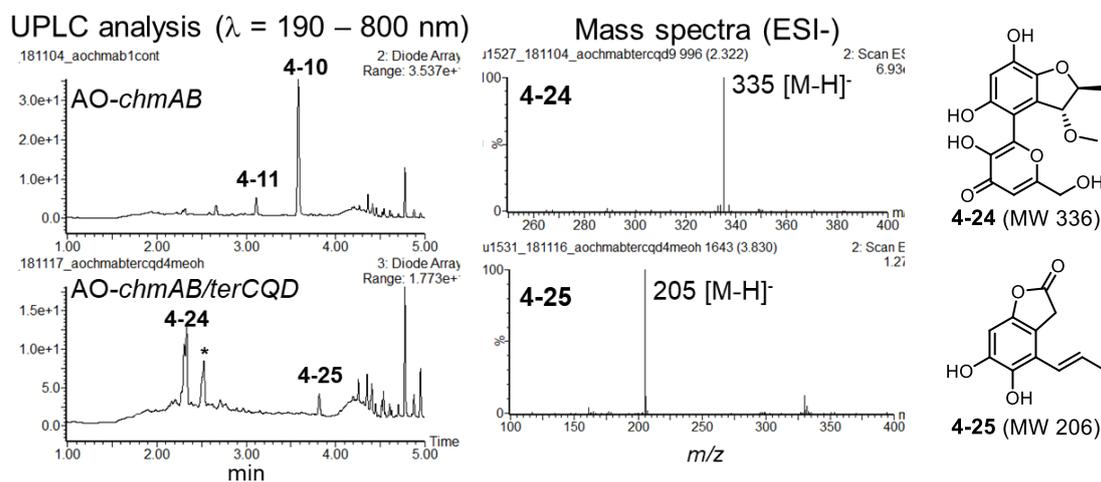
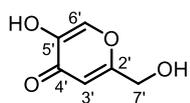


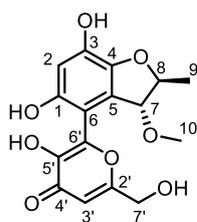
図 4-3-4-14. *AO-chmAB/terCDQ* の代謝産物解析

表 4-3-4-1. Kojic acid の文献値と **4-24** の NMR ケミカルシフト比較表 (DMSO-d<sub>6</sub>)

kojic acid		<b>4-24</b>	kojic acid		<b>4-24</b>
	$\delta_C$ (lit)	$\delta_C$	$\delta_H$ (lit., multiplicity, J in Hz)	$\delta_H$ (multiplicity, J in Hz)	
1		149.2	1		
2		103.4	2		6.48 (s)
3		148.1	3		
4		137.6	4		
5		123.3	5		
6		106.0	6		
7		79.0	7		4.77 (s)
8		87.1	8		4.57 (q, 6.6 Hz)
9		18.6	9		1.16 (d, 6.6 Hz)
10		56.1	10		3.13 (s)
1-OH			1-OH		9.18 (s)
3-OH			3-OH		8.16 (s)
2'	168.0	167.0	2'		
3'	109.8	111.3	3'	6.33 (s)	6.23 (s)
4'	173.9	173.9	4'		
5'	145.7	157.3	5'		
6'	139.2	141.3	6'	8.02 (s)	-
7'	59.4	59.4	7'	4.28 (s)	4.28 (m)
5'-OH			5'-OH	9.06 (s)	10.07 (s)
7'-OH			7'-OH	5.67 (s)	5.66 (m)



kojic acid



**4-24**

MW 336  
30 mg/rice 1 kg

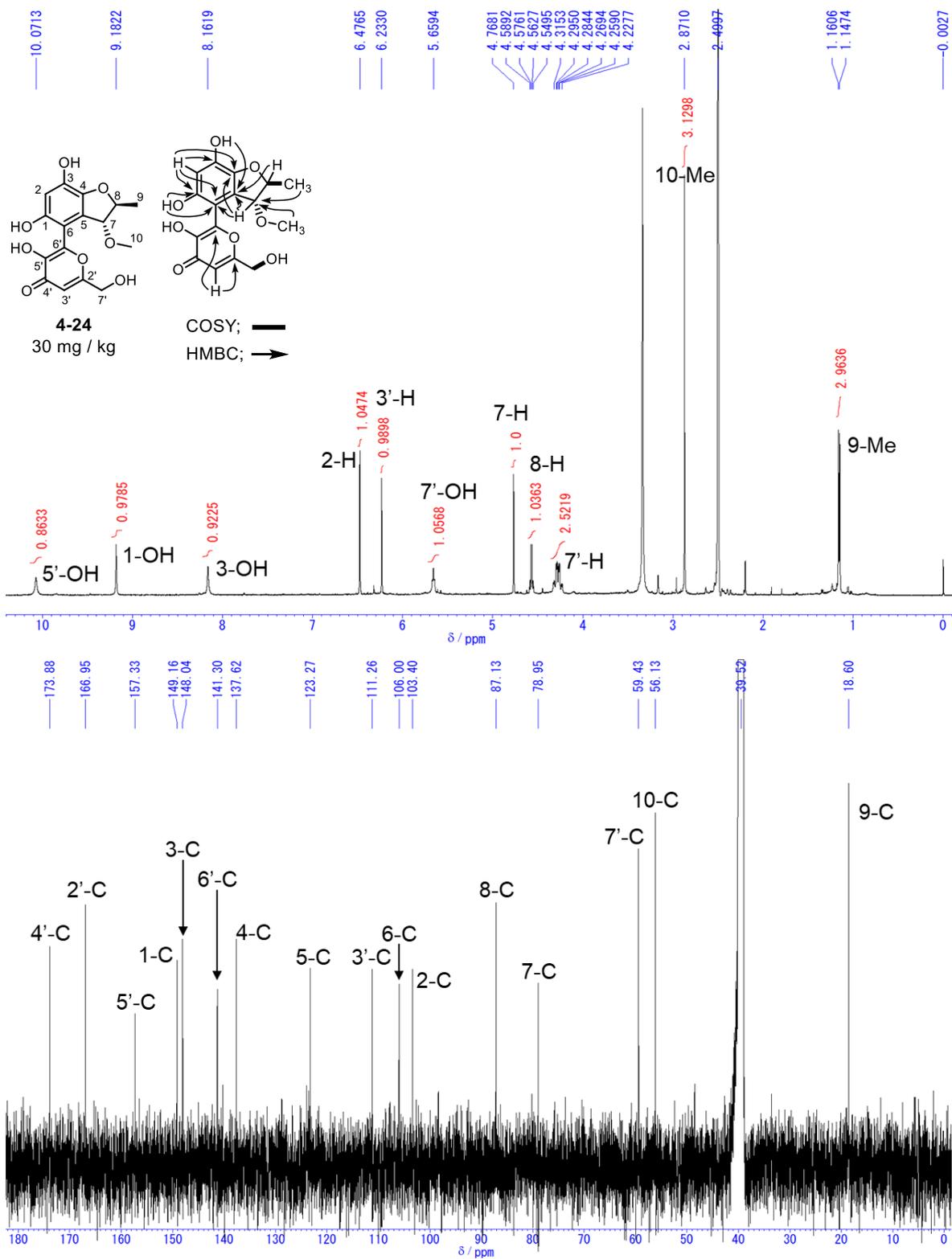


図 4-3-4-15. **4-24** の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル  
(in DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz)

次に、図 4-3-4-14 で観測された保持時間 3.83 分のピークを精製し  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR 解析を行った。 $^1\text{H}$ -NMR において、化合物 **4-23** と同様にアリル位のメチル基に相当する 3H 分のダブルダブルレットシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  1.90) と、トランスオレフィンの 8 位に相当する 1H 分のダブルカルテットシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  6.35) と、7 位に相当し、隣接した 8 位との間でトランスオレフィンの結合定数を持ち、9 位のアリル位のメチル基と遠隔カップリングしている 1H 分のダブルカルテットシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  6.64) が観測されたので、1-プロペニル基を有することが分かった。加えて、低磁場シフトした特徴的な 2H 分のシングレットシグナル ( $\delta_{\text{H}}$  3.79) が観測された (図 4-3-4-16, 上段)。さらに H2-C1, H2-C3, H2-C4, H10-C3, H10-C4, H10-C11 間で HMBC 相関が観測され、H10-H8 間で NOE 相関が観測されたことなどから、ベンゾフランノン構造を有する化合物 **4-25** (12 mg / kg) であると決定した。

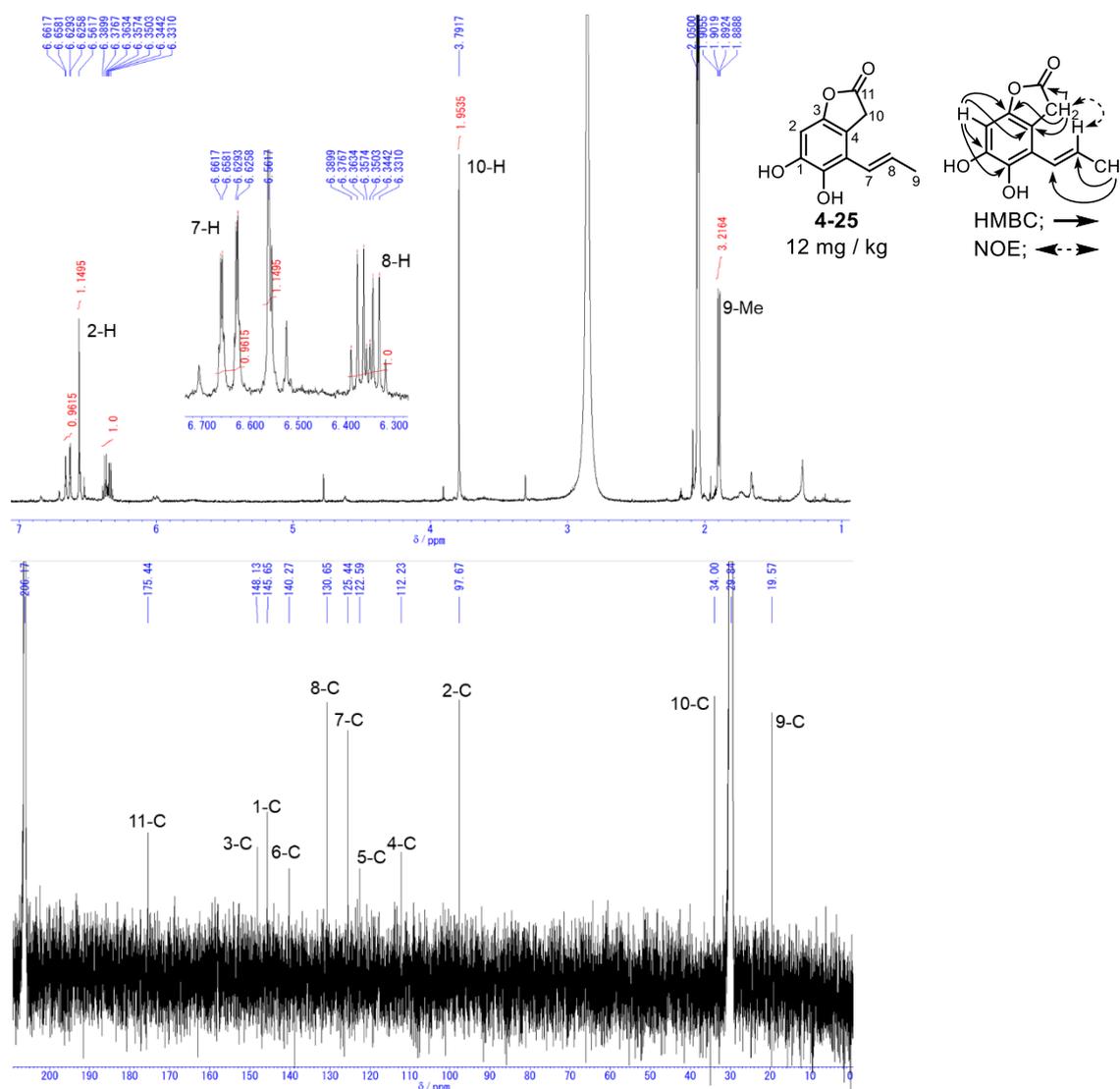


図 4-3-4-16. **4-25** の  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル  
(in acetone- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz)

メトキシジヒドロベンゾフラン **4-24** とベンゾフラノン **4-25** は以下のように生合成されると考えられる。**4-24** は TerC, Q が共通中間体 **4-10** に作用して生成したヒドロキノン **4-26** が求核剤として機能し、kojic acid とマイケル付加した後に宿主由来の酵素によって酸化されてエポキシドが導入される。続いて 4 位水酸基の求核攻撃で 5 員環が形成し、さらに宿主由来の酵素によってメチル化されたと考えられる。**4-25** は TerC, Q が 5 位モノヒドロキシ体 **4-11** に作用して生成したカテコールが互変異性でキノンメタイドへ変換された後、求核剤であるマロニル CoA 由来の酢酸ユニットが縮合したと推定できる (図 4-3-4-17)。TerD による 7 位への水酸化活性が観測されない理由としては、前項 4-3-3 の図 4-3-3-4 で述べた通りに TerD は低活性、もしくは基質となる化学種が短寿命であることが考えられる。

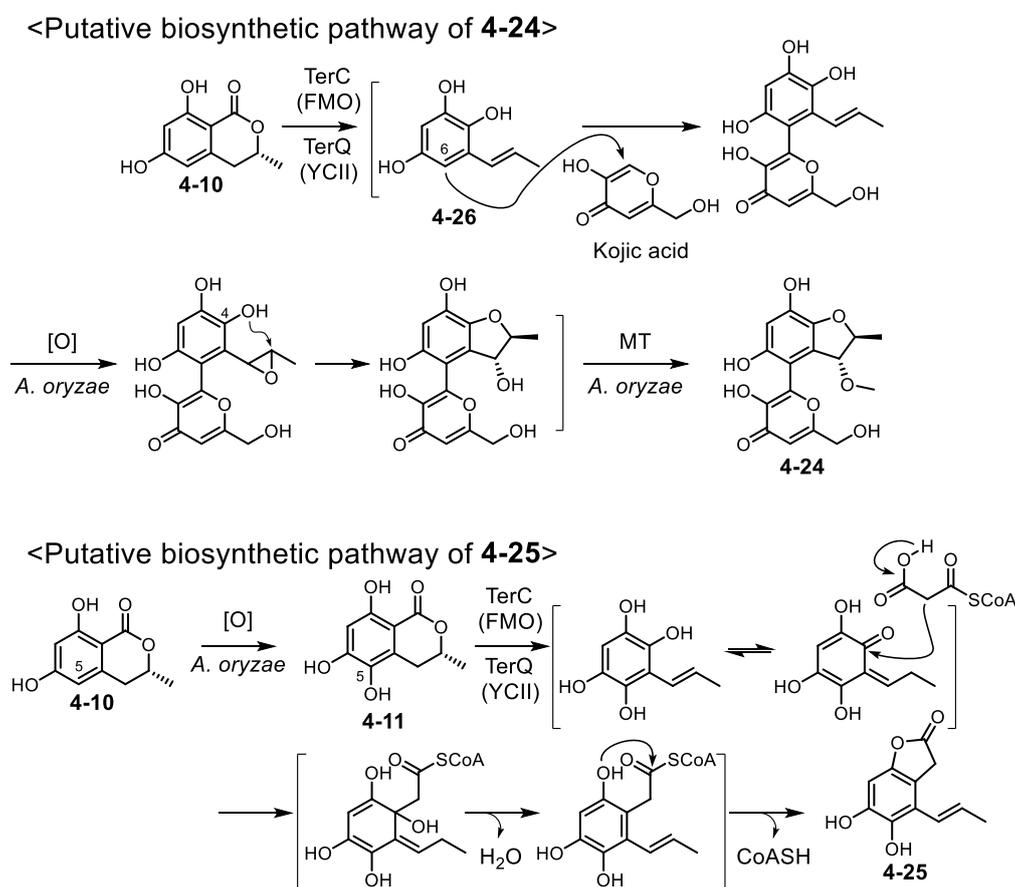


図 4-3-4-17. **4-24**, **4-25** の推定生合成機構

以上の結果は、TerC, Q が実際に機能して、ヒドロキノン **4-26** を生成していることを支持していた。これ以降の生合成には、2014 年の遺伝子破壊実験から生合成に必須と考えられた TerE, F が関与すると予想される。TerE は既知酵素との相同性比較から銅依存酸化酵素、特にアスコルビン酸の酸化酵素と相同性を示し、TerF は Kelch モチーフを有しており、ガラクトース酸化酵素と相同性を示している。これら 2 つの酵素によって、酸化的なファボルスキー様の転位反応が進行すると考えられる (図 4-3-4-18)。しかし *chm, plo* 遺伝子クラスターに TerE, TerF のホモログ遺伝子は存在しないため、さらなる探索が必要である。

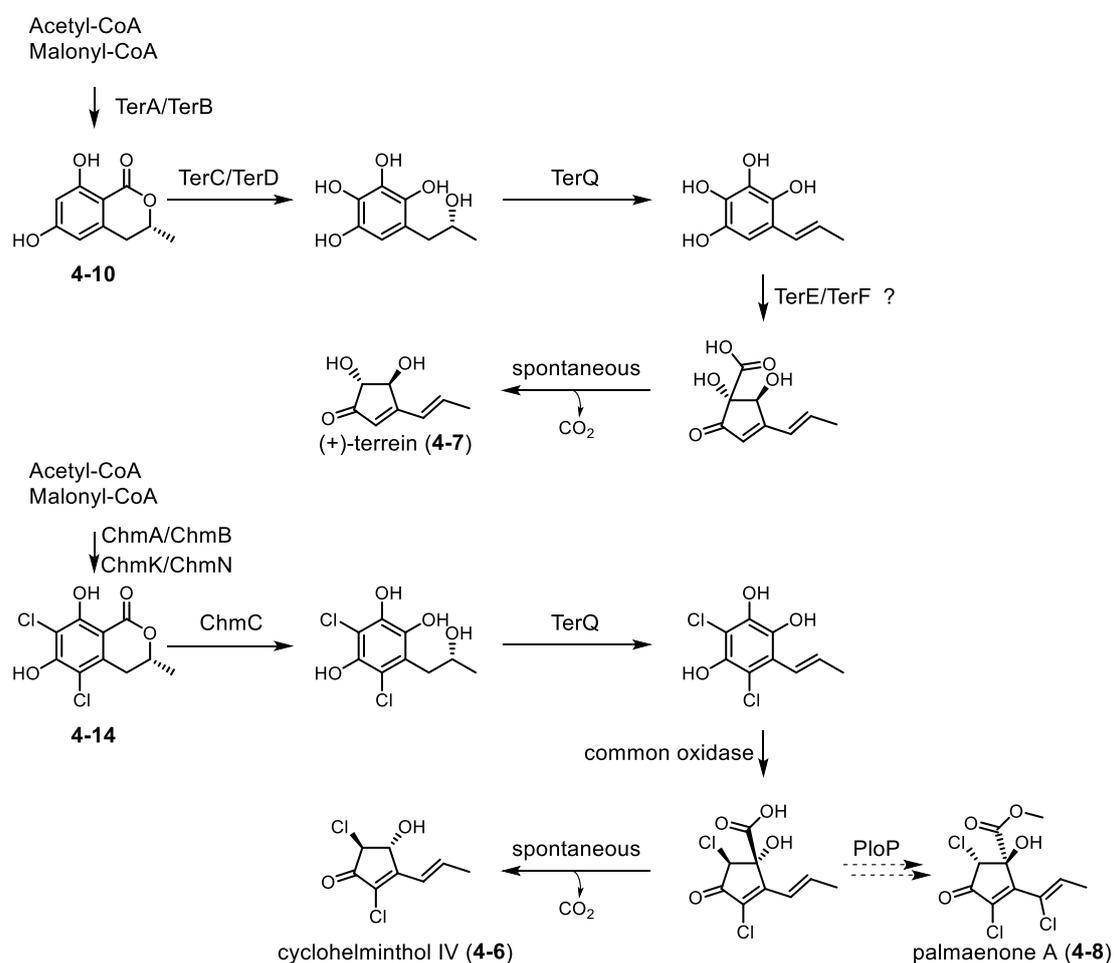


図 4-3-4-18. Terrein および cyclohelminthol, palmaenone 類の推定生合成経路

#### 4-4. 考察

2,3章において、麹菌異種発現系を用いた生合成遺伝子の機能解析では、遺伝子を導入した株は何らかの化合物を生産、または変換していた。しかし4章では、*in vitro*で活性が確認できた酵素遺伝子 *chmC* を麹菌に導入したにもかかわらず、反応が進行した化合物を検出することができなかった。これは不安定な生成物の分解を示唆しており、この現象を回避するためには、本研究で行ったように下流の変換反応を触媒すると予想された酵素遺伝子を同時に導入することで、単離可能な安定中間体へと変換することが有効であると改めて示された。

4章での研究結果と先行研究を合わせて考えると、6員環から5員環への環縮小反応を触媒する酵素遺伝子の候補を銅依存酸化酵素 TerE と、Kelch モチーフを有するタンパク質 TerF であると推定できた。

TerE が相同性を示す銅依存酸化酵素は Multicopper oxidase という、活性中心に複数の銅イオンを有する一群に属する。本酵素群の Laccase や Ascorbate Oxidase などはラジカル的に反応を進行させることが知られており、もっとも有名なものは Tyrosinase である。Tyrosinase はチロシンを基質として dihydroxyphenylalanine (DOPA) への変換を担うモノオキシゲナーゼ活性と、続く DOPA キノンへの酸化反応を触媒することが知られている(図 4-4-1)<sup>22</sup>。

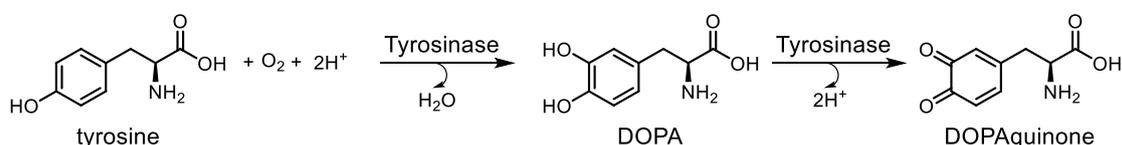


図 4-4-1. Tyrosinase の反応

TerF は Kelch モチーフを有しており、Galactose oxidase と相同性を示した。Galactose oxidase は中心金属として銅原子を有し、ラジカル的に galactose をアルデヒドへと変換することが知られている<sup>23</sup>。

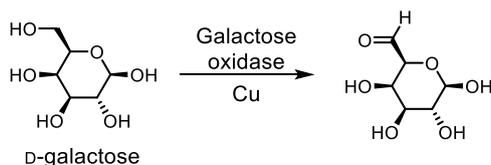


図 4-4-2. Galactose oxidase の反応

TerE, F が terrein 系天然物の環縮小反応に関与している場合、以下のような反応経路が考えられる。

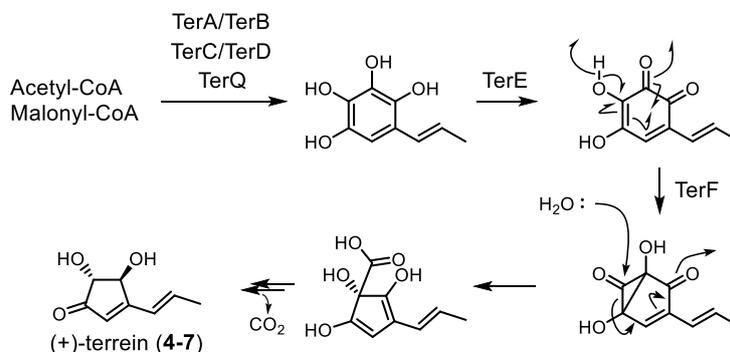


図 4-4-3. TerE, TerF の推定反応機構

間接的に TerE, F の機能を推定するため、terrein 生産菌 *A. terreus* に対して 5 位モノクロロ体 **4-12** と 5,7 位ジクロロ体 **4-14** の投与実験を行った。その結果、基質は完全に消費されたものの、terrein の塩素化誘導体、もしくは中間体に相当する化合物は検出されなかった。図 4-3-4-7 で示した TerC の *in vitro* 解析と合わせて考えると、TerC はクロロ化基質を受容してヒドロキノン中間体へ変換したが、続く環縮小反応を触媒すると推定された TerE, F の基質特異性が高く、受容されないために分解したのではないかと考えられる。

#### 4-5. まとめ

2, 3 章の内容を踏まえ、麹菌異種発現系が、導入された酵素遺伝子の機能を忠実に再現することを期待し、未知の反応を鍵工程とする天然物の生合成研究を行った。その結果、共通前駆体の異種生産、並びに生合成前期の修飾酵素遺伝子の機能解析に成功した。加えて、2014 年に行われた terrein 生産菌を対象とした先行研究の段階では ORF だと認識されていなかった ChmQ ホモログの発見に成功し、側鎖の脱水反応を触媒することを明らかにした。本研究で得られた知見をもとに、先行研究で terrein 生合成に必須と推定されていたが機能が不明であったタンパク質 TerE, TerF の真の役割をはじめ推定することができた。

ChmQ ホモログの解析結果から、既知酵素との比較などで機能が予測できない酵素遺伝子であっても、触媒活性さえあるのであれば、麹菌は機能を発現させることが可能である。ここまでの結果をまとめると、麹菌異種発現系は有用な発現系であり、天然型の酵素を研究対象として 2, 3, 4 章で成果を挙げた。よって、これまでより更に複雑な、酵素同士を掛け合わせて作成したキメラ酵素の機能解析にも適応可能であると考えられる。

## References

- 1) S. Tanaka, Y. Honmura, S. Uesugi, E. Fukushi, K. Tanaka, H. Maeda, K. Kimura, T. Nehira, and M. Hashimoto *et al.* *J. Org. Chem.* **2017**, *82*, 5574.
- 2) M. García-Caballero, L. Cañedo, A. Fernández-Medarde, M. Á. Medina, and A. R. Quesada, *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 279.
- 3) Y. Honmura, S. Uesugi, H. Maeda, K. Tanaka, T. Nehira, K. Kimura, M. Okazaki, and M. Hashimoto, *Tetrahedron Lett.* **2016**, *72*, 1400.
- 4) H. Oikawa, *J. Org. Chem.* **2003**, *68*, 3552.
- 5) M. Sato, J. E. Dander, C. Sato, Y. Hung, S. Gao, M. Tang, L. Hang, J. M. Winter, N. K. Garg, K. Watanabe, and Y. Tang, *J. Am. Chem. Soc.* **2017**, *139*, 5317.
- 6) C. Liu, K. Tagami, A. Minami, T. Matsumoto, J. C. Frisvad, H. Suzuki, J. Ishikawa, K. Gomi, and H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5748.
- 7) H. Raistrick and G. Smith, *Biochem. J.* **1935**, 606.
- 8) R. A. Hill, R. H. Carter, and J. Staunton, *J. Chem. Soc. PERKIN TRANS. I* **1981**, 2570.
- 9) C. Zaehle, M. Gressler, E. Shelest, E. Geib, C. Hertweck, and M. Brock, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 719.
- 10) E. L. F. Ferreira, D. E. Williams, L. P. Ióca, R. P. Morais-Urano, M. F. C. Santos, B.O. Patrick, L. M. Elias, S. P. Lra, A. G. Ferreira, M. R. Z. Passarini, L. D. Sette, R. J. Andersen, and R. G. S. Berlinck, *Org. Lett.* **2015**, *17*, 5152.
- 11) T. Matsumoto, T. Hosoya, H. Tomoda, M. Shiro, and H. Shigemori, *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, *59*, 1559.
- 12) A. Shimada, M. Kusano, S. Takeuchi, S. Fujioka, T. Inokuchi, and Y. Kimura, *Z. Naturforsch.* **2002**, *57c*, 459.
- 13) J. Breinholt, G. W. Jensen, and R. I. Nielsen, *J. Antibiot.* **1993**, *46*, 1101.
- 14) K. Krohn, R. Bahramsari, U. Flörke, K. Ludewig, C. Klichespory, A. Michel, H.-J. Aust, S. Draeger, B. Schulz, and S. Antus, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 313.
- 15) A. Minami, M. Shimaya, G. Suzuki, A. Migita, S. S. Shinde, K. Sato, K. Watanabe, T. Tamura, H. Oguri, and H. Oikawa, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 7246.
- 16) J. Zeng and J. Zhan, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 2119.

- 17) M. Stadler and H. Anke, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 267.
- 18) C. S. Neumann, D. T. Walsh, and R. R. Kay, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 5798.
- 19) A. G. Newman and C. A. Townsend, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 4219.
- 20) R. P. Hayes, K. M. Lewis, L. Xun, and C. Kang, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 28447.
- 21) X. Li, J. H. Jeong, K. T. Lee, J. R. Rho, H. D. Choi, J. S. Kang, and B. W. Son, *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 532.
- 22) E. I. Solomon, U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin, *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 2563.
- 23) B. E. Turner and B. P. Branchaud, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 3341.

## 第5章 本論-キメラ酵素による糸状菌由来 PKS-NRPS の機能解析

### 5-1. PKS キメラ酵素の機能解析

2、3章において麴菌を利用した HR-PKS の機能解析を行い、ドメイン組み換えに必要な PKS の調製が可能となった。4章では同宿主において複雑な骨格を生合成する酵素の機能解析をそれぞれ行った。以上を踏まえ、5章では PKS の各炭素鎖伸長における反応制御の機構を解明するための知見を得るべく、系統的に行われた研究が数例しか報告されていない、複数の相同 PKS 間でのドメイン組み換えによるキメラ PKS の機能解析を行った。

1章で述べた通り、糸状菌に広く存在している PKS は繰り返し型と呼ばれる反応機構を有する。ポリケタイドの伸長単位であるマロニル CoA を ACP のホスホパンテテニル鎖へと転位させる AT ドメイン、ACP 上のマロニル CoA と KS に結合したポリケタイドとのクライゼン縮合により $\beta$ -ケトチオエステルの生成を触媒する KS ドメイン、生成した $\beta$ -ケトチオエステルを還元して $\beta$ -ヒドロキシチオエステルを生成する KR ドメイン、脱水反応を触媒して $\alpha,\beta$ -不飽和チオエステルを生成する DH ドメイン、さらにその還元によって飽和鎖へ変換する ER ドメインが働くことでポリケタイド鎖が伸長する (図 5-1-1)。繰り返し型 PKS では、この 6 つのドメインが一組しか存在せず、何度も繰り返して反応を触媒する。しかし基質となるポリケタイド鎖の伸長過程において特定の炭素鎖長、酸化度の際は選択的に機能しないドメインが存在し、各炭素鎖伸長段階で酸化度の異なるポリケタイド鎖が生成する。この複雑で未知の制御機構は非常に興味深く、制御機構の理解を深めることで遺伝子工学的手法により望みの機能を持つ PKS を作製可能である。つまりポリケタイドの鎖長、酸化度、メチル基の置換様式を自由に設計することができ、今後の生理活性物質の創出が期待できる。

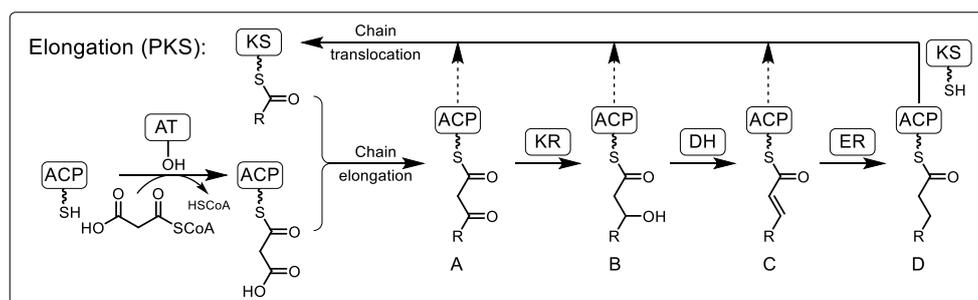


図 5-1-1. PKS による炭素鎖伸長

PKS の繰り返し制御機構を明らかにする効果的な手法として、異種 PKS-NRPS 間でのドメインを交換したキメラ酵素の機能解析が知られている。ドメイン交換実験では、ドメインを交換したキメラ酵素を異宿主で発現し、その形質転換体が生産した化合物の化学構造からドメインの交換が機能に与えた影響を調べることができる。注目する PKS-NRPS の機能や相同性、交換するドメインの領域、連結様式などによって生成物の有無や生産量が大きく変化するため、成功例が極めて少ない難しい実験である。以下に、これまでに報告されている 3 つの成功例を紹介する。

1) 2011年にFischらは、ポリケタイド鎖の炭素数が10であるtenellinの生合成に関わるPKS-NRPS遺伝子(*tenS*)と、炭素数12のdesmethylbassianin生合成に関わるPKS-NRPS遺伝子(*dmbS*)を題材としてドメイン交換実験を行った<sup>1</sup>。生成物の化学構造の類似性から予想されるように両酵素のidentityは85%と非常に高いため、連結部位(連結方法)による酵素活性の減少などを考慮する必要がないことが特徴である。TenSをベースとして、一部のドメインをDmbSの対応するドメインと交換したキメラ酵素遺伝子は麹菌へと導入され、各形質転換体を与えた化合物の化学構造からドメインの交換が機能に与えた影響が調べられた。その結果、以下の事柄が明らかにされた(図5-1-2)。

- MTドメインの交換によって、ポリケタイド鎖の炭素鎖長と二重結合に影響せずに、メチル基が2つから1つに減少したdesmethylpretenellin Aが生成した。これより、MTドメインがメチル基の導入数を制御していると推定された。
- MT-ER<sup>0</sup>-KRドメインの交換により、predesmethylbassianin(炭素数12)が生成した。他キメラ酵素の生成物を考慮すると、KRドメインが鎖長を制御しているドメインの1つではないかと考えられた。
- TenSのC-A-T-Rドメインは、本来は炭素数10のポリケタイド鎖を認識するが、炭素数12も受容可能である。

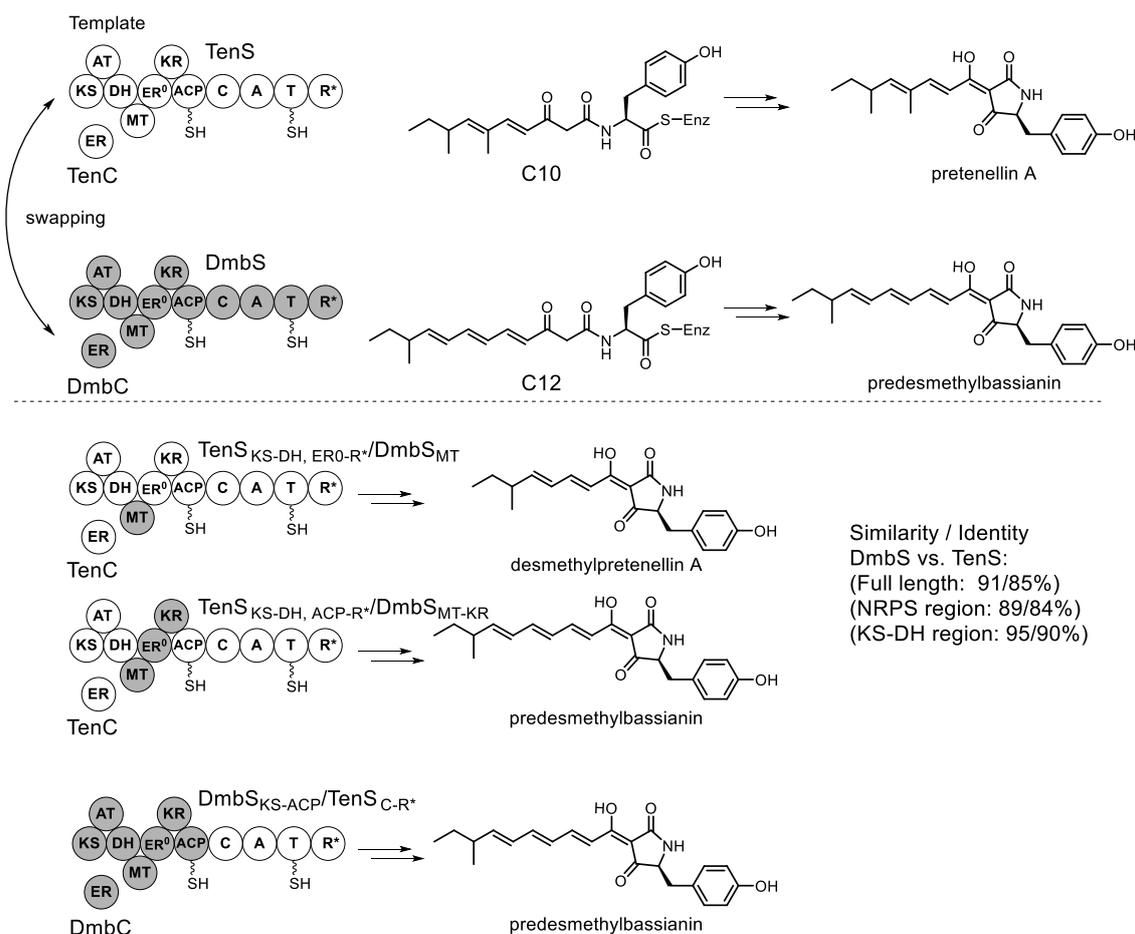


図 5-1-2. TenS と DmbS 間でのキメラ酵素

2) 2014年にKakuleらは、ポリケタイド鎖の炭素数が16のtrichosetin生合成に関わるPKS-NRPS遺伝子(*eqxS*)と、炭素数14のfusaridione A生合成に関わるPKS-NRPS遺伝子(*fsdS*)を題材としてドメイン交換実験を行った(図5-1-3)<sup>2</sup>。先の例と異なる点は、両酵素のidentityが46%であること、ポリケタイド部だけでなくアミノ酸部の構造が異なることである。また、一般にキメラ酵素の生産性は天然型よりも劣る場合が多く、高い生産性を示す宿主で研究をおこなわなければならない。そこで筆者らは異種発現による高生産を確認している糸状菌*Fusarium heterosporum*を宿主として用い、キメラ酵素による低収量の生産物でも解析可能とした。得られた結果を以下にまとめる。

- a. NRPS部を交換したキメラ酵素(*EqxS<sub>KS-ACP</sub>/FsdS<sub>C-R\*</sub>*)は、trichosetinのアミノ酸部がTyrに置き換わったeqxTyrを生成物として与えた。eqxTyrはtrichosetinのポリケタイド鎖にTyrが連結した前駆体から生成することから、元々は炭素数14のポリケタイド鎖を認識するFsdS由来のNRPSが炭素数16を受容可能であることが示された。また、連結点により生成物の収量に変化していたことから、着目するPKS-NRPS間の相同性が低下するにつれて、連結点の選択が重要になると考えられた。
- b. 同じくNRPS部を交換したキメラ酵素(*FsdS<sub>KS-ACP</sub>/EqxS<sub>C-R\*</sub>*)は、FsdS由来のポリケタイド鎖が加水分解された後に末端が脱炭酸したポリエンが生成した。このことから、EqxSのNRPS部はPKSの機能に影響は与えないものの、C16、かつ分岐メチル基が3つのポリケタイド鎖でなければ受容せず、伸長したポリケタイド鎖のみが切り出されることが示唆された。同じようなポリケタイド鎖の切り出しは、より相同性の低いPKS-NRPS間でのドメイン交換実験でも観測されている。(EqxS vs. LovB, KS-C region: 54/38%, KS-ACP region: 56/40%, KS-DH region: 62/47%, )

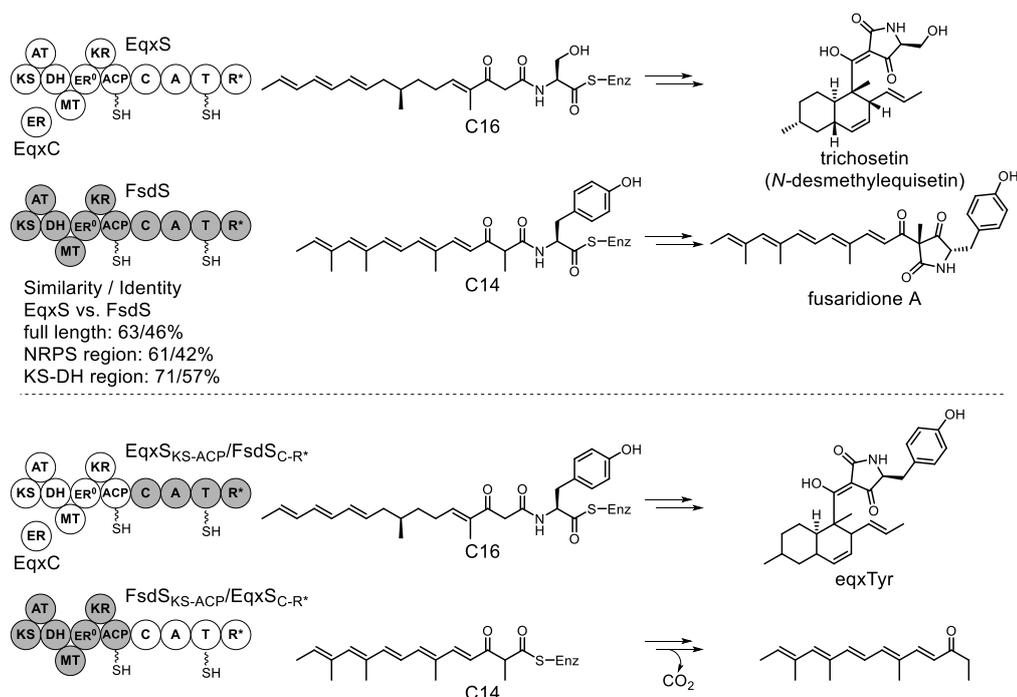


図5-1-3. EqxSとFsdS間でのキメラ酵素

3) 2016年にNielsenらは、ポリケタイド鎖の炭素数が16のcytochalasin生合成に関わるPKS-NRPS遺伝子(*ccsA*)と、同じく炭素数16のniduporthin生合成に関わるPKS-NRPS遺伝子(*syn2*)間でキメラ酵素遺伝子を調製し、糸状菌*Aspergillus nidulans*を宿主とした異種発現によって機能解析を行った(図5-1-4)<sup>3</sup>。この実験では、主に、PKSとNRPSを連結するリンカー領域での連結様式に着目して実験が行われ、以下の実験結果が報告されている。

- 2種のキメラ酵素(*CcsA*<sub>KS-ACP</sub>/*Syn2*<sub>C-R</sub>、*Syn2*<sub>KS-ACP</sub>/*CcsA*<sub>C-R</sub>、両者の相同性は71%)は、本来の機能から予想されるポリケタイド鎖とアミノ酸を連結した鎖状前駆体を生成物として与えた。
- ACPおよびCドメインのドメイン間領域(~150 aa)を極端に短く(3 aa)したキメラ酵素であっても、対応する鎖状前駆体を生成物として与える。

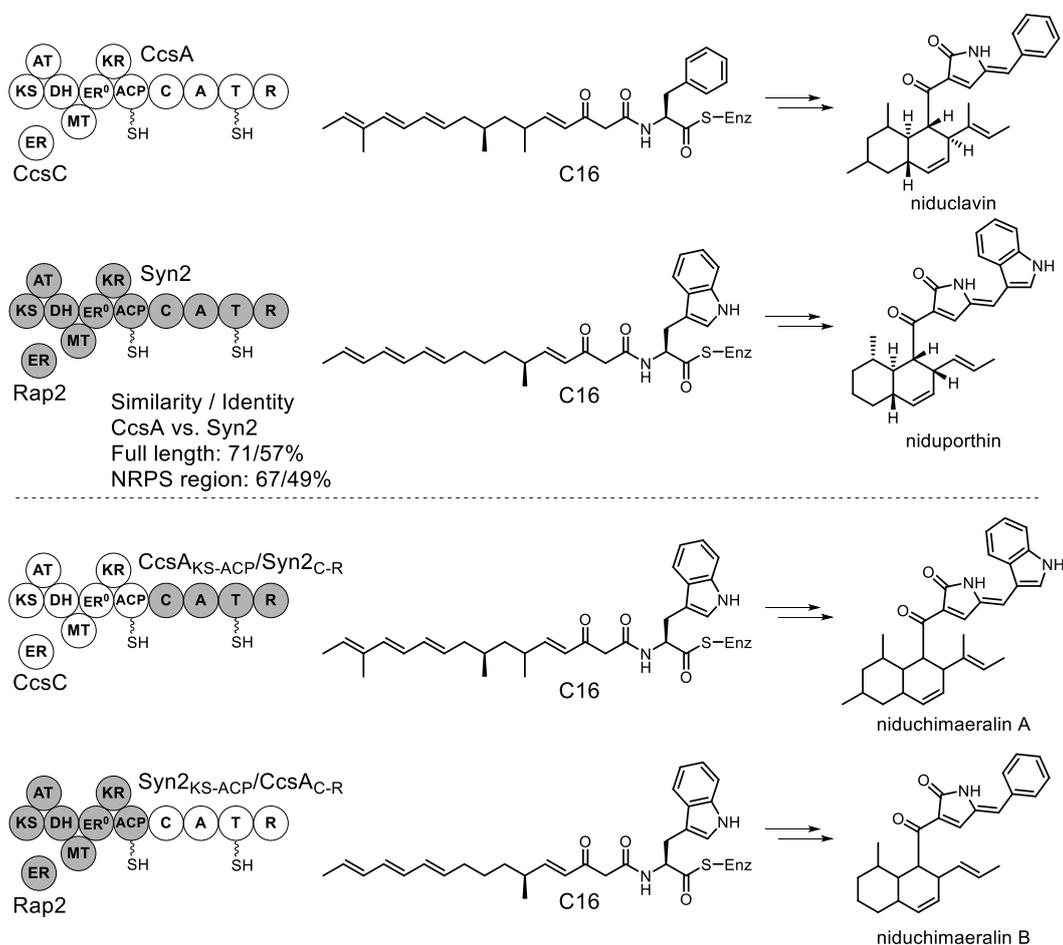


図5-1-4. CcsAとSyn2間でのキメラ酵素

以上に示した 3 つの報告例から、ドメイン交換実験の現状は以下のようにまとめられる。

- ① ドメイン交換実験の成否は、注目する **PKS-NRPS** 間の相同性と高い相関関係を示す。具体的には、**PKS** 部のドメイン交換実験では **90%** の **identity** を示す **TenS/DmbS** 間でのみ成功例が報告されており、**NRPS** 部のドメイン交換実験では **42%** と低い **identity** を示す酵素間 (**EqxS/FsdS**) でも成功例が報告されている。一方で、相同性が **35%** を示す酵素間 (**PsoA/FsdS**) では期待された生成物は得られていない。
- ② **NRPS** 部の交換は、上流に位置する **PKS** の機能に影響を与えない。また、交換した **NRPS** が **PKS** によって構築されたポリケタイド鎖を認識しない場合、そのポリケタイド鎖は切り出される可能性もある。
- ③ キメラ酵素作成時の連結様式が酵素活性に影響を与える可能性が高いものの、連結点の設計指針は得られていない。
- ④ ③の解決には多検体の分析が必要不可欠であるが、キメラ酵素の作成がプラスミドベースで行われているために 1 つのキメラ酵素発現用プラスミドの構築と機能解析に時間がかかる。
- ⑤ 全世界的にみても **PKS-NRPS** の機能を異種発現で解析できる研究者が少なく、研究対象となる **PKS-NRPS** の絶対数が少ない。

また、本研究を系統的に行うのが難しい理由として、以下が考えられる。

- ⑥ 意図しない配列のスプライシングを防ぐために **exon** 配列を用いる必要があること。
- ⑦ キメラ酵素では生産性が減少することから、これまで以上の高生産を示す異種発現宿主が必要になること。
- ⑧ キメラ酵素作成時に適切な位置で切断すること。
- ⑨ キメラ酵素の材料となる、機能解析済みの **PKS (-NRPS)** が少ない。

このうち、**PKS-NRPS** 部のドメイン交換を行うには、連結点の設計指針を得ることと実践的な機能解析法の確立が必要不可欠である。将来的には合成 **DNA** の供給を前提として、本章では比較的 success 率が多い **NRPS** 部に着目したドメイン交換実験を題材とした機能解析を行った。

## 5-2. 従来法に従ったキメラ酵素遺伝子の機能解析

### 5-2-1. キメラ酵素の材料選定と性質

前節 5-1 の末尾でも述べたが、NRPS 部のドメインについて組み換えを行い、キメラ酵素の作成と機能解析に習熟することを目的とした研究を行った。材料として、2014年に当研究室の山根が麹菌異種発現系を用いて機能解析を行った *hirsutellone* の骨格構築に関する PKS-NRPS である *hirA*<sup>4</sup> と、第 3 章にて機能解析を行った *asolS* を用いた。

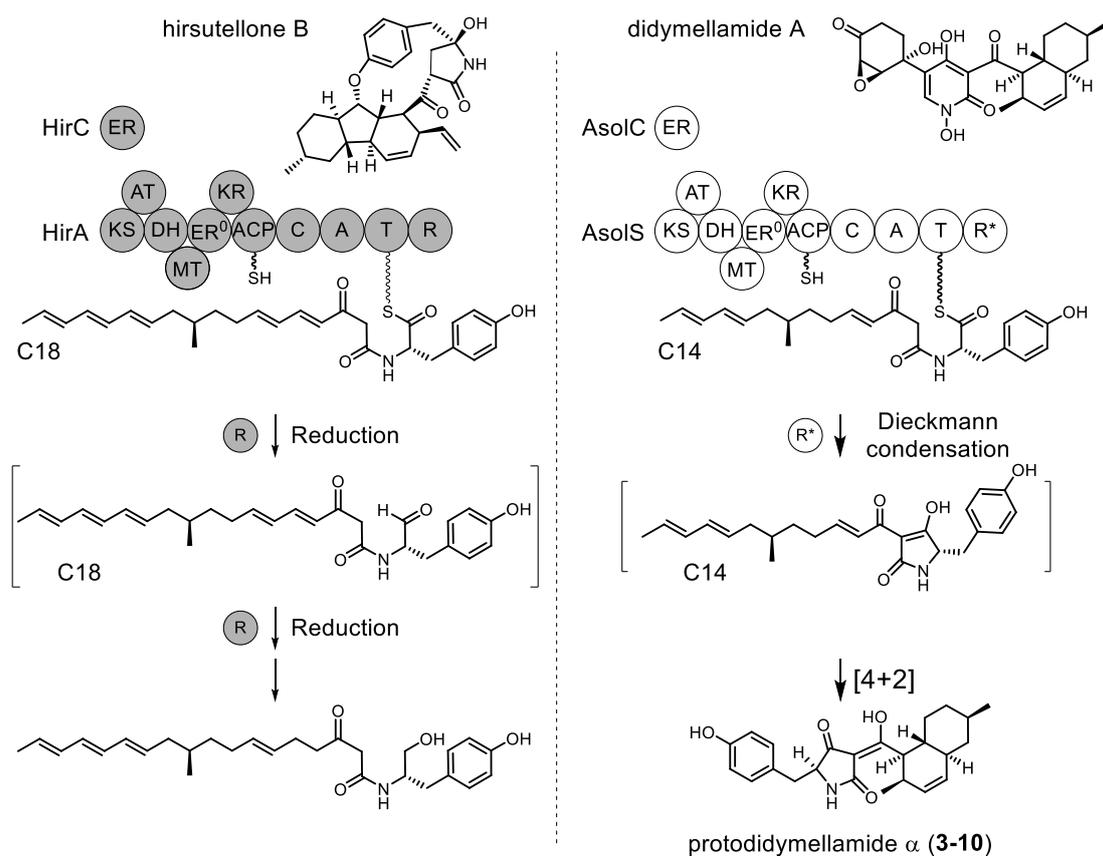


図 5-2-1. HirA と AsolS の機能

HirA, C と AsolS, C の機能は図 5-2-1 に示した通りである。HirA の末端には Bet1 と同様に R ドメインがあるため、ポリケタイド鎖を還元的に切り出してアルデヒドを生成する。その後、宿主による過還元が進行する。一方で AsolS は末端に Dieckmann 縮合を触媒する R\*ドメインを有しており、化合物 3-10 に見られるテトラミン酸構造を構築する。

これら 2 つの酵素間で R と R\*ドメインを交換することで、KS から T ドメインまでが HirA 由来で、R\*ドメインが AsolS 由来のキメラ酵素 *HirA<sub>KS-T</sub>/AsolS<sub>R\*</sub>* と、KS から T ドメインが AsolS 由来で、R ドメインが HirA 由来のキメラ酵素 *AsolS<sub>KS-T</sub>/HirA<sub>R</sub>* を作成し、それぞれが天然型とは異なるポリケタイド鎖長を認識し、末端の部分構造が入れ替わったような化合物を生産することが期待された (図 5-2-2, A または B)。

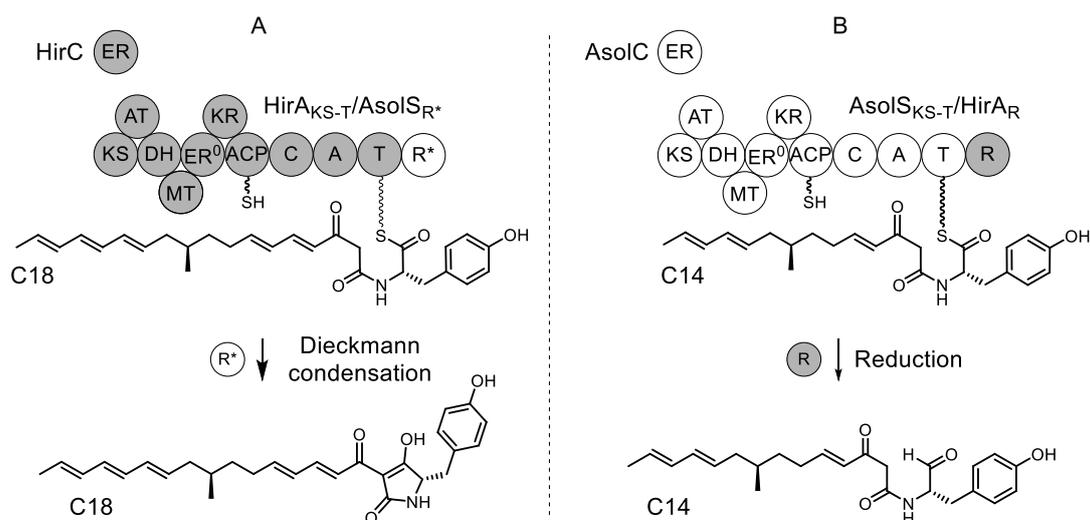


図 5-2-2. R と R\*を交換したキメラ酵素の予想生成物

実際に、どのポリペプチド位置でキメラ酵素を構築するか設計した。タンパク質の活性は、立体構造（三次構造）によって大きな影響を受ける。さらに、序論でも述べた通り PKS の各触媒活性はそれぞれのドメインによって制御されており、キメラ酵素作成の際にドメインの機能を損なわないように配慮する必要があったため、以下の条件でキメラ酵素作成位置を探索した。

- ① 各ドメイン境界について、クエリー配列内の既知タンパク質のモチーフを Pfam によって検索できる NCBI のウェブツール Conserved Domain Database (CDD) で確認し、ドメインの端、またはドメイン間領域に組み替え位置を設計することでドメインの不活化を予防した。
- ② 材料となる配列を哺乳類由来の FAS と比較、さらに二次構造予測ツール JPred4 で解析し、二次構造が存在しないと予測された箇所、もしくは二次構造の端に組み替え位置を設定し、意図しない二次構造の破壊を予防した。

上記①および②を踏まえ、HirA をベースとした実験 A と AsolS をベースとした実験 B で組み換え位置をそれぞれ 3 種類ずつ、計 6 種類を設計し、それぞれプラスミドを構築して trans-ER と同時に麹菌へと導入した。組み換え位置が N 末に近い点から順番に Chim\_1, \_2, \_3 とした (図 5-2-3)。Chim\_1 は T ドメインの C 末端に存在する相同な領域の、ヘリックスの端の部分を組み換え位置としており、ドナー配列のヘリックスに丸ごと交換している。Chim\_2 は Chim\_1 と同様にヘリックスの末端を組み換え位置としているが、AsolS にのみヘリックス構造が存在している上、T と R ドメインの間の領域に設定した。Chim\_3 は R ドメインの N 末端の二次構造が予測されていない領域に設計した (図 5-2-3)。



## 5-2-2. AO-asolCS<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R</sub> の機能解析

まず AsolS の R\*ドメインを HirA 由来 R ドメインに入れ替えたキメラ酵素遺伝子を麹菌に導入し、形質転換体 AO-asolCS<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R\_1</sub>, AO-asolCS<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R\_2</sub>, AO-asolCS<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R\_3</sub> を調製した。

米培地から得られたそれぞれの粗抽出物を 60% MeOH に溶解し、10% MeOH で平衡化した C8 の Sep-Pak (Waters, WAT036775) に吸着させた後、60% MeOH で 2 回洗浄した。続いて 100% MeOH で溶出した画分を UPLC-MS で分析したところ、3 種全ての組み換え位置で新たな 2 つの化合物 (図 5-2-4, **5-1** ; 1.48 分、**5-2** ; 1.53 分) が観測された。後述するように、培養期間を長くすると **5-1** は **5-2** へと変換されたことを受けて、**5-2** の単離、構造決定を行うことにした。

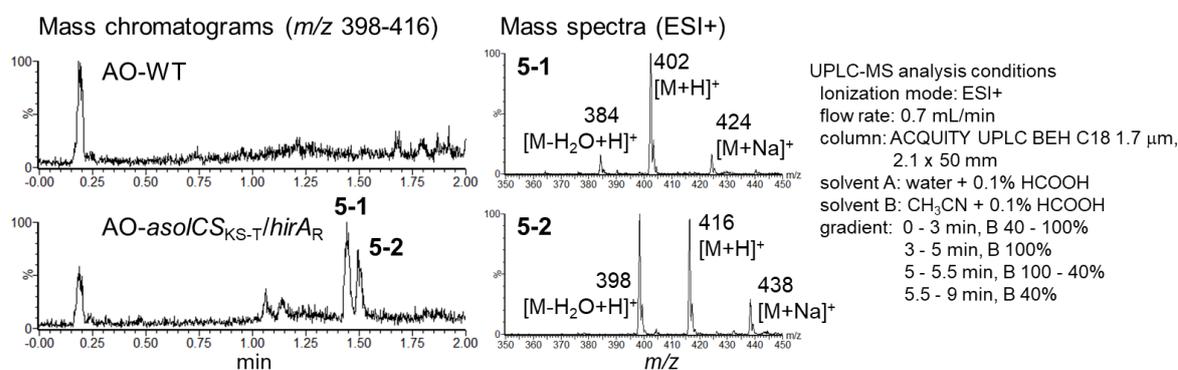


図 5-2-4. AO-asolCS<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R</sub> の代謝産物解析

固体培地で培養して得た粗抽出物を逆相クロマトグラフィーとシリカゲルカラムクロマトグラフィーで順次精製することで **5-2** (24 mg / kg) を得た。HR-MS から、その分子式を C<sub>24</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>5</sub> と決定した。<sup>1</sup>H-NMR を測定したところ、パラ-2 置換ベンゼンに由来する 2H 分のダブルットシグナルが 2 つ ( $\delta_{\text{H}}$  7.05, 6.69) と、ジエンに相当する 2H 分のマルチプレットシグナルが 2 つ ( $\delta_{\text{H}}$  5.98, 5.52)、アリル位のメチル基に相当するダブルットシグナルが 1 つ ( $\delta_{\text{H}}$  1.71)、メチル基に相当するダブルットシグナルが 1 つ ( $\delta_{\text{H}}$  0.86) が存在していた (図 5-2-5)。また、<sup>13</sup>C-NMR 測定では、3 位ケトン、2'位カルボン酸、1 位アミドのカルボニルに由来する炭素シグナル ( $\delta_{\text{C}}$  206.6, 174.6, 168.9) がそれぞれ観測された。これより、AsolS により構築されたポリケタイド鎖にある  $\alpha,\beta$ -不飽和ケトンの二重結合部位が還元され、さらに NRPS から切り出されたアミノ酸部位が酸化されてカルボン酸へと変換された構造が推定された。

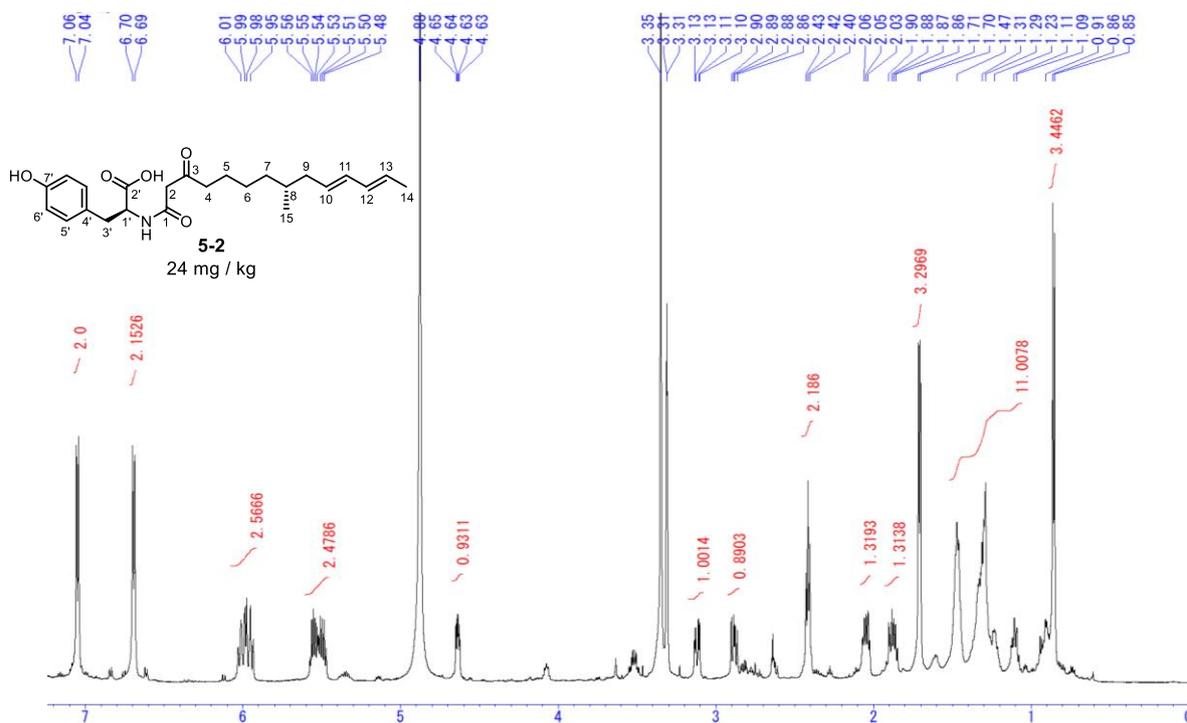


図 5-2-5. 化合物 **5-2** の <sup>1</sup>H-NMR 解析 (in CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

**5-2** がカルボン酸構造であるか確かめるため、TMS-ジアゾメタンによるメチル化反応を行った。8.6 mg の **5-2** をメタノールに溶解し、TMS-ジアゾメタンによりメチル化した (図 5-2-6)。生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、HPLC で精製して 1.0 mg の生成物を得た。得られた化合物の分子式は HR-MS 解析から C<sub>26</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>5</sub> と決定し、**5-2** のジメチル化体であると推定した。<sup>1</sup>H-NMR の解析から、**5-2** で観測された特徴的なシグナルに加えて、酸素に隣接したメチル基に相当する 3H 分のシングレットシグナル (δ<sub>H</sub> 3.70, 3.76) が 2 つ存在していた (図 5-2-7)。H1'-C2', H11'-C2', H4-C3, H10'-C7'間で HMBC 相関が観測されたことなどから、フェノール性水酸基とカルボン酸がメチル化された **5-3** であると決定した。これにより、**5-2** の構造も確かめられた。

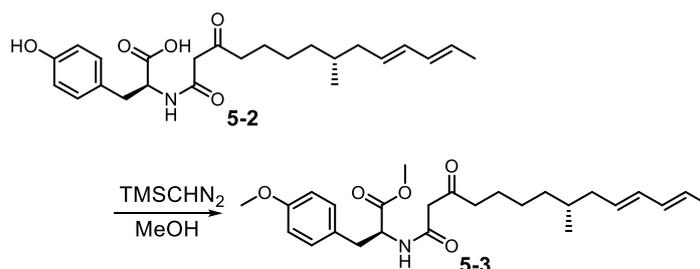


図 5-2-6. 化合物 **5-2** の TMS-ジアゾメタンによるメチル化

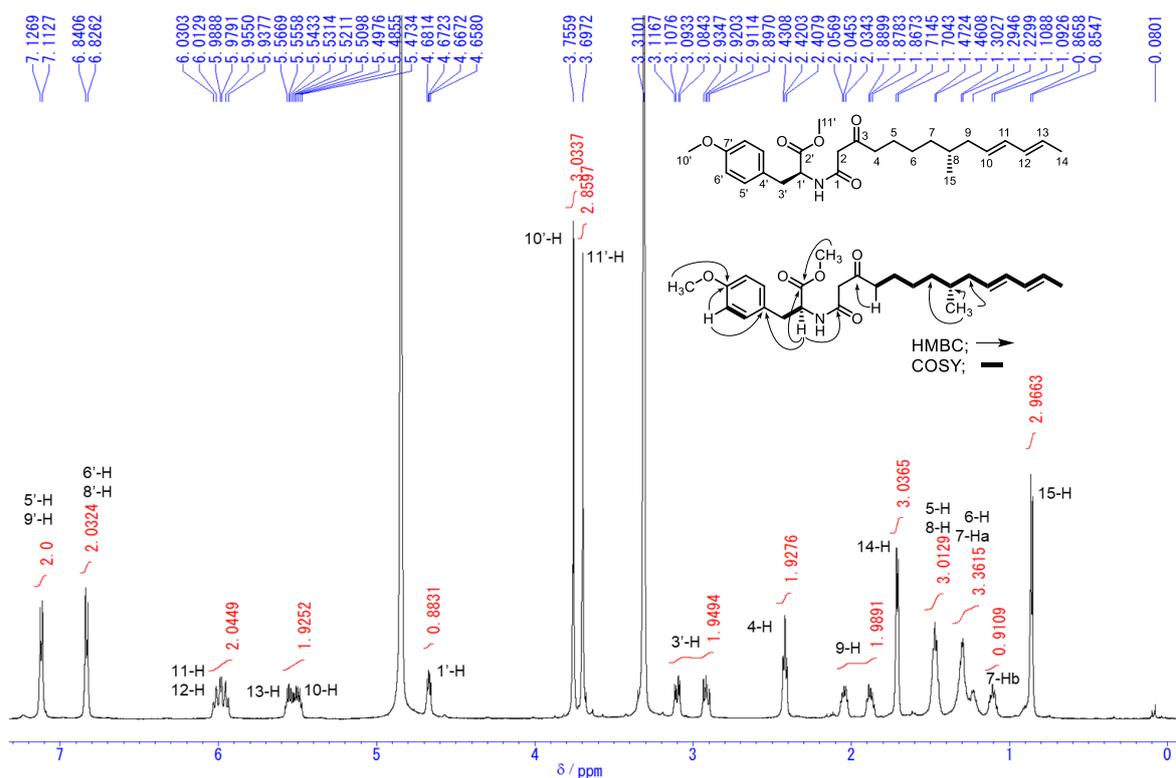


図 5-2-7. 化合物 **5-3** の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトル (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

カルボン酸 **5-2** のポリケタイド部分の構造から、構築したキメラ酵素 (*Asol*<sub>KS-T</sub>/*HirA*<sub>R</sub>) の PKS 部は、図 5-2-1 の右側で示した、*Asol*SC によって得られるポリケタイド鎖と同じであることがわかった。一方で、2'位は *HirA* 由来 R ドメインの働きでアルデヒドを与える と推定していたが、カルボン酸に酸化されていた。原因として、生成物がキメラ酵素とチオエステル結合を介して酵素に結合している際に R ドメインが機能せず直接加水分解されているのか、もしくは R ドメインが機能してアルデヒドとして切り出された後、宿主由来の酸化酵素によって酸化されたことが考えられる。どちらが正しいかを確かめるため、図 5-2-4 で示した保持時間 1.47 分のピークに着目した。このピークは  $m/z$  402  $[\text{M}+\text{H}]^+$  を示すため、分子式は  $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{NO}_4$  と考えられ、加えて **5-2** の構造を元に推定すると、その構造は過還元反応が進行したアルコール **5-1** であることを強く示唆していた。アルコール **5-1**, カルボン酸 **5-2** を生産する *AO-asol*/*CS*<sub>KS-T</sub>/*hirA*<sub>R</sub> を米培地 10 g で 4, 8, 12, 16 日間培養して代謝産物を抽出し、UPLC-MS で解析してそれぞれの生産量の経時変化を観察した。すると、培養日数の増加に従ってアルコール **5-1** のピーク面積が減少し、カルボン酸 **5-2** に相当するピークの面積が増加していた (図 5-2-8)。以上から、*HirA* 由来の R ドメインは正常に機能して生成物をアルデヒドとして切り出した後、過還元反応が進行してアルコール **5-1** が先に蓄積する。続いて麹菌由来の酸化酵素によって **5-1** をカルボン酸 **5-2** へ酸化していることを支持していた。

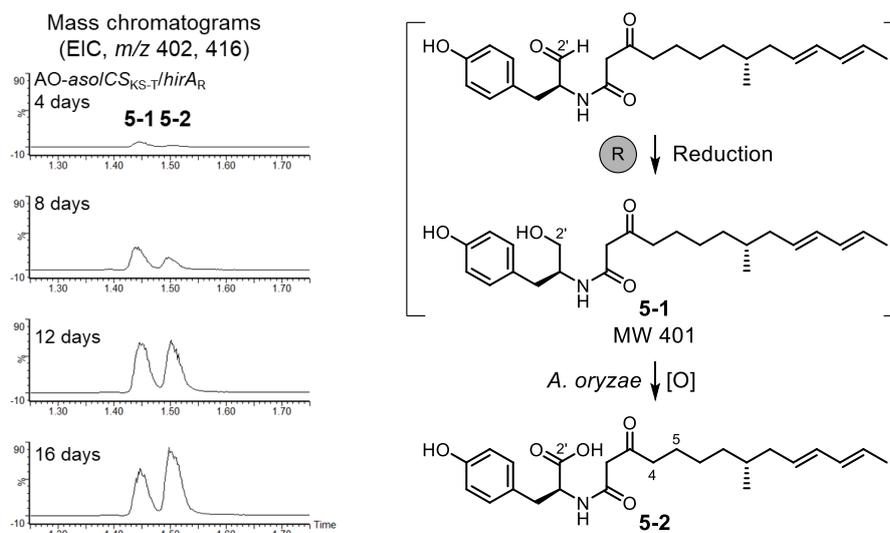


図 5-2-8. AO-*asolCS*<sub>KS-T</sub>/*hirA*<sub>R</sub> 由来代謝産物の経時変化分析

本項 5-2-2 で構築し機能解析を行ったキメラ酵素 *AsolCS*<sub>KS-T</sub>/*HirA*<sub>R</sub> による生成物 **5-2** は、4,5 位間のジエノフィルが還元されていたのに加え、2'位がアルデヒドとして切り出された後、還元されてアルコール **5-1** が生成した。このような宿主由来と推定される還元反応は、cytochalasin 類の生合成に関与する PKS-NRPS である *ccsA* と、その機能を相補する trans ER である *ccsC* を麹菌で異種発現した際に得られた化合物でも同様に観測されていたため、以前の知見と一致している<sup>5</sup>。

### 5-2-3. AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*</sub>の機能解析

前項 5-2-2 では、HirA 由来の R ドメインを組み込んだキメラ酵素 AsolS<sub>KS-T</sub>/HirA<sub>R</sub> が機能し、生成物 **5-2** を与えた。**5-2** は、麴菌において発現させた CcsA, CcsC による生成物と同様の修飾を受けていたものの、R ドメインの機能を確認できた<sup>5</sup>。続いて本項 5-2-3 では AsolS の R\* ドメインがキメラ酵素内で機能するかを調査した。そのため、HirA の R ドメインを AsolS 由来 R\* ドメインに入れ替えたキメラ酵素遺伝子を麴菌に導入し、形質転換体 AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*\_1</sub>, AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*\_2</sub>, AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*\_3</sub> を得た。

固体培地から得られたそれぞれの粗抽出物を 60% MeOH に溶解し、10% MeOH で平衡化した C8 逆相クロマト用担体に吸着させた後、60% MeOH で 2 回洗浄した。続いて 100% MeOH で溶出した画分を HPLC で分析したところ、AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*\_1</sub>、AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*\_2</sub> の 2 種類の形質転換体において新たなピークが観測された (保持時間 15 min)。この保持時間 15 分のピークの UV スペクトルは特徴的な 257, 266, 277 nm に極大吸収を持ったトリプレット様であったため、HirA, C の生成物と同様にトリエン構造を有することを支持していた (図 5-2-9, 上部)。**5-4** を C18 担体を用いたカラムクロマトグラフィーで分画した後、過剰量の TMS-ジアゾメタンを用いて誘導体化した。メチル化反応の生成物である **5-5** は  $m/z$  482 [M+H]<sup>+</sup> であったことから、分子式は C<sub>29</sub>H<sub>39</sub>NO<sub>5</sub> と推定され、**5-4** のマスペクトルとの比較からモノメチル化誘導体であった。本ピークをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画し、HPLC で精製した。

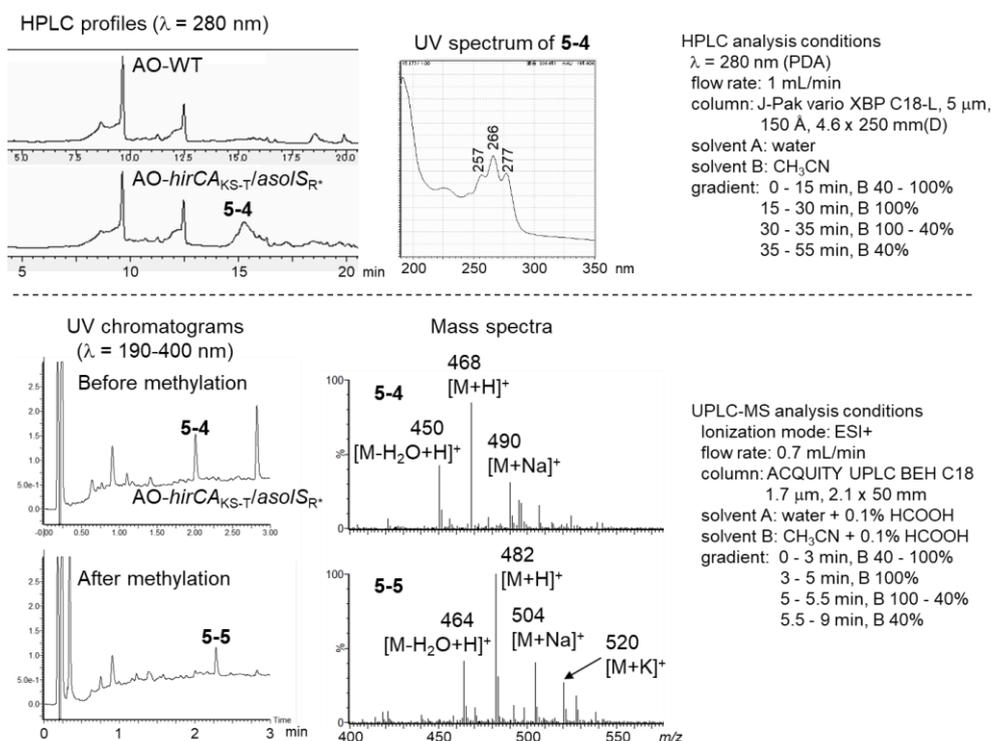


図 5-2-9. AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*\_1</sub> の代謝産物解析

AO-hirCA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R\*</sub>\_2 由来のメチル化体 **5-5** (2 mg / kg) は、<sup>1</sup>H-NMR において、パラ-2 置換ベンゼンに由来する 2H 分のダブルットシグナルが 2 つ ( $\delta_H$  6.95, 6.65) と、オレフィンに相当する合計 8H 分のマルチプレットシグナル ( $\delta_H$  6.13, 5.60, 5.29)、 $\beta$ -ジケトンに隣接した活性メチレンの 2H に相当するシングレットシグナルが 1 つ ( $\delta_H$  2.75)、アリル位のメチレンに相当する合計 8H 分のマルチプレットシグナル ( $\delta_H$  1.86-2.11)、アリル位のメチル基に相当するダブルットシグナルが 1 つ ( $\delta_H$  1.61)、メチル基に相当するダブルットシグナルが 1 つ ( $\delta_H$  0.88) 観測された (図 5-2-10)。加えて H1'-C2', H10'-C2', H4-C3, H2-C3, H2-C1 間で HMBC 相関が観測されたことなどから、HirA の PKS ドメインによって生成するポリケタイド骨格における 4,5 位のオレフィンが還元されたのに加え、ポリケタイド末端の 2'位がメチルエステルである構造が推定された。

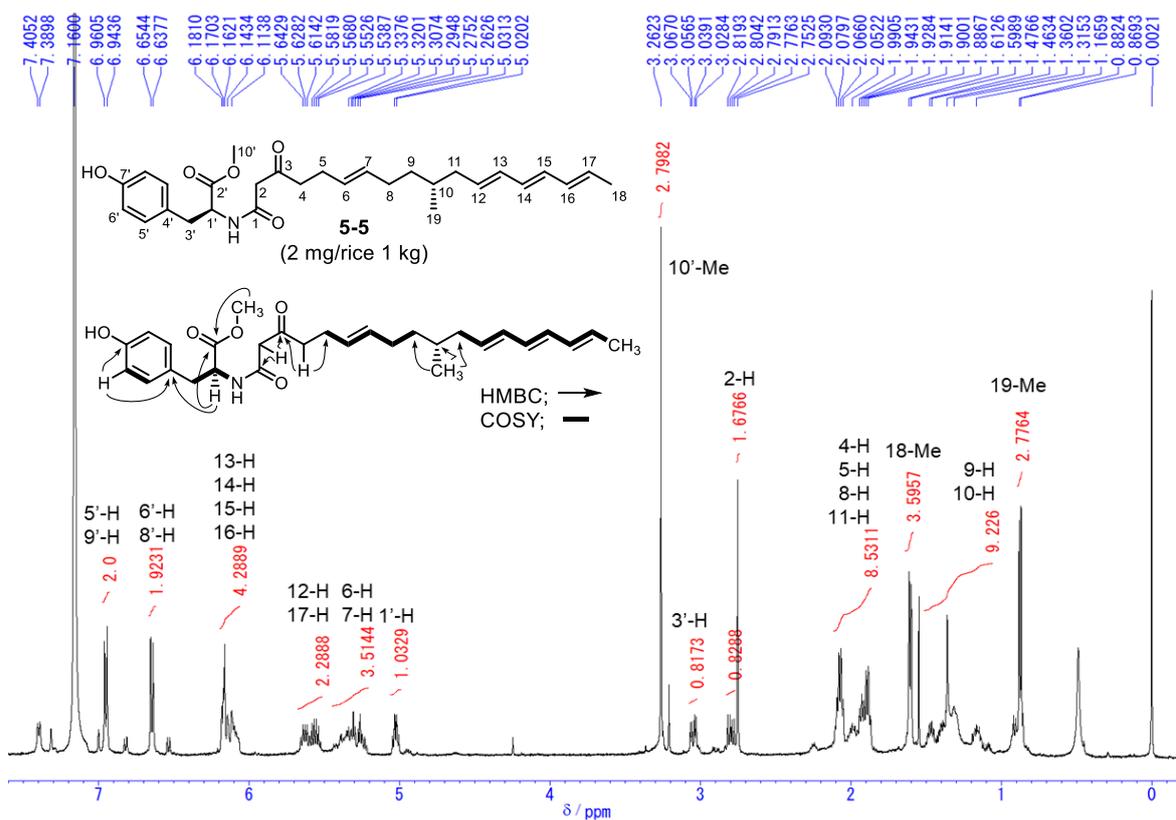


図 5-2-10. 化合物 **5-5** の <sup>1</sup>H-NMR スペクトル (in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 500 MHz)

メチル化体 **5-5** の構造から、**5-4** の 2'位はカルボン酸であると推定できる。HirA<sub>KS-T</sub>/AsolS<sub>R\*</sub>の R\*ドメインが狙い通りに機能していれば、ポリケタイド鎖が酵素から切り出される際に Dieckmann 縮合によってテトラミン酸を与えると予想していた。前項 5-2-2 において、AsolCS<sub>KS-T</sub>/HirA<sub>R</sub>による生成物 **5-2** の生産量が米培地 1 kg 当たり 24 mg

であったのに対し、HirCA<sub>KS-T</sub>/AsolS<sub>R\*</sub>による生産量は2 mgという低収量であることを加味すると、**5-4** はキメラ酵素と共有結合したチオエステルの加水分解産物であることが示唆された。この仮説が正しい場合でも、目的の反応であったテトラミン酸の形成と、推定された加水分解反応の、いずれの経路も2位の活性メチレン、もしくは水分子というチオエステルへの求核攻撃種が、R\*ドメインの活性部位に存在する塩基によって水素を引き抜かれる機構は同様である(図5-2-11)。切り出しドメインの中でも、TEドメインは一般に基質特異性が低く、本来とは異なる鎖長の生成物でも低効率ながら認識して加水分解することが知られている<sup>6</sup>。一方、本研究結果からDieckmann縮合を触媒するR\*ドメインは、基質特異性がTEドメインより厳密に制御されていることが示唆された。加えて、3か所の組み換え位置で調製したキメラ酵素HirA<sub>KS-T</sub>/AsolS<sub>R\*\_1, \_2, \_3</sub>の内、Chim\_3のみでカルボン酸**5-4**が生成しなかった。つまり、AsolSのR\*ドメインにおいてChim\_2とChim\_3の間にある短いアミノ酸配列が活性に重要な働きをしていたために化合物が生成しなかった可能性も否定できない。

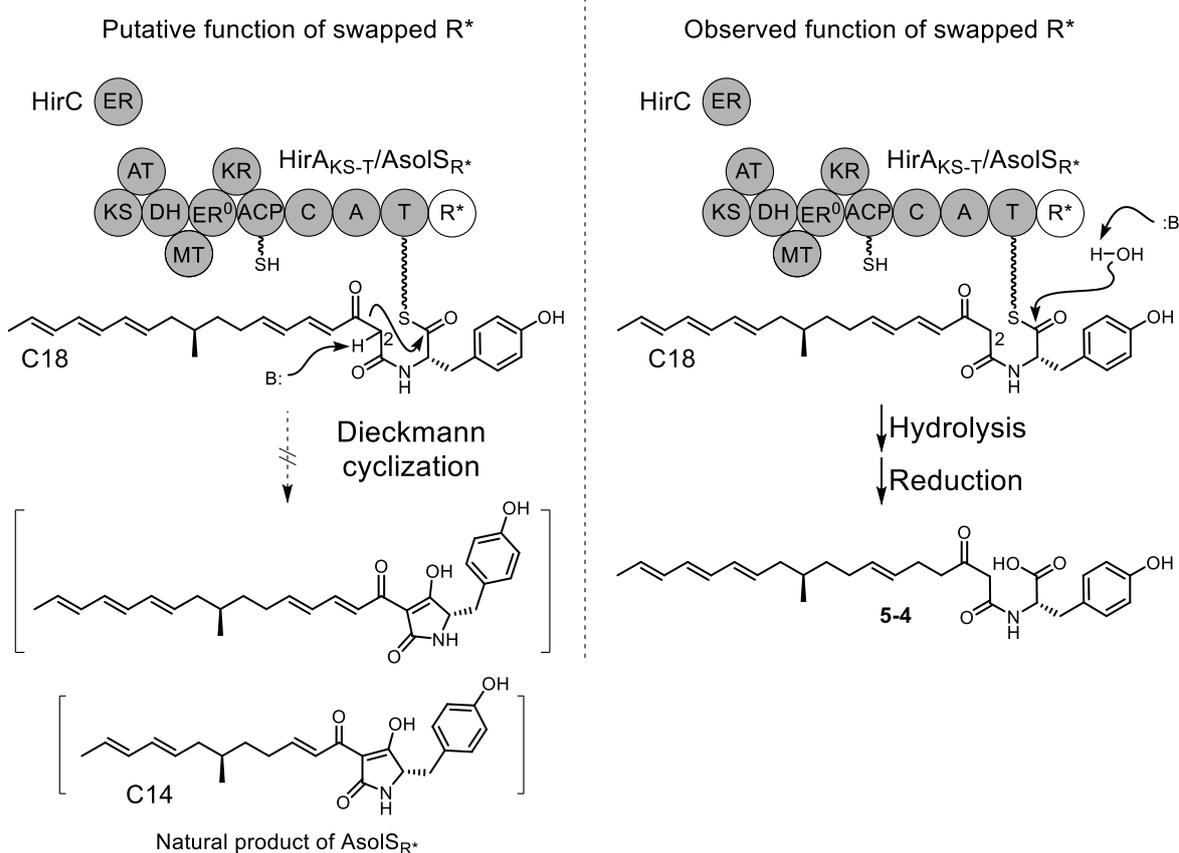


図 5-2-11. HirA<sub>KS-T</sub>/AsolS<sub>R\*</sub>の R\*ドメインの推定機能

### 5-3. 考察

前節 5-2 において、従来法と同様にキメラ酵素遺伝子を構築してから異種発現宿主に導入する手法を用いて R、R\*ドメイン間のスワップを行った。カルボン酸 5-2 と 5-4 の単離、およびその構造から、HirA 由来の R ドメインは基質特異性が広く、本来認識する炭素数 18 のポリケタイド鎖よりも短い AsolS 由来の炭素数 14 を認識可能であることを確認した。一方で、本来は炭素数 14 のポリケタイド鎖を認識する AsolS 由来の R\*ドメインは、HirA 由来の炭素数 18 を認識したものの、低活性かつ本来の Dieckmann 縮合活性を示さず、チオエステルの加水分解という活性を示したと考えられる。先行研究において、R\*ドメインが非天然型の基質を受容する例は 2008 年に *in vitro* での解析として報告されている<sup>7</sup>。本来は炭素数 14 のポリケタイド鎖を受容する FsdS の R\*ドメインに炭素数 4 の基質を作用させることで Dieckmann 縮合が進行しており、本研究と合わせて考えると、本来のポリケタイド鎖よりも 4 炭素以上長いと Dieckmann 縮合が進行しないことを示唆している。

R\*ドメインが HirA 由来の炭素鎖を認識しておらず、非酵素的に加水分解される可能性について議論すると、先行研究において、一般にポリケタイド鎖の切り出しは、ピロン環の形成という例外を除くと非酵素的に進行しないと報告されている<sup>8</sup>。AO-*hirCA*<sub>KS-T</sub>/*asolS*<sub>R\*\_2</sub> 由来のメチル化体 5-5 の収量が 2 mg / kgであることを考えると、AsolS 由来の R\*ドメインによる触媒活性によってカルボン酸 5-4 が得られていると考えられる。以上、化合物の切り出しを担う R、R\*ドメインは、TE ドメインほどではないものの、他のドメインに比べて基質特異性が緩やかであると言える。

#### 5-4. まとめ

5章を通して、先行研究で行われたようにキメラ酵素遺伝子をプラスミドとして構築した後、異種発現宿主に導入して機能解析を行った。本研究で行った **PKS-NRPS** の **R** ドメインに関する研究例は、適切な基質供給が困難なためか、ほとんど知られていない。今後は、本研究で得られた知見を活かし、さらに広範囲のドメイン交換を行い、より多くの知見を得るための実験を行う予定である。その際に、従来までのキメラ酵素遺伝子構築法を踏襲していると、研究に費やす時間と労力が級数的に増大してしまう欠点がある。例として、本研究でキメラ酵素の組み換え位置は **3** か所を設計したが、**HirA<sub>KS-T</sub>/AsolS<sub>R\*</sub>\_3** のように活性が確認できないキメラ酵素を作成してしまう場合がある。原因として、予期しない二次構造の破壊や、相互作用に重要な残基を取り除いてしまい三次構造が乱れてしまう危険は排除できず、さらに多くの組み換え位置を試行する必要がある。その場合、構築する必要があるプラスミドの数が増えてしまうため、研究の律速段階となってしまう。

今後の円滑な研究遂行のために、複雑なキメラ酵素遺伝子作成の労力を低減するための新規手法が求められた。そこで **Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR Associated Proteins 9 (CRISPR/Cas9)** システムを用いた部位特異的な組み換えを検討すべきである。

**CRISPR/Cas9** を用いたゲノム編集技術は、これまでに幅広く応用された汎用技術である。その特徴は、ヌクレアーゼである **Cas9** が、ガイド RNA の 5'末端側 **20 bp** に組み込まれた相補鎖によって標的部位に誘導され、DNA の二本鎖切断 (**DSB**) を部位特異的に引き起こすことである。**Cas9** タンパク質を誘導可能な個所はプロトスペーサー隣接モチーフ (**PAM**) と呼称され、**Cas9** の由来種によって異なる。例として *Streptococcus pyogenes* 由来 **Cas9** の **PAM** 配列は **5'-NGG** であり、ガイド RNA の設計に制限はあるものの、**Cas9** タンパク質の誘導個所は自由に決定できる。

**Cas9** タンパク質が引き起こす **DSB** は細胞にとって致死的であるため、これを修復する機構が **2** 種類知られている。**1** つは **Non-Homologous End Joining (非相同末端結合, NHEJ)** であり、切断された DNA 末端を直接繋ぎ合わせる修復機構である。一般に **NHEJ** は修復の際に塩基の欠失、または挿入を引き起こしやすく、意図的なフレームシフトによる遺伝子のノックアウトに利用される。もう **1** つは **Homologous Recombination (相同組み換え, HR)** であり、切断された箇所の近辺と相同な遺伝子を姉妹染色分体より検索して増幅し、合成した相補鎖を用いる修復機構である。一般に **HR** は、宿主染色体に対して部位特異的に遺伝子を挿入することが可能であるため、標的遺伝子の欠失や、外来遺伝子の異種発現に利用される。

従来の麴菌異種発現系で用いてきた形質転換法では、ランダムインテグレーションによって染色体へ外来遺伝子を組み込んでいた。その場合、挿入された遺伝子座に応じて外来遺伝子の活性が見られない、または著しく低下することが経験的に疑われた。前節 **5-2** で用いた従来法での遺伝子導入では、キメラ酵素の活性が消失しているのか、もしくはキメラ酵素遺伝子が導入された遺伝子座の性能が悪いのか、判別が難しい。

この点を克服するため、以上で述べた **CRISPR/Cas9** の特徴を利用してキメラ酵素遺伝子

を従来法よりも簡便に構築し、確実に発現させる手法を開発した。まずキメラ酵素作成の前に、ベースとなる **PKS-NRPS** を麹菌に導入し、得られた形質転換体のスクリーニングによって生成物が確認された株を選抜する。この生産株に対して **CRISPR/Cas9** システムを利用し、ベース **PKS-NRPS** の任意の箇所で **DSB** を引き起こす。加えて切断個所と相同な配列である“腕”を取り付けたドナー配列を導入することで **HR** による **DNA** 修復が起こり、宿主染色体上で、キメラ酵素遺伝子が構築できる。このキメラ酵素遺伝子が存在する遺伝子座は、化合物の生産が事前に確認された「ホットスポット」であるため、設計したキメラ酵素に活性がある場合には必ず生成物を与えることが期待される。

**CRISPR/Cas9** を適用できる宿主はバクテリアやヒト細胞など多岐に渡るが、糸状菌において利用した例は報告されていなかった。しかし 2016 年に Katayama らによって、コドン最適化した *S. pyogenes* 由来 **Cas9** が麹菌で機能し、**CRISPR/Cas9** システムが利用可能であることを報告されている<sup>9</sup>。本手法を取り入れることで、さらに複雑なキメラ酵素の作成が期待できる。

5 章で行った研究は、米国エネルギー省の共同ゲノム研究所 (**JGI**) より、将来的に多数の **PKS-NRPS** の **exon** 配列が入手可能という状況において、その先行研究として行った。キメラ酵素作成時の組み換え位置や、実際にキメラ酵素に由来する物質の生産量が構造決定に十分であったことから、本研究は今後の研究へと活用可能である。

## References

- 1) K. M. Fisch, W. Bakeer, A. A. Yakasai, Z. Song, J. Pedrick, Z. Wasil, A. M. Bailey, C. M. Lazarus, T. J. Simpson, and R. J. Cox, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 16635.
- 2) T. B. Kakule, Z. Lin, and E. W. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 17882.
- 3) M. L. Nielsen, T. Isbrandt, L. M. Petersen, U. H. Mortensen, M. R. Andersen, J. B. Hoof, and T. O. Larsen, *PLOS ONE* **2016**, DOI:10.1371/journal.pone.0161199.
- 4) M. Yamane, Master thesis, Hokkaido University, **2016**.
- 5) R. Fujii, A. Minami, K. Gomi and H. Oikawa, *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2999.
- 6) H. Zhou, J. Zhan, K. Watanabe, X. Xie, and Y. Tang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6249.
- 7) J. W. Sims and E. W. Schmidt, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 11149.
- 8) W. Xu, Y-H. Chooi, J. W. Choi, S. Li, J. C. Vederas, N. A. D. Silva, and Y. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 6472.
- 9) T. Katayama, Y. Tanaka, T. Okabe, H. Nakamura, W. Fujii, K. Kitamoto, and J. Maruyama, *Biotechnol. Lett.* **2016**, *38*, 637.

## 第 6 章 実験部

### 6-1. 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.  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra were recorded on Bruker AMX-500 spectrometer (500 MHz for  $^1\text{H}$ -NMR and 125 MHz for  $^{13}\text{C}$ -NMR). NMR spectra were recorded in  $\text{CDCl}_3$  (99.8% atom enriched; Kanto),  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$  (99.9% atom enriched; Kanto),  $\text{CD}_3\text{OD}$  (99.8% atom enriched; Kanto),  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  (99.9% atom enriched; Kanto), and  $[\text{D}_5]\text{pyridine}$  (99.8% atom enriched; ACROS). Chemical shifts were referenced to an internal standard ( $\text{CDCl}_3$ ;  $^1\text{H}$ -NMR  $\delta = 7.26$  ppm,  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta = 77.0$  ppm,  $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR  $\delta = 2.50$  ppm,  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta = 39.5$  ppm,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR  $\delta = 3.31$  ppm,  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta = 49.0$  ppm,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR  $\delta = 2.05$  ppm,  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta = 29.8, 206.3$  ppm, and  $[\text{D}_5]\text{pyridine}$ ;  $^1\text{H}$ -NMR  $\delta = 7.22, 7.59, 8.74$  ppm,  $^{13}\text{C}$ -NMR  $\delta = 123.9, 135.9, 150.2$  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. Mass spectra were obtained on Waters ACQUITY QDa (ESI mode), JEOL JMS-T100LP (ESI mode) or JEOL JMS-T100GCV (EI mode). Oligonucleotides for polymerase chain reaction (PCR) were purchased from Hokkaido System Science Co., Ltd. PCRs were performed with a BioRad S1000 thermal cycler. Cell disruption was achieved with an ultrasonic disrupter UR-200 P (TOMY SEIKO, Tokyo, Japan). Analysis of the samples during protein purification was performed by means of SDS-PAGE, 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.

## **6-2. Betaenones**

### **6-2-1. Strain and Culture Conditions.**

*Phoma betae* Fr. PS-13 was obtained from the Hokkaido National Agricultural Experimental Station, Sapporo, and cultured at 30 °C in potato dextrose medium. The host strain used in this study was *A. oryzae* NSAR1, a quadruple auxotrophic mutant (*niaD*<sup>-</sup>, *sC*<sup>-</sup>,  $\Delta$ *argB*, *adeA*<sup>-</sup>).

### **6-2-2. Accession number.**

The betaenone biosynthetic gene cluster sequence has been deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) with the accession number LC011911.

### **6-2-3. Preparation of expression plasmids.**

The *bet1* fragments (Fr1-Fr3) were amplified from genomic DNA of *P. betae* with primer set as shown in Table 6-2-1. Fr1 was inserted into the *Cla* I-digested pUARA2 using In-Fusion method to obtain pUARA2-*bet1*-Fr1. Fr2 and Fr3 was inserted into the resultant plasmid in a stepwise manner to afford pUARA2-*bet1*. The *bet2*, *bet3*, and *bet4* were also amplified from genomic DNA of *P. betae* with primer set as shown in Table 7-1. Each gene was inserted into the *Cla* I-digested pUSA2 or *Nhe* I-digested pAdeA2 using In-Fusion method to obtain pAdeA2-*bet2*, pUSA2-*bet3*, and pAdeA2-*bet4*. The *bet1* mutant genes were prepared by fusion PCR; two flanking sequences were initially amplified from pUARA2-*bet1* plasmid with primer set as shown in Table 6-2-1. Then, amplification using nested primers fuses the two fragments into a single molecule (Fr3-S2705A, Fr3-Y2737F, and Fr3-K2741A). Resultant fragment was inserted into the pUARA2-*bet1*-Fr1, 2 to afford pUARA2-*bet1*-mutant.

Table 6-2-1. Oligonucleotides used for construction of *A. oryzae* expression plasmids harboring biosynthetic genes of betaenones

Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size
			Vector
<i>bet1</i> -Fr1	<i>Cla</i> I	F: CAAGCTCCGAATTCGAATCGTTATGTCATCATCAGC	2.3 kb
		R: CGCTAGCTCAAATCGATGGCATCTTCGTCC	pUARA2
<i>bet1</i> -Fr2	<i>Cla</i> I	F: GGGGACGAAGATGCCATCGATGAGATCGCGGC	3.2 kb
		R: CGCTAGCTCAAATCGATCCGCGGGACTAGCTCTCG	pUARA2- <i>bet1</i> Fr1
<i>bet1</i> -Fr3	<i>Sac</i> II	F: GGACGAGAGCTAGTCCC GCGGTTGTTTACC	3.4 kb
		R: TAGCTCAAATCGATCCTCACG CAGCCTCCGACC	pUARA2- <i>bet1</i> Fr1, 2
<i>bet3</i>	<i>Cla</i> I	F: CTCCGAATTCGAATCGATATGCCCCCAACGAACG	1.2 kb
		R: GCGGCCGCTAGCTCAAATCGATCTATGAAGATATATTGACC	pUSA2
<i>bet2</i>	<i>Nhe</i> I	F: AATTCGAATCGATTTGAGCTAGCATGGATCTATCAAGACCG	1.8 kb
		R: TAGTGCGGCCGCTAGCTACTGCGCTTCC	pAdeA2
<i>bet4</i>	<i>Nhe</i> I	F: TTCGAATCGATTTGAGCTAGCATGACGCCGGCGAAAGC	1.2 kb
		R: GTCAGTACTGCGGCCGCTAGCCTACAGGAAGGCTTTG	pAdeA2
<i>orf1</i>	<i>Kpn</i> I	F: TCCGGAATTCGAGCTCGGTACCATGAAATCATTCCG	1.9 kb
		R: ACTACAGATCCCCGGGTACCCTAAACCCTACAAAGC	pAdeA2- <i>bet2</i>
<i>orf2</i>	<i>Nhe</i> I	F: TCGAATCGATTTGAGCTAGCATGGTTGAACATATCGG	1.9 kb
		R: TAGTGCGGCCGCTAGCTCAATTCGCCAGTC	pUNA2
<i>adeA</i>	-	F: GTGCCAAGCTTGATGTGCGAGATAAACATGTTGTGGC	2.7 kb
		R: CAGAACGGCAGATCCTCGTGCGGAACTCCGAATCCTC	pUSA2
<i>bet1</i> -Fr3-S2705A-1	-	F: GGACGAGAGCTAGTCCC GCGGTTGTTTACCATCAAGGC	-
		R: GAGGGCTACACCGGCTGCGGAGATGTAGTGCAG	-
<i>bet1</i> -Fr3-S2705A-2	-	F: CTGCACTACATCTCCG CAGCCGGTGTAGCCCTC	-
		R: TAGCTCAAATCGATCCGCGGTCACGCATCCTCCGACC	-
<i>bet1</i> -Fr3-Y2737F-1	-	F: GGACGAGAGCTAGTCCC GCGGTTGTTTACCATCAAGGC	-
		R: CCATTTTCCACACATGA ACCCGTGCGAGCCGTCG	-
<i>bet1</i> -Fr3-Y2737F-2	-	F: CGACGGCTCGCACGGG TTCATGTGTGGAAAATGG	-
		R: TAGCTCAAATCGATCCGCGGTCACGCATCCTCCGACC	-
<i>bet1</i> -Fr3-K2741A-1	-	F: GGACGAGAGCTAGTCCC GCGGTTGTTTACCATCAAGGC	-
		R: GCATCTTCTCGCACACCC ACGCTCCACACATATACCC	-
<i>bet1</i> -Fr3-K2741A-2	-	F: GGGTATATGTGTGGAG CCGTGGGTGTGCGAGAAGATGC	-
		R: TAGCTCAAATCGATCCGCGGTCACGCATCCTCCGACC	-

#### 6-2-4. Transformation of *A. oryzae*.

A spore suspension of *A. oryzae* NSAR1 or dehydroprobetaenone I (**2-5**)-producing transformant ( $1.0 \times 10^8$  cells) were inoculated into DPY (dextrin-polypeptone-yeast extract: 2% dextrin, 1% polypeptone, 0.5% yeast extract, 100 mL) medium supplemented with appropriate nutrients. After 3 days incubation at 30 °C, mycelia was collected by filtration and washed with water. Protoplasting was performed using Yatalase (Takara; 5 mg mL<sup>-1</sup>) in Solution 1 (0.8 mM of NaCl, 10 mM of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6.0) at 30 °C for 2 h. Protoplasts were centrifuged at 2,000 rpm (Beckman JLA10.500) for 5 min and washed with 0.8 M of NaCl solution. Then, protoplasts were adjusted to  $2.0 \times 10^8$  cells/mL by adding Solution 2 (0.8 M of NaCl, 10 mM of CaCl<sub>2</sub>, 10 mM of Tris-HCl, pH 8.0) and Solution 3 (40% (w/v) of PEG4000, 50 mM of CaCl<sub>2</sub>, 50 mM of Tris-HCl, pH 8.0) in 4/1 volume ratio. Plasmids (pUARA2-*bet1* and pUSA2-*bet3* for the first transformation of wild type strain. pAdeA2-*bet2* or pAdeA2-*bet4* for the second transformation of dehydroprobetaenone I-producing strain. 12 µg each) added to the protoplast solution (200 µL). 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 2,000 rpm (Beckman JLA10.500) for 5 min. The transformation mixture was poured onto the Czapek-Dox (3.5%) agar plate supplemented with 0.8 M of NaCl and appropriate nutrients and then overlaid with the soft-top agar (1.2 M of sorbitol, 3.5% of Czapek-Dox, 0.6% of agar). The plates were incubated at 30 °C for 3-7 days.

#### 6-2-5. Production and HPLC analysis of the metabolites.

Mycelia of *A. oryzae* transformants were inoculated into a solid medium containing polished rice (100 g) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30 °C for 14 days. After extraction with ethyl acetate, the extract was then concentrated *in vacuo* and the residues were extracted with ethyl acetate (100 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated *in vacuo*. The crude extracts were directly analyzed by LC-MS equipped with ZORBAX XDB-C18 column (50 mm x 2.1 mm) at the following conditions:

LC conditions to analyze dehydroprobetaenone I (**2-5**) and probetaenone I (**2-4**);

A linear gradient from 50% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 0.2 mL/min.

LC conditions to analyze betaenone B (**2-2**);

A linear gradient from 30% to 85% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 0.2 mL/min.

Dehydroprobetaenone I (**2-5**).

HR-ESIMS analysis of 5; calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 319.2632, found: 319.2682.

$[\alpha]_{\text{D}}^{23}$  -19.3 (c 0.3 CHCl<sub>3</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$  15.5 (s, 1H), 7.39 (s, 1H), 5.41 (d,  $J$  = 4.9 Hz, 1H), 5.18 (s, 1H), 1.96 (t,  $J$  = 9.5), 1.85 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.67 (s, 3H), 1.66-1.60 (m, 2H), 1.59 (s, 1H), 1.53 (m, 1H), 1.45 (m, 1H), 1.20 (m, 1H), 1.00 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 3H), 0.99 (s, 3H), 1.05-0.97 (m, 2H), 0.96 (s, 1H), 0.92 (t,  $J$  = 7.2, 3H), 0.86 (d,  $J$  = 6.5, 3H), 0.85 (d,  $J$  = 7.0, 3H). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)  $\delta$  207.7, 173.5, 131.2, 127.4, 100.1, 58.8, 50.7, 46.8, 44.1, 42.7, 42.5, 38.1, 35.3, 34.0, 27.1, 25.9, 22.4, 22.3, 22.0, 18.7, 13.4.

#### Betaenone B (2-2).

HR-APCI-MS analysis of **2-2**; calcd. for C<sub>21</sub>H<sub>35</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 369.2636, found: 369.2599.  $[\alpha]_{\text{D}}^{24}$  24.1 (c 0.3 CHCl<sub>3</sub>).

#### 6-2-6. Reduction of dehydroprobetaenone I (2-5).

To a solution of dehydroprobetaenone I (28.6 mg, 89.9  $\mu$ mol) in methanol (2.0 mL) was added NaBH<sub>4</sub> (1.3 mg, 30  $\mu$ mol) in methanol (0.5 mL) and the mixture was stirred for 50 min at room temperature. After concentration, the crude residue was dissolved in ethyl acetate. The solution was washed with water, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo*. The crude residue was purified by silica gel chromatography (hexane/EtOAc 10:1) to give probetaenone I (28.6 mg, quant.).

#### 6-2-7. Conformational search of dehydroprobetaenone I (2-5).

The lowest energy conformer of X was determined by a conformational search. Calculations were performed using Maestro v9.8 (Force field: OPLS\_2005; Solvent: None; Conformational search: MonteCarlo Multiple Minimum (MCMM) method; Minimization method: Powell-Reeves conjugate gradient (PRCG); Steps: 10000). 6 conformers were found within a range up to 8 kJ/mol above the global minimum.

### **6-3. Didymellamides**

#### **6-3-1. Strain and Culture Conditions.**

*Escherichia coli* HST08 was used for cloning, following standard recombinant DNA techniques. A fungal host strain used in this study was *A. oryzae* NSAR1, a quadruple auxotrophic mutant (*niaD*<sup>-</sup>, *sC*<sup>-</sup>,  $\Delta$ *argB*, *adeA*<sup>-</sup>).

#### **6-3-2. Genomic DNA preparation.**

Genomic DNA of *Alternaria solani* A-17 was extracted according to the following method; the mycelia of fungus was 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 for 5 min. The supernatant was then treated with RNase at 37°C for 90 min. To the reaction mixture was then added phenol:chloroform solution. After being vortexed for 2 sec, the mixture was centrifuged at 12,000 rpm for 5 min. The supernatant was transferred to a new centrifuge tube and re-extracted twice with phenol:chloroform solution followed by chloroform. To the final supernatant was added cold-isopropanol and CH<sub>3</sub>COONa solution and genomic DNA was recovered by centrifugation at 12,000 rpm for 10 min. The pellet was then washed with 70% ethanol solution and dried for 15 min. Finally, the isolated DNA was resuspended in TE buffer (10 mM of Tris-HCl (pH 8.0) and 1mM of EDTA) and stored at -20°C for further use.

#### **6-3-3. Genome Sequencing and Analysis.**

Genome sequencing of *A. solani* A-17 was 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/>) to yield 1815 contigs covering approximately 34.4 Mb. 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.jp/2ndfind/>) for analysis of each contig.

#### **6-3-4. Accession number.**

The biosynthetic gene cluster sequence has been deposited in the DNA Data Bank of Japan (DDBJ) with the accession number LC145635.

### 6-3-5. RT-PCR analysis.

For RT-PCR analysis, *A. solani* A-17 was grown on Potato-Dextrose (PD) medium and CD medium supplemented with 0.1% of Yeast Extract (CDYE) for 6 or 9 days at 30 °C. Total RNA was extracted from each dried mycelia using TRIzol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions and then treated with DNase I (Life Technologies) 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.

### 6-3-6. Preparation of expression plasmids.

The *asolS*, *asolC*, *asolA* were amplified from cDNA with primer set as shown in Supplemental Table 6-3-1. PCR reactions were performed with the KOD-Plus-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site (site 1 and/or site 2) of pUARA2 or pUSA2 using In-Fusion HD cloning kit (Clontech Laboratories) or Gibson Assembly Master Mix (NEW ENGLAND BioLabs) to construct expression plasmids according to the manufacturer's protocol.

Table 6-3-1. Oligonucleotides used for construction of *A. oryzae* expression plasmids harboring biosynthetic genes of didymellamides

Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size
			Vector
<i>asolC</i>	<i>Kpn</i> I	F: TCCGGAATTCGAGCTCGGTACCATGGCTGTATCCACC	1.1 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCCGGTACCTCAAGCAGCCGCAC	pUARA2
<i>asolS</i> -Fr1	<i>Sma</i> I	F: TAGCGGCCGCACTAGTGACCCATGACCAACCCAC	3.8 kbp
		R: ACCAGACGATCACGCGAAGGGTCTGTTCACCGACC	pUARA2- <i>asolC</i>
<i>asolS</i> -Fr2		F: TGGTCGGTGAACAGAACCCTTCGCGTGATCGTCTGG	4.1 kbp
		R: TCGTTCCTGGCGAATCAGCTTGGGCTTCGGAATCGAAATG	pUARA2- <i>asolC</i>
<i>asolS</i> -Fr3		F: ATTCGATTCCGAAGCCCAAGCTGATTCCGCAAGAACGCATG	4.4 kbp
		R: TTCATCATCGGGTACGACTACCCTCACATGGCCCCGAG	pUARA2- <i>asolC</i>
<i>asolA</i>	<i>Nhe</i> I	F: AATCGATTTGAGCTAGCATGGCAGCCCCACC	1.6 kbp
		R: ACTAGTGGCGCCGCTAGCTCATTATAGACAGCG	pUSA2
<i>asolS</i> expression	-	F: TCCAAGCCTCTCTCAACTATCGGTCTGCTG	-
		R: TGAGCACTCGTCGATACCCACATCAGATTG	
<i>asolC</i> expression	-	F: TCGCCATTGGAGACAACGTCGATTTCG	-
		R: TCGTTGGCGAGGTTGGTAGGTATAGG	
<i>asolA</i> expression	-	F: TCATCGTGCTACCAATGACACTACGTC	-
		R: TGACTGTCTGGTCCAGAGACAATGTCG	

### 6-3-7. Transformation of *A. oryzae*.

Transformation of *A. oryzae* NSAR1 or transformant ( $1.0 \times 10^8$  cells) were performed by the protoplast-polyethylene glycol method reported shown in above. To construct transformants harboring PKS-NRPS and trans-ER genes, pUARA2-*asolC/asolS* was used for the first transformation. The transformant with *asolC*, *S* was further transformed with pUSA2-*asolA* to construct *AO-asolCSA*.

### 6-3-8. Extraction of metabolites.

Mycelia of *A. oryzae* transformants were inoculated into a solid medium containing polished rice (100 g) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30°C for 14 days. After extraction with ethyl acetate, the extract was then concentrated *in vacuo* and the residues were extracted with ethyl acetate (100 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo* to afford crude extracts.

### 6-3-9. Analysis of the metabolites.

After partial purification of the crude extracts, the metabolites were analyzed by HPLC equipped with a Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5 ( $\phi$  4.6 x 250 mm) or LC-MS equipped with a ZORBAX XDB-C18 column ( $\phi$  2.1 x 50 mm) at the following conditions:

HPLC conditions to analyze; A linear gradient from 40% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 1.0 mL/min with 283 and 347 nm detection.

LC-MS conditions to analyze; A linear gradient from 50% to 95% acetonitrile for 15 min and 95% acetonitrile for 20 min at a flow rate of 0.2 mL/min.

**Protodidymellamide  $\alpha$  (3-10).** The crude extracts were purified with silica gel chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) followed by further purification utilizing HPLC equipped with Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5 ( $\phi$ 10 x 250 mm) at the following conditions ( $\lambda$  = 274 nm, a linear gradient from 50% to 100% MeOH for 10 min and 100% MeOH for 20 min at a flow rate of 3.0 mL/min) to afford protodidymellamide  $\alpha$  (yellow oil, 16.5 mg from 130 g of rice medium).  $[\alpha]_D^{29}$  -200.4 (c 1.0 MeOH). HR-ESIMS analysis (positive); calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>30</sub>NO<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 396.2169, found: 396.2160. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data are summarized in Table 6-3-2.

**Protodidymellamide  $\beta$  (3-11).** The crude extracts were purified by silica gel chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH) followed by further purification utilizing HPLC equipped with Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5 ( $\phi$ 10 x 250 mm) at the following conditions ( $\lambda$  = 347 nm, a linear gradient from 40% to 100% acetonitrile for 15 min and 100%

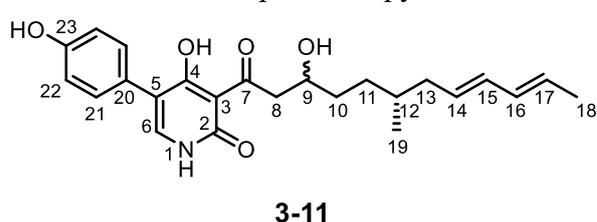
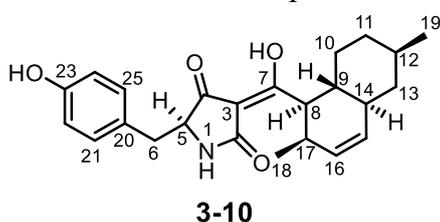
acetonitrile for 15 min at a flow rate of 3.0 mL/min) to afford protodidymellamide  $\beta$  (white powder, 9.6 mg from 115 g of rice).  $[\alpha]_D^{29}$  -3.7 (c 0.1 MeOH). HR-ESIMS analysis (positive); calcd. for  $C_{24}H_{28}NO_4$   $[M+H-H_2O]^+$ : 394.2013, found: 394.2033.  $^1H$ -NMR and  $^{13}C$ -NMR data are summarized in Table 6-3-2.

**Didymellamide B (3-12).** The crude extracts were purified with silica gel chromatography ( $CHCl_3/MeOH$ ) followed by further purification utilizing HPLC equipped with Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5 ( $\phi 10 \times 250$  mm) at the following conditions ( $\lambda = 347$  nm, a linear gradient from 40% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 3.0 mL/min) to afford didymellamide B (colorless oil, 1.2 mg from 55 g of rice). Observed  $[\alpha]_D^{29}$  -144.5 (c 0.1 MeOH); literature  $[\alpha]_D^{25}$  -425 (c 0.14 MeOH). HR-ESIMS analysis (positive); calcd. for  $C_{24}H_{28}NO_4$   $[M+H]^+$ : 394.2013, found: 394.2014. The NMR data are in good agreement with the reported data.<sup>1</sup> Although repeated chromatography of **3-12** gave a sufficiently pure colorless oil, the value of optical rotation was not changed.

Table 6-3-2. NMR Data for **3-10**, **3-11**.

	protodidymellamide $\alpha$ ( <b>3-10</b> ) <sup>#</sup>		protodidymellamide $\beta$ ( <b>3-11</b> ) <sup>*</sup>	
	$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, <i>J</i> in Hz)
1		6.14 (s)		11.57 (s)
2	175.3		158.8	
3	101.9		106.8	
4	194		170.6	
5	63.5	3.97 (dd, 9.2, 3.2)	111.5	
6	37.3	2.65 (brdd, 13.8, 9.2) 3.16 (m)	139.4	7.48 (s)
7	192		188.1	
8	46.4	3.71 (dd, 11.8, 6.0)	42.4	2.54 (m)
9	33.2	1.51 (m)	78.4 (78.6)	4.55 (m)
10	29.9	0.94 (m)	31.3 (31.4)	1.65 (m)
		1.77 (m)		1.65 (m)
11	33	1.00 (m)	31.0 (31.1)	1.23 (m)
		1.73 (m)		1.23 (m)
12	35.2	1.51 (m)	32.3 (32.4)	1.43 (m)
13	41.5	0.81 (m)	39.5 <sup>  </sup>	1.85 (m)
		1.73 (m)		1.92 (m)
14	41.8	1.83 (m)	129.7 (129.8)	5.47 (m) <sup>§</sup>
15	130.8	5.42 (brd, 10.3)	131.6 (131.7)	5.98 (m) <sup>§</sup>
16	131	5.56 (m)	131.6 (131.7)	5.98 (m) <sup>§</sup>
17	35.6	2.59 (m)	126.6 (126.7)	5.56 (m) <sup>§</sup>
18	17.9	0.94 (Me, d, 7.2)	17.8	1.68 (Me, d, 6.6)
19	22.5	0.91 (Me, d, 6.5)	19.2 (19.4)	0.79 (Me, m)
20	127.8		123.7	
21	130.3	7.02 (d, 8.1)	130.2	7.21 (d, 8.4)
22	115.7	6.74 (d, 8.1)	114.8	6.76 (d, 8.4)
23	155.1		156.7	
24	115.7	6.74 (d, 8.1)	114.8	6.76 (d, 8.4)
25	130.3	7.02 (d, 8.1)	130.2	7.21 (d, 8.4)
23-OH				9.50 (s)

<sup>#</sup>Two tautomers of **3-10** are observed in the NMR analysis (CDCl<sub>3</sub>). Similar tautomerization of a 3-acyltetramic acid is reported.<sup>2</sup> The chemical shifts shown in the above table are for major tautomer of **3-10**. <sup>\*</sup>The chemical shifts shown in parentheses are for another diastereomer of **3-11**. <sup>||</sup>Overlapped signal with the solvent peak. <sup>§</sup>Chemical shifts of olefin protons are nearly identical to those of prosolanapyrones.<sup>3, 4</sup>



### 6-3-10. Transformation of 3-11 into 3-13.

To a solution of **3-11** (5.7 mg, 1.4  $\mu\text{mol}$ ) in toluene (1 mL) were added DMAP (3.7 mg, 30  $\mu\text{mol}$ ), pyridine (16.9  $\mu\text{L}$ ), and acetic anhydride (13.2  $\mu\text{L}$ , 14  $\mu\text{mol}$ ) at room temperature. After being stirred for 16 hr at 85°C, the reaction mixture was directly concentrated in vacuo. The crude sample was extracted with  $\text{CHCl}_3$  and the combined organic layers were washed with 1 M-HCl and saturated aqueous  $\text{NaHCO}_3$ , dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , and concentrated in vacuo. The residues were purified by HPLC equipped with Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5 ( $\phi 10 \times 250$  mm) at the following conditions ( $\lambda = 340$  nm, a linear gradient from 40% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 3.0 mL/min) to give *O*-acetyl*didymellamide* B (**3-13**, 1.0 mg, 2.3  $\mu\text{mol}$ , 16%).  $[\alpha]_D^{29}$  -129.0 (c 0.05 DMSO).  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  17.01 (s, 1H, C4-OH), 11.84 (s, 1H, N1-H), 7.71 (s, 1H), 7.50 (d,  $J = 8.6$ , 2H), 7.15 (d,  $J = 8.6$ , 2H), 5.58 (m, 1H), 5.39 (d,  $J = 9.9$ , 1H), 4.37 (dd,  $J = 11.4$ , 5.8, 1H), 2.78 (m, 1H), 2.28 (s, 3H), 1.83-1.66 (m, 4H), 1.47 (m, 2H), 0.96 (m, 1H), 0.97-0.74 (m, 2H), 0.87 (d,  $J = 6.5$ , 3H), 0.77 (d,  $J = 7.2$ , 3H).  $^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  209.7, 175.8, 169.3, 161.4, 149.7, 141.9, 131.6, 130.4, 130.1, 128.2, 121.6, 111.5, 106.8, 51.8, 41.3, 41.3, 35.8, 35.0, 32.5, 30.6, 29.3, 22.4, 20.9, 17.8. HR-ESIMS analysis (positive); calcd. for  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{NO}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 436.2118, found: 436.2134.

To a solution of acetate (1.3 mg, 3.0  $\mu\text{mol}$ ) in methanol (0.5 mL) were added  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (4.1 mg, 3.0  $\mu\text{mol}$ ) at room temperature and the mixture was stirred for 1 hr. The reaction mixture was directly concentrated in vacuo. The residues were washed with water, dried over anhydrous  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtered, and concentrated in vacuo. The crude sample was directly used for NMR analysis.

### 6-3-11. Biotransformation experiments.

Mycelia of *AO-asola* transformants were inoculated into 10 mL of MPY medium containing appropriate nutrients (arginine 6 mg; adenine 1 mg; ammonium sulfate 93 mg) in 50 mL Erlenmeyer flasks. **3-10** (100  $\mu\text{g}$ , methanol solution) was then administered to the culture medium. After an additional 3 days incubation at 30°C (200 rpm), the mycelia and medium were soaked in acetone (40 mL). The organic layer was then concentrated *in vacuo*. The crude extracts were directly analyzed by LC-MS equipped with a ZORBAX XDB-C18 column ( $\phi 2.1 \times 50$  mm) at the following conditions (A linear gradient from 50% to 95% acetonitrile for 15 min and 95% acetonitrile for 20 min at a flow rate of 0.2 mL/min.).

## **6-4. Cyclohelminthols**

### **6-4-1. Strain.**

*Escherichia coli* HST08 and DH5 $\alpha$  was used for cloning and following standard recombinant DNA techniques. *E. coli* BL21-Gold(DE3) was used for protein expression. *Helminthosporium velutinum* yone96, a cyclohelminthols producing strain, and *Lachnum palmae* NBRC 106495, a palmaenones producing strain, were used for genomic DNA and total RNA extraction. *Aspergillus terreus* JCM 19077 (= NIH 2624), a terrein producing strain, was used for total RNA extraction. A fungal host strain used in this study was *A. oryzae* NSAR1, a quadruple auxotrophic mutant (*niaD*<sup>-</sup>, *sC*<sup>-</sup>,  $\Delta$ *argB*, *adeA*<sup>-</sup>).

### **6-4-2. Genomic DNA preparation.**

Genomic DNA was extracted according to the following method; the mycelia of fungus was 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 CH<sub>3</sub>COONa 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.

### **6-4-3. Total RNA and cDNA preparation.**

*H. velutinum* yone96 was grown on Potato-Dextrose (PD) medium for 6 days at 24 °C with agitation (200 rpm). *L. palmae* NBRC 106495 was grown on GPY medium (20 g/L of glucose, 10 g/L of polypeptone, 5 g/L of yeast extract, pH 7.5) for 8.5 days at 23 °C with agitation (180 rpm). *A. terreus* JCM 19077 was grown on PD medium for 3 days at 30 °C with agitation (200 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.

#### **6-4-4. Genome Sequencing and Analysis.**

Genome sequencing of *H. velutinum* yone96 and *L. palmae* NBRC 106495 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/>) to yield 1799 contigs covering approximately 46.3 Mb for *H. velutinum* yone96 and 3554 contigs covering approximately 42.5 Mb for *L. palmae* NBRC 106495. 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.go.jp/2ndfind/>) for analysis of each contig.

#### **6-4-5. Preparation of expression plasmids.**

The *chmA*, *chmB*, *chmK*, *chmN*, *chmC*, *chmP*, *chmQ*, and *ploK* were amplified from cDNA and the *chmL*, *chmO*, and *chmM* were amplified from gDNA with primer set as shown in Table 6-4-1. PCR reactions were performed with the KOD-Plus-Neo (TOYOBO). Each PCR product was inserted into appropriate restriction site (site 1, site2 and/or site 3) of pUARA2, pUSA2, pAdeA2, pUNA2, or pDP103 using In-Fusion HD cloning kit (Clontech Laboratories) or HiFi DNA Assembly Master Mix (NEW ENGLAND BioLabs) to construct expression plasmids according to the manufacturer's protocol. The following plasmids were obtained: pUARA2-*chmB/chmA*, pUSA2-*chmK*, pUSA2-*chmN*, pUSA2-*chmK/chmN*, pAdeA2-*ploK*, pAdeA2-*chmC/chmP/chmL*, pUNA2-*chmO/chmM*, pDP103-*chmQ*, and pDP103-*terC-terQ-terD*.

Table 6-4-1. Oligonucleotides used for construction of *expression* plasmids harboring biosynthetic genes of cyclohelminthols

Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size
			Vector
<i>chmB</i>	<i>Kpn</i> I	F: TCCGAATTCGAGCTCGGTACCATGGGATCGGACTTC	2.6 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCCGGTTAGTTTGAGACATTTTC	pUARA2
<i>chmA</i> Fr1	<i>Nhe</i> I /	F: CTCCGAATTCGAATCGATTTGAGCTAGCATGGACAGCACATTTG	3.0 kbp
	<i>Sma</i> I	R: ATTTCTGAGATCGTTCATCGATAAGAGGGGAGG	pUARA2- <i>chmB</i>
<i>chmA</i> Fr2	<i>Nhe</i> I /	F: TCTTATCGATGGAACGATCTCAGAAATGAATTCGCTTCC	3.6 kbp
	<i>Sma</i> I	R: TGTTTCATCATCGGGTACGACTACCCGGGTATACCCCAAGTCC	pUARA2- <i>chmB</i>
<i>chmN</i>	<i>Nhe</i> I	F: AATCGATTTGAGCTAGCATGGAATCCGAACCTC	1.6 kbp
		R: ACTAGTGCGGCCGCTAGCTCACTTGATCATTTTC	pUSA2
<i>chmK</i>	<i>Kpn</i> I	F: TCCGAATTCGAGCTCGGTACCATGTCTATTCTGAG	1.7 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCCGGTACCTAAGCGCCAATGGC	pUSA2 or pUSA2- <i>chmN</i>
<i>plpK</i>	<i>Nhe</i> I	F: AATCGATTTGAGCTAGCATGTCTATCCGGAG	2.1 kbp
		R: ACTAGTGCGGCCGCTAGCCTAAGCAAAAACAGCAGG	pUSA2- <i>plpN</i>
<i>chmC</i>	<i>Kpn</i> I /	F: ACAGCAAGCTCCGAATTCGAGCTCGGTACCCATGCACGTCGTCGTC	1.3 kbp
	<i>Nhe</i> I	R: TCATCATCGGGTACGACCCGGTACCCTAAGCTTTGACATTG	pAdeA2
<i>TamyA-PenoA</i>	<i>Kpn</i> I /	F: AGGGTACCGGGTCGTACCCGATGATGAAAC	0.8 kbp
	<i>Nhe</i> I	R: TTTGACGAGCTCGGGAATTTGGTCAGTCGAC	pAdeA2
<i>chmP</i>	<i>Kpn</i> I /	F: ACTGACCAATTCGCAGCTCGTCAAACCCGGGATGGAACGTTTCCC	1.5 kbp
	<i>Nhe</i> I	R: TATCCTGTTACCTTAAGCCGGGCTATTTTCATAATTTCAATC	pAdeA2
<i>TagdA-PgpdA</i>	<i>Kpn</i> I /	F: AGCCCGGGCTTAAGGTAACAGGATAGCC	1.9 kbp
	<i>Nhe</i> I	R: GGTGATGTCTGCTCAAGCGGGTAGCTGTT	pAdeA2
<i>chmL</i>	<i>Kpn</i> I /	F: AGCTACCCCGCTTGAGCAGACATCACCCCGGGATGGACAAGACCACC	2.1 kbp
	<i>Nhe</i> I	R: ACTACCCGGGTCCTAGTGGCGCCGCTAGCCTAATCAAGGGTCGG	pAdeA2
<i>chmO</i>	<i>Nde</i> I	F: ACCACGTGACTAGTCATATGATGGTTGCTACGAAG	1.0 kbp
		R: TTCTAGAGCATGCCATATGCTACATGGGAATGCC	pUNA2
<i>chmM</i>	<i>Nhe</i> I	F: AATCGATTTGAGCTAGCATGTACCTACTGCTTTG	1.0 kbp
		R: ACTAGTGCGGCCGCTAGCTTACGAAGTAGCGTTC	pUNA2- <i>chmO</i>
<i>chmQ</i>	<i>Kpn</i> I /	F: TCCGAATTCGAGCTCGGTACCATGGCCAAAGATAC	0.4 kbp
	<i>Spe</i> I	R: ATCATCGGGTACGACTACCCGGGTCAGTTTATTGGAGGTTCCCTC	pDP103
<i>terC</i>	<i>Kpn</i> I /	F: AGCAAGCTCCGAATTCGAGCTCGGTACCATGCATGTCATCGTC	1.2 kbp
	<i>Spe</i> I	R: TCAGAGTGATGCTTGTCCCTTGCCAGTAC	pDP103

<i>TagdA-PgpdA</i>	<i>Kpn</i> I /	F: ACTGGCAAGGGACAAGCATCACTCTGAGTAACAGGATAGCCTAG	1.9 kbp
	<i>Spe</i> I	R: AACAGAAATTCGTGCTTTTCAGGCATGGTGATGTCTGCTCAAG	pDP103
<i>terQ</i>	<i>Kpn</i> I /	F: ATGCCTGAAAAGCACGAATTTCTGTTCATC	0.4 kbp
	<i>Spe</i> I	R: ATCATCGGGTACGACTACCCGGGTCAGTAGTCATCTTAAGCTAACTAC	pDP103
<i>TamyB</i>	<i>Afl</i> II /	F: AACCAAGATGAACGGCGGTAGTTAGCTTAAGGGTGGAGAGTATATG	0.7 kbp
	<i>Spe</i> I	R: AATTCGGTTCCTTTGCTTTCTGCCGAGCTG	pDP103- <i>terC-terQ</i>
<i>PenoA</i>	<i>Afl</i> II /	F: TCGGCAGAAAGCAAAGGAACGGAATTTGCTCATTACTAGTC	0.6 kbp
	<i>Spe</i> I	R: ATGACAACGTCGAATTTGAACTCATTGACGAGCTGCGG	pDP103- <i>terC-terQ</i>
<i>terD</i>	<i>Afl</i> II / <i>Spe</i> I	F: ATGAGTTCGAAATTCGACGTTGTCATCTGC	1.9 kbp
		R: ATCATCGGGTACGACTACCCGGGTCAGTTACGCAAGGGTCCATTC	pDP103- <i>terC-terQ</i>
<i>chmC</i> for pMAL	<i>Kpn</i> I	F: TCGGGGATGACGATGACAAGGTACCGATGCACGTCGTCGTC	1.2 kbp
		R: AGGATCCGAATTCGGTACCTAAGTCTTGACATTG	pMAL-c4E
<i>terC</i> for pMAL	<i>Kpn</i> I	F: TCGGGGATGACGATGACAAGGTACCGATGCATGTCATCGTC	1.3 kbp
		R: AGGATCCGAATTCGGTACCTCAGAGTGATGCTTG	pMAL-c4E
<i>terD</i> for pMAL	<i>Kpn</i> I	F: TCGGGGATGACGATGACAAGGTACCGATGAGTTGCAAATTC	1.9 kbp
		R: AGGATCCGAATTCGGTACCTCAGCAAGGGTCCATTC	pMAL-c4E
<i>chmK</i> for pMAL	<i>Kpn</i> I	F: GATGACGATGACAAGGTACCGATGTCTATTCTGAG	1.7 kbp
		R: AGGATCCGAATTCGGTACCTAAGCGCCAATGGC	pMAL-c4E
<i>chmN</i> for pMAL	<i>Kpn</i> I	F: TCGGGGATGACGATGACAAGGTACCGATGGAATCCGAACCTC	1.7 kbp
		R: AGGATCCGAATTCGGTACCTCACTTGATCATTTTCAAC	pMAL-c4E

#### 6-4-6. Cloning and expression of FMOs/halogenases in *E. coli*.

The *chmK*, *chmN*, *chmC*, *terC*, and *terD* were amplified by using cDNA of *H. velutinum* or *A. terreus* as template and primer sets (Table 6-4). The PCR products were directly inserted into the *Kpn* I-digested pMAL-c4E to generate pMAL-c4E-*chmK*, *chmN*, *chmC*, *terC*, and *terD*. These plasmids were separately introduced into *E. coli* BL21-Gold(DE3) for overexpression. The transformant was grown at 37 °C to an OD<sub>600</sub> about 0.6 in a 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 20 h, the cells were harvested by centrifugation at 3,800 x g. Harvested cells were resuspended in disruption buffer (50 mM Phosphate buffer (pH 7.0), 20 % glycerol, 200 mM NaCl) and disrupted by sonication. After centrifugation, the supernatant was applied to an amylose column to purify each recombinant protein.

#### 6-4-7. In vitro assay of ChmC, TerC, and TerD

Typical conditions were as follows: a reaction mixture of MBP-ChmC, MBP-TerC, or MBP-TerD (100  $\mu$ L of 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)) containing 300  $\mu$ M substrate, 2 mM NADPH and 5  $\mu$ M recombination enzyme was incubated at 30 °C for 1 hour. The reaction was quenched by the addition of MeOH (100  $\mu$ L). The resultant mixture was vortexed and centrifuged at 12,000 x g. The supernatant was filtered through Millex (Merck Millipore, pore size: 0.2  $\mu$ m), then analyzed by using a UPLC-MS apparatus (Waters Acquity UPLC equipped with a QDa) with a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 x 5.0 mm) under the following conditions: flow rate: 0.7 mLmin<sup>-1</sup>; solvent system: acetonitrile in H<sub>2</sub>O containing 0.1% formic acid, 0-1 min, 2%; 1-3.5 min, a linear gradient 2-30%; 3.5-4 min, a linear gradient 30-100%, 4-6 min, 100%.

**(R)-2,6-dichloro-3-hydroxy-5-(2-hydroxypropyl)-p-benzoquinone (4-22).** A reaction mixtures (20 mL of 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)) containing 1.15 mM compound **4-14** (6 mg, 274.8  $\mu$ mol), 4 mM NADPH, and 7.5  $\mu$ M MBP-TerC in 50 mL of centrifuge tube was incubated at 30 °C with agitation (120 rpm) for 9 hours. After combining the reaction mixture (total 240 mL) separately incubated in twelve tubes, the reaction was quenched by the addition of equal volume MeOH. The resultant mixture was vortexed and centrifuged at 9,100 x g. After removal of MeOH, the residual water layer (~ 200 mL) was washed with CHCl<sub>3</sub> (100 mL x 3) and then purified with C<sub>18</sub> chromatography (Wakosil, 40C18, 30~50  $\mu$ m, 100% water). Fractions containing **10** were further purified by HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu$ m, 150 Å, 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda$  = 260 nm, an isocratic conditions 2% MeOH for 11 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford compound **4-22** (purple amorphous solid, 17.9 mg, 71.6  $\mu$ mol, 26% from 72 mg of **4-14**). HR-ESI-MS analysis (negative); calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 248.9727, found: 248.9717. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data are summarized in Table 6-4-2.

**(3R)-6,7-dihydroxymellein (4-18).** A reaction mixtures (30 mL of 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)) containing 1.72 mM compound **4-10** (total 10 mg, 51.5  $\mu$ mol), 4 mM NADPH, and 2.7  $\mu$ M MBP-TerD in 50 mL of centrifuge tube was incubated at 30 °C with agitation (185 rpm) for 18 hours. The reaction was quenched by the addition of equal volume MeOH. The resultant mixture was vortexed and centrifuged at 9,100 x g. After removal of MeOH, residual water layer (~ 30 mL) was extracted with AcOEt (30 mL x 3). The crude products were purified utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu$ m, 150 Å, 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda$  = 270 nm, a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 5 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford (3R)-6,7-dihydroxymellein (**4-18**) (yellow oil, 1.1 mg, 5.2  $\mu$ mol, 10% from 10 mg of **4-10**). [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>24</sup> -19.0 (c 0.1 MeOH).

HR-ESI-MS analysis; calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup>: 209.0455, found: 209.0455. <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data (shown in the Table 6-4-2.) are in good agreement with the reported data.<sup>5</sup>

#### **6-4-8. In vitro assay of ChmK and ChmN.**

Typical conditions were as follows: a reaction mixture of MBP-ChmK, MBP-ChmN (100 μL of 50 mM Phosphate buffer (pH 7.0)) containing 300 μM substrate, 10 mM NADH, 20 μM Fre, 20 μM recombination enzyme was incubated at 30 °C. The reaction was quenched by the addition of MeOH (100 μL). The resultant mixture was vortexed and centrifuged at 12,000 x g. The supernatant was filtered through Millex (Merck Millipore, pore size: 0.2 μm), then analyzed by using a UPLC-MS apparatus (Waters Acquity UPLC equipped with a QDa) with a Waters ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 x 5.0 mm) under the same conditions with those for the analysis of the FMO reaction products.

#### **6-4-9. Transformation of *A. oryzae*.**

Transformation of *A. oryzae* NSAR1 or transformant (1.0 x 10<sup>8</sup> cells) were performed by the protoplast-polyethylene glycol method reported previously.<sup>6</sup> To construct transformants for the production of 6-hydroxymelleine analogous, pUARA2-*chmA/chmB*, pUSA2-*chmK/chmN*, pUSA2-*chmK*, pUSA2-*chmN*, and pAdeA2-*ploK* were used for the transformation. The following transformants were obtained: AO-*chmAB*, AO-*chmABK*, AO-*chmABN*, AO-*chemABKN* and AO-*chmAB/ploK*. AO-*chmABN* was then used for the transformation with pAdeA2-*chmC/chmP/chmL* and pUNA2-*chmO/chmM* to construct AO-*chmABNCPLMO*. AO-*chmABNCPLMO* was then used for the transformation with pUC19<sub>SC103</sub>-*chmQ* to construct AO-*chmABNCPLMOQ*.

#### **6-4-10. Extraction of metabolites.**

Mycelia of *A. oryzae* transformants were inoculated into a solid medium containing polished rice (100 g) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30 °C for 14 days. After extraction with ethyl acetate, the extract was then concentrated *in vacuo* and the residues were extracted with ethyl acetate (200 mL x 2). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and concentrated *in vacuo* to afford crude extracts, unless otherwise stated.

#### **6-4-11. Analysis of the metabolites.**

The crude extracts were analyzed by UPLC-MS system (Waters) equipped with QDa and DAD. As the stationary phase, a C18 column (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7

$\mu\text{m}$  2.1 x 50 mm) with a binary solvent system consisting of acetonitrile containing 0.1% formic acid (solvent B) and water containing 0.1% formic acid (solvent A) was used. The following gradient with a flow rate of 0.7 ml/min was applied: 1.0 min = 2% B, 1.0 - 3.5 min = 2% - 30% B, 3.5 - 4.0 min = 30% - 100% B, 4.0 - 6.0 min = 100% B, 6.0 - 6.5 min = 100% - 2% B, and 6.5 - 9.0 min, 2% B.

**(3R)-6-hydroxymellein (4-10).** The crude extracts prepared from *AO-chmAB* were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 5 to 3) to afford (3R)-6-hydroxymellein (**4-10**, white solid, 47.3 mg from 200 g of rice medium).  $[\alpha]_{\text{D}}^{26}$  -60.0 (c 2.0 MeOH). HR-ESI-MS analysis (positive); calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 195.0652, found: 195.0655.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data (shown in the Table 6-4-2.) are in good agreement with the reported data.<sup>7</sup>

**(3R)-5,6-dihydroxymellein (4-11).** The crude extracts prepared from *AO-chmAB* were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 5 to 3) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda$  = 325 nm, a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford (3R)-5,6-dihydroxymellein (**4-11**, white solid, 13.8 mg from 120 g of rice medium).  $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$  -63.2 (c 0.087  $\text{CHCl}_3$ ). HR-ESI-MS analysis (positive); calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 211.0601, found: 211.0601.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data (shown in the Table 6-4-2.) are in good agreement with the reported data.<sup>8</sup>

**(3R)-5-chloro-6-hydroxymellein (4-12).** The crude extracts prepared from *AO-chmABK* were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 10 to 5) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda$  = 310 nm, a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 5 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford (3R)-5-chloro-6-hydroxymellein (**4-12**, white solid, 21.8 mg from 150 g of rice medium).  $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$  -72.2 (c 1.0 MeOH). HR-ESI-MS analysis (negative); calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClO}_4$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 227.0117, found: 227.0108.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data (shown in the Table 6-4-2.) are in good agreement with the reported data.<sup>8</sup>

**(3R)-5,7-dichloro-6-hydroxymellein (4-14).** The crude extracts prepared from *AO-chmABN* were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 10 to 2) to afford (3R)-5,7-dichloro-6-hydroxymellein (**4-14**, white needle, 123 mg from 1 kg of rice medium).  $[\alpha]_{\text{D}}^{23}$  -83.5 (c 1.0 pyridine). HR-ESI-MS analysis (negative); calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{O}_4$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 260.9727, found: 260.9704.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data are

summarized in Table 6-4-2.

**(3R)-4-chloro-6-hydroxymellein (4-15).** The crude extracts prepared from *AO-chmAB/ploK* were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 4 to 1) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda = 310 \text{ nm}$ , a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 5 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford (3R)-4-chloro-6-hydroxymellein (**4-15**, white solid, 4.7 mg from 362 g of rice medium).  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -67.3$  (c 0.4 MeOH). HR-ESI-MS analysis (negative); calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClO}_4$  [M-H] $^-$ : 227.0117, found: 227.0095.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data (shown in the Table 6-4-2.) are in good agreement with the reported data.<sup>9</sup>

**(3R)-4,5-dichloro-6-hydroxymellein (4-16).** The crude extracts prepared from *AO-chmAB/ploK* were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 4 to 1) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda = 310 \text{ nm}$ , a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 5 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford (3R)-4,5-dichloro-6-hydroxymellein (**4-16**, white solid, 1.3 mg from 362 g of rice medium).  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} 43.1$  (c 0.1  $\text{CHCl}_3$ ). HR-ESI-MS analysis (negative); calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{Cl}_2\text{O}_4$  [M-H] $^-$ : 260.9727, found: 260.9720.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data are summarized in Table 6-4-2.

**(R)-2-chloro-5-(2-hydroxypropyl)-3-methoxy-p-hydroquinone (4-19).** The crude extracts prepared from *AO-chmABNCPLMO* were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 5 to 1) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda = 290 \text{ nm}$ , a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 5 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford (R)-2-(2-hydroxypropyl)-6-methoxybenzene-1,4-diol (**4-19**, yellow amorphous solid, 12.4 mg from 220 g of rice medium).  $[\alpha]_{\text{D}}^{26} -13.4$  (c 1.0 MeOH). HR-ESI-MS analysis (negative); calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{ClO}_4$  [M-H] $^-$ : 231.0430, found: 231.0398.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data are summarized in Table 6-4-2.

**(E)-2-chloro-3-methoxy-5-(prop-1-en-1-yl)-p-hydroquinone (4-23).** Mycelia of *AO-chmABNCPLMOQ* were inoculated into a solid medium containing polished rice (25 g, dry weight) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30°C for 6 days. After extraction with  $\text{CHCl}_3$ , the extract was then concentrated *in vacuo* and the residues were extracted with  $\text{CHCl}_3$  (200 mL x 2). The

crude extracts were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 4 to 0.4) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu\text{m}$ , 150  $\text{\AA}$ , 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda = 316 \text{ nm}$ , a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 10 min and 100% acetonitrile for 9 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford (*E*)-2-chloro-3-methoxy-5-(prop-1-en-1-yl)-benzene-1,4-diol (**4-23**, yellow amorphous solid, 11.5 mg from 480 g of rice medium). HR-EI-MS analysis; calcd. for  $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$   $[\text{M}]^+$ : 214.0397, found: 214.0389.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data are summarized in Table 6-4-2.

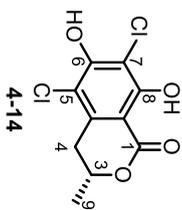
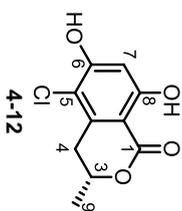
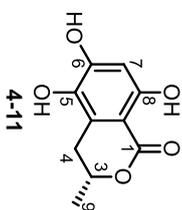
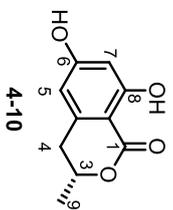
**Methoxydihydrobenzofuran (4-24).** Mycelia of *AO-chmAB/terCQD* were inoculated into a solid medium containing polished rice (25 g, dry weight) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30°C for 9 days. After extraction with MeOH, the extract was then concentrated *in vacuo* and the residues were extracted with AcOEt (150 mL x 3). The crude extracts were purified with silica gel chromatography (MeOH) followed by further purification utilizing C18 flash chromatography and HPLC equipped with Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5 ( $\phi$  4.6 x 250 mm) at the following conditions ( $\lambda = 330 \text{ nm}$ , a linear gradient from 5% to 40% acetonitrile for 7 min, 40% to 100% acetonitrile for 0.5 min and 100% acetonitrile for 8 min at a flow rate of 5.0 mL/min) to afford kojic acid adduct (**4-24**, brown amorphous solid, 4.9 mg from 160 g of rice medium). HR-ESI-MS analysis (positive); calcd. for  $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{O}_8$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 337.0918, found: 337.0917.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data are summarized in Table 6-4-2. The chemical shifts of signal derived from kojic acid are in good agreement with the reported data.<sup>10</sup>

**(E)-5,6-dihydroxy-4-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-2(3H)-one (4-25).** Mycelia of *AO-chmAB/terCQD* were inoculated into a solid medium containing polished rice (25 g, dry weight) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30°C for 9 days. After extraction with MeOH, the extract was then concentrated *in vacuo* and the residues were extracted with AcOEt (150 mL x 3). The crude extracts were purified with silica gel chromatography (n-Hexane/AcOEt = 1.5 to 0.4) followed by further purification utilizing HPLC equipped with Wakopak<sup>®</sup> Navi C18-5 ( $\phi$  4.6 x 250 mm) at the following conditions ( $\lambda = 310 \text{ nm}$ , a linear gradient from 10% to 100% acetonitrile for 9 min and 100% acetonitrile for 9 min at a flow rate of 4.0 mL/min) to afford (*E*)-5,6-dihydroxy-4-(prop-1-en-1-yl)benzofuran-2(3H)-one (**4-25**, yellow amorphous solid, 1.9 mg from 160 g of rice medium). HR-ESI-MS analysis (negative); calcd. for  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{O}_4$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ : 205.0506, found: 205.0504.  $^1\text{H-NMR}$  and  $^{13}\text{C-NMR}$  data are summarized in Table 6-4-2.

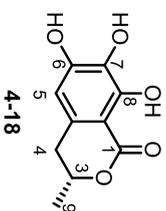
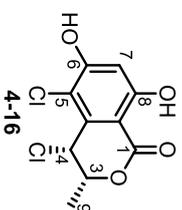
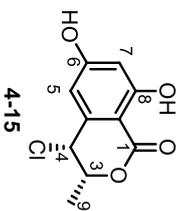
Table. 6-4-2. NMR Data for compounds at Chapter 4

compound 4-10		compound 4-11		compound 4-12		compound 4-14	
acetone-d <sub>6</sub>		DMSO-d <sub>6</sub>		acetone-d <sub>6</sub>		pyridine-d <sub>5</sub>	
$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicity, J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicity, J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicity, J in Hz)	$\delta_c$	$\delta_H$ (multiplicity, J in Hz)
1	170.7	1	169.9	1	170.4	1	170.3
3	76.3 4.69 (ddq, 11.4, 6.3, 3.5)	3	75.2 4.62 (m, 12.1, 6.1, 3.2)	3	75.8 4.76 (ddq, 11.7, 6.3, 3.5)	3	75.6 4.64 (ddq, 11.6, 6.3, 3.4)
4	35.0 2.85 (dd, 16.4, 3.3)	4	28.4 2.54 (dd, 16.8, 11.5)	4	32.8 2.80 (ddd, 17.1, 11.7, 0.7)	4	32.8 2.67 (dd, 17.0, 11.8)
	2.94 (dd, 16.4, 11.3)		3.07 (dd, 16.7, 3.2)		3.27 (dd, 17.0, 3.4)		3.19 (dd, 17.0, 3.3)
4a	143.2	4a	98.6	4a	140.1	4a	137.0
5	107.4 6.26 (m)	5	134.3	5	111.0	5	113.0 <sup>^</sup>
6	165.3	6	154.4	6	160.6	6	159.3 <sup>i</sup>
7	101.9 6.26 (dd, 2.2, 0.6)	7	100.8 6.25 (s)	7	103.0 6.48 (d, 0.6)	7	101.6 <sup>^</sup>
8	165.1	8	156.7	8	163.5	8	159.4 <sup>l</sup>
8a	101.7	8a	125.1	8a	102.7	8a	109.3 <sup>^</sup>
9	20.8 1.44 (d, 6.3)	9	20.5 1.40 (d, 6.2)	9	20.8 1.52 (d, 6.3)	9	20.9 1.37 (d, 6.3)
5-OH		5-OH	9.51 (brs)	5-OH		5-OH	
6-OH	9.40 (brs)	6-OH	9.51 (brs)	6-OH	9.9 (brs)	6-OH	12.73 (brs)
7-OH		7-OH		7-OH		7-OH	
8-OH	11.29 (brs)	8-OH	10.77 (brs)	8-OH	11.39 (brs)	8-OH	12.73 (brs)

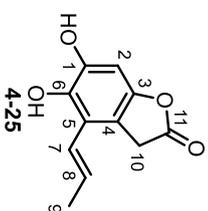
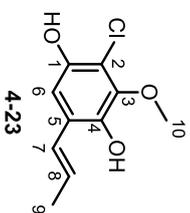
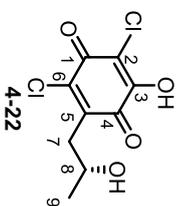
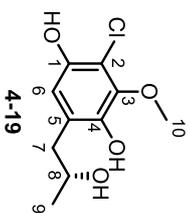
<sup>^</sup>: i: exchangeable



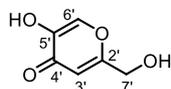
compound 4-15		compound 4-16		compound 4-18	
CDCl <sub>3</sub> /CD <sub>3</sub> OD = 20/1		CDCl <sub>3</sub>		CD <sub>3</sub> OD	
$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, J in Hz)	$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, J in Hz)	$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, J in Hz)
1	168.6	1	167.9	1	172.1
3	76.0 4.74 (dq, 6.4, 2.0)	3	75.8 4.80 (dq, 6.4, 1.9)	3	77.8 4.66 (m)
4	56.9 4.81 (d, 1.9)	4	53.8 5.14 (d, 1.8)	4	34.9 2.77 (dd, 16.2, 11.1)
					2.85 (dd, 16.0, 3.2)
4a	141.2	4a	137.6	4a	132.9 <sup>#</sup>
5	107.4 6.35 (m)	5	109.8	5	107.3 6.26 (s)
6	164.1 <sup>s</sup>	6	158.0	6	153.9
7	103.6 6.35 (m)	7	105.1 6.70 (s)	7	132.5 <sup>#</sup>
8	164.6 <sup>s</sup>	8	163.1	8	152.4
8a	98.8	8a	101.3	8a	101.7
9	17.7 1.56 (d, 6.4)	9	17.9 1.67 (d, 6.4)	9	20.9 1.45 (d, 6.3)
5-OH		5-OH		5-OH	
6-OH		6-OH	6.23 (brs)	6-OH	
7-OH		7-OH		7-OH	
8-OH		8-OH	11.17 (brs)	8-OH	
\$: exchangeable				#: exchangeable	



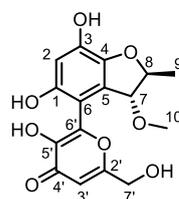
compound 4-19			compound 4-22			compound 4-23			compound 4-25		
CD <sub>3</sub> OD			CD <sub>3</sub> OD			CDCl <sub>3</sub>			acetone-d <sub>6</sub>		
$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, J in Hz)		$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, J in Hz)		$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, J in Hz)		$\delta$ C	$\delta$ H (multiplicity, J in Hz)	
1	147.2		1	185.1		1	145.2		1	145.7	
2	113.9		2	167.3		2	111.6		2	97.7 (6.56 (s))	
3	145.9		3	110.1		3	143.2		3	148.1	
4	143.3		4	173.1		4	140.5		4	112.2	
5	126.9		5	147.2		5	124.6		5	122.6	
6	114.7 (6.50 (brs))		6	138.4		6	108.3 (6.83 (s))		6	140.3	
7	41.1 (2.65 (dd, 13.5, 5.8))		7	38.0 (2.68 (dd, 12.6, 5.9))		7	124.4 (6.58 (dq, 15.8, 1.8))		7	125.4 (6.64 (dq, 16.2, 1.8))	
				2.82 (dd, 12.6, 7.6)							
8	68.8 (4.04 (dq, 6.2))		8	67.3 (4.01 (dq, 7.7, 6.2))		8	128.4 (6.27 (dq, 15.9, 6.7))		8	130.7 (6.35 (dq, 16.3, 6.6))	
9	23.0 (1.14 (d, 6.2))		9	23.5 (1.18 (d, 6.2))		9	19.0 (1.90 (dd, 6.7, 1.8))		9	19.6 (1.90 (dd, 6.6, 1.8))	
10	60.9 (3.80 (s))		10			10	61.2 (3.90 (s))		10	34.0 (3.79 (s))	
						10			10		
						1-OH	5.09 (brs)		11	175.4	
						4-OH	5.48 (brs)				



compound <b>4-24</b>					
kojic acid		kojic acid <b>4-24</b>			
	$\delta_C$ (lit)	$\delta_C$	$\delta_H$ (lit., multiplicity, $J$ in Hz)	$\delta_H$ (multiplicity, $J$ in Hz)	
1		149.2	1		
2		103.4	2		6.48 (s)
3		148.1	3		
4		137.6	4		
5		123.3	5		
6		106.0	6		
7		79.0	7		4.77 (s)
8		87.1	8		4.57 (q, 6.6 Hz)
9		18.6	9		1.16 (d, 6.6 Hz)
10		56.1	10		3.13 (s)
1-OH			1-OH		9.18 (s)
3-OH			3-OH		8.16 (s)
2'	168.0	167.0	2'		
3'	109.8	111.3	3'	6.33 (s)	6.23 (s)
4'	173.9	173.9	4'		
5'	145.7	157.3	5'		
6'	139.2	141.3	6'	8.02 (s)	-
7'	59.4	59.4	7'	4.28 (s)	4.28 (m)
5'-OH			5'-OH	9.06 (s)	10.07 (s)
7'-OH			7'-OH	5.67 (s)	5.66 (m)



kojic acid



**4-24**

## 6-5. Domain swapping

### 6-5-1. Strain.

*Escherichia coli* HST08 and 5-alpha was used for cloning and following standard recombinant DNA techniques. The host strain used in this study was *A. oryzae* NSAR1, a quadruple auxotrophic mutant (*niaD*<sup>-</sup>, *sC*<sup>-</sup>,  $\Delta$ *argB*, *adeA*<sup>-</sup>).

### 6-5-2. Transformation of *A. oryzae* to construct AO-*eqxSC*.

Transformation of *A. oryzae* NSAR1 (1.0 x 10<sup>8</sup> cells) were performed by the protoplast-polyethylene glycol method shown in above. To construct transformants harboring PKS-NRPS and trans-ER genes, pTASU0-*eqxS* and pUSA2-*eqxC* were used for the transformation to construct AO-*eqxSC*.

### 6-5-3. Construction of plasmid harboring hybrid PKS-NRPS for conventional domain swapping

Primers used for construction plasmids are given in Table S1. Domain boundaries were predicted by Conserved Domains Database (CDD; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>).

#### *hirA*( $\Delta$ R:*asolS*\_R\*)

The plasmid pTAex3-*hirA*<sup>11</sup> was digested with *Sma* I to afford a linear DNA fragment, pTAex3-*hirA*<sub>KS-C</sub>, which has ketosynthase (KS) to condensation (C) domain regions of *hirA*. PCR fragments of A-T region of *hirA* (*hirA*<sub>A-T\_1</sub>, *hirA*<sub>A-T\_2</sub>, and *hirA*<sub>A-T\_3</sub>), R\* region of *asolS* (*asolS*<sub>R\*\_1</sub>, *asolS*<sub>R\*\_2</sub>, and *asolS*<sub>R\*\_3</sub>) were amplified from pTAex3-*hirA* or pUARA2-*asolC/asolS* using primers set shown in Table S1. These two fragments (*hirA*<sub>A-T\_1</sub> + *asolS*<sub>R\*\_1</sub>; *hirA*<sub>A-T\_2</sub> + *asolS*<sub>R\*\_2</sub>; *hirA*<sub>A-T\_3</sub> + *asolS*<sub>R\*\_3</sub>) were assembled by PCR method using the primer sets shown in Table S1 to amplify the insert fragments (*hirA*<sub>A-T/asolS<sub>R\*\_1</sub>, *\_2*, and *\_3*). Each PCR product (*hirA*<sub>A-T/asolS<sub>R\*\_1</sub>, *\_2*, or *\_3*) was then inserted into the pTAex3-*hirA*<sub>KS-C</sub> using In-Fusion HD cloning kit (Clontech Laboratories) to construct an expression plasmid, pTAex3-*hirA*<sub>KS-T/asolS<sub>R\*\_1</sub>, *\_2*, and *\_3*, according to the manufacturer's protocol.</sub></sub></sub>

#### *asolS*( $\Delta$ R\*:*hirA*\_R)

The plasmid pUARA2-*asolC/asolS\_egfp* was digested with *Sma* I to afford a linear DNA fragment, pUARA2-*asolC/asolS*<sub>KS-C</sub>, which has *asolC* and ketosynthase (KS) to condensation (C) domain regions of *asolS*. PCR fragments of A-T region of *asolS* (*asolS*<sub>A-T\_1</sub>, *asolS*<sub>A-T\_2</sub>, and *asolS*<sub>A-T\_3</sub>), R region of *hirA* (*hirA*<sub>R\_1</sub>, *hirA*<sub>R\_2</sub>, and *hirA*<sub>R\_3</sub>) were amplified from pUARA2-*asolC/asolS* or pTAex3-*hirA* using primers set shown in Table S1. These two fragments (*asolS*<sub>A-T\_1</sub> + *hirA*<sub>R\_1</sub>; *asolS*<sub>A-T\_2</sub> + *hirA*<sub>R\_2</sub>; *asolS*<sub>A-T\_3</sub> + *hirA*<sub>R\_3</sub>) were assembled by PCR method using the primer sets shown in Table S1 to amplify the insert fragments (*asolS*<sub>A-T/hirA<sub>R\_1</sub>, *\_2*, and *\_3*). The PCR</sub>

product (*asolS<sub>A-T</sub>/hirA<sub>R</sub>*\_1, \_2, or \_3) was then inserted into the pUARA2-*asolC/asolS<sub>KS-C</sub>* using In-Fusion HD cloning kit (Clontech Laboratories) to construct an expression plasmid, pUARA2-*asolC/asolS<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R</sub>*\_1, \_2, and \_3, according to the manufacturer's protocol.

#### 6-5-4. Transformation of *A. oryzae* to integrate chimera PKS-NRPS.

Transformation of *A. oryzae* NSAR1 or transformant ( $1.0 \times 10^8$  cells) were performed by the protoplast-polyethylene glycol method shown in above. To construct transformants harboring chimera PKS-NRPS and normal trans-ER genes (pUARA2-*asolC/asolS<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R</sub>*; pTAex3-*hirA<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R</sub>* + pUSA2-*hirC*) were used for the transformation to construct AO-*asolC<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R</sub>* and AO-*hirC<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R</sub>*.

#### 6-5-5. Analysis of the metabolites from AO-*asolC<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R</sub>* and AO-*hirC<sub>KS-T</sub>/asolS<sub>R</sub>*.

Mycelia of *A. oryzae* transformants were inoculated into a solid medium containing polished rice (10 g) and adenine (1 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30 °C for 9 days. After extraction with ethyl acetate, the extract was then concentrated *in vacuo* and the residues were dissolved in 60% MeOH (5 mL). The crude extracts were cleaned up with SepPak C<sub>8</sub> (Waters; Wash with 60% MeOH [700 µL x 2], elution with 100% MeOH [700 µL x 2]), then analyzed by UPLC-MS system (Waters) equipped with QDa. As the stationary phase, a C18 column (ACQUITY UPLC BEH C18 1.7 µm 2.1 x 50 mm) with a binary solvent system consisting of acetonitrile containing 0.1% formic acid (solvent B) and water containing 0.1% formic acid (solvent A) was used. The following gradient with a flow rate of 0.7 ml/min was applied: 0.0 – 3.0 min = 40% - 100% B, 3.0 - 5.0 min = 100% B, 5.0 - 5.5 min = 100% - 40% B, and 5.5 – 9.0 min, 40% B.

**Compound 5-2.** The crude extracts prepared from AO-*asolC<sub>KS-T</sub>/hirA<sub>R</sub>* were purified with silica gel chromatography (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 50 to 1) to obtain compound **5-2** (14.2 mg from 600 g of rice medium).

<sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data are summarized in Table 6-5-1.

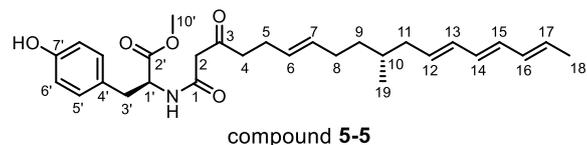
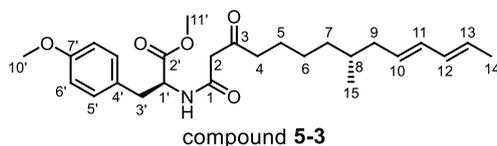
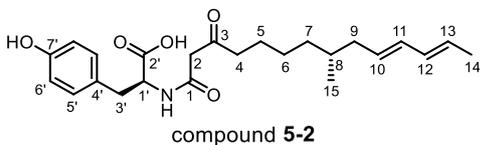
**Compound 5-3.** To a solution of compound **5-2** (8.4 mg, 20 µmol) in methanol (2.0 mL) were added TMS-diazomethane (2.0 M diethyl ether solution, excess) at room temperature and the mixture was stirred for 1 hr. The reaction mixture was quenched with acetic acid, and the resulting mixture was concentrated *in vacuo*. The residues were purified with silica gel chromatography (CHCl<sub>3</sub>) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5 µm, 150 Å, 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions (λ = 280 nm, a linear gradient from 40% to 100% acetonitrile

for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford compound **5-3** (colorless oil, 1.0 mg, 2.3  $\mu$ mol, 12%).  $[\alpha]_D^{24}$  13.5 (c 0.3 MeOH). HR-ESI-MS analysis (positive); calcd. for  $C_{26}H_{37}NO_5Na$   $[M+Na]^+$ : 466.2564, found: 466.2556.  $^1H$ -NMR and  $^{13}C$ -NMR data are summarized in Table 6-5-1.

**Compound 5-5.** Mycelia of AO-*hirCA*<sub>KS-T</sub>/*asolS*<sub>R</sub>\* were inoculated into a solid medium containing polished rice (50 g, dry weight x 10) and adenine (10 mg) in 500 mL Erlenmeyer flasks. Each culture was incubated at 30°C for 12 days. After extraction with acetone, the extract was then concentrated *in vacuo*. The residues were added MeOH (final 5%) and washed with n-hexane (500 mL x 1). The water layer were purified with ODS chromatography (Wakosil® 40C18, 10% MeOH to 100% MeOH) to obtain partially pure compounds (62 mg). To a solution of crude extracts (32 mg) in methanol (3.0 mL) were added TMS-diazomethane (2.0 M diethyl ether solution, excess) at room temperature and the mixture was stirred for 2 min. The reaction mixture was directly concentrated *in vacuo*. The resulting residues were purified with silica gel chromatography ( $CHCl_3/MeOH = 100$  to 10) followed by further purification utilizing HPLC equipped with J-Pak vario XBP C18-L, 5  $\mu$ m, 150 Å, 4.6 x 250 mm(D) at the following conditions ( $\lambda = 266$  nm, a linear gradient from 40% to 100% acetonitrile for 15 min and 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate of 1.0 mL/min) to afford compound **5-5** (yellow oil, 0.2 mg from 250 g of rice medium).  $^1H$ -NMR and  $^{13}C$ -NMR data are summarized in Table 6-5-1.

Table 6-5-1. NMR Data for 5-2, 5-3, 5-5.

compound 5-2		compound 5-3		compound 5-5	
CD <sub>3</sub> OD		CD <sub>3</sub> OD		C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	
$\delta_C$	$\delta_H$ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ (multiplicity, <i>J</i> in Hz)
1	168.9	1	169.0	1	165.6
2	49.0 <sup>  </sup> Deuterium exchange	2	49.0 <sup>  </sup> Deuterium exchange	2	48.3 2.75 (s)
3	206.6	3	206.4	3	205.2
4	43.3 2.42 (t, 6.0)	4	43.3 2.4 (t, 6.2)	4	43.2 1.89 (m)
5	24.6 1.47 (m)	5	24.6 1.47 (m)	5	26.6 2.08 (m)
6	27.6 1.23 (m)	6	27.6 1.23 (m)	6	128.1 <sup>  </sup> 5.25 (m)
	1.29 (m)		1.29 (m)	7	131.8
7	37.5 1.10 (m)	7	37.5 1.11 (m)	8	30.6 1.92 (m)
	1.31 (m)		1.30 (m)		2.00 (m)
8	34.4 1.47 (m)	8	34.4 1.47 (m)	9	36.7 1.16 (m)
9	41.1 1.88 (m)	9	41.1 1.88 (m)		1.39 (m)
	2.05 (m)		2.05 (m)	10	33.2 1.47 (m)
10	131.2 5.50 (m)	10	131.2 5.50 (m)	11	40.7 1.91 (m)
11	133.0 <sup>^</sup> 5.98 (m)	11	133.1 5.98 (m)		2.07 (m)
12	133.1 <sup>^</sup> 5.98 (m)	12	133.1 5.98 (m)	12	132.7 5.63 (dt, 14.4, 7.4)
13	127.4 5.55 (m)	13	127.4 5.55 (m)	13	132.6 6.14 (m)
14	18.1 1.71 (d, 5.6)	14	18.1 1.71 (d, 5.1)	14	131.1 6.17 (m)
15	19.9 0.86 (d, 5.4)	15	19.9 0.86 (d, 5.6)	15	131.6 6.17 (m)
1'	55.4 4.64 (dd, 7.0, 4.1)	1'	55.4 4.70 (dd, 7.2, 4.6)	16	132.5 6.10 (m)
2'	174.6	2'	173.3	17	128.9 5.56 (dq, 14.7, 7.0)
3'	37.7 2.88 (dd, 11.7, 7.0)	3'	37.6 2.92 (dd, 11.7, 7.2)	18	18.3 1.61 (d, 6.9)
	3.12 (dd, 11.6, 4.1)		3.10 (dd, 11.7, 4.6)	19	19.6 0.88 (d, 6.6)
4'	128.9	4'	129.8	1'	54.0 5.03 (m)
5'	131.3 7.05 (d, 7.0)	5'	131.3 7.12 (d, 7.1)	2'	171.9
6'	116.2 6.69 (d, 6.9)	6'	114.9 6.83 (d, 7.2)	3'	37.5 2.80 (dd, 14.0, 7.6)
7'	157.4	7'	160.2		3.05 (dd, 14.0, 5.3)
8'	116.2 6.69 (d, 6.9)	8'	114.9 6.83 (d, 7.2)	4'	128.1 <sup>  </sup>
9'	131.3 7.05 (d, 7.0)	9'	131.3 7.12 (d, 7.1)	5'	130.7 6.95 (d, 8.5)
		10'	55.6 3.76 (s)	6'	115.8 6.65 (d, 8.4)
		11'	52.7 3.70 (s)	7'	156.0
				8'	115.8 6.65 (d, 8.4)
				9'	130.7 6.95 (d, 8.5)
				10'	51.8 3.26 (s)
				NH	7.40 (d, 7.7)



<sup>||</sup>Overlapped signal with the solvent peak

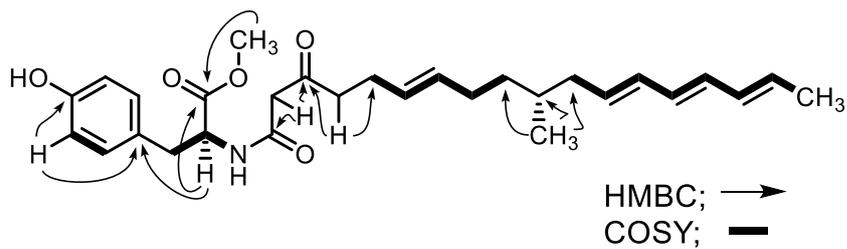
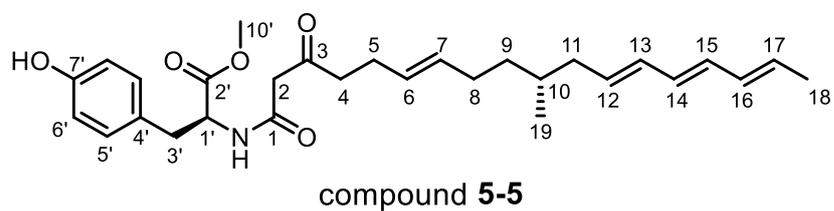
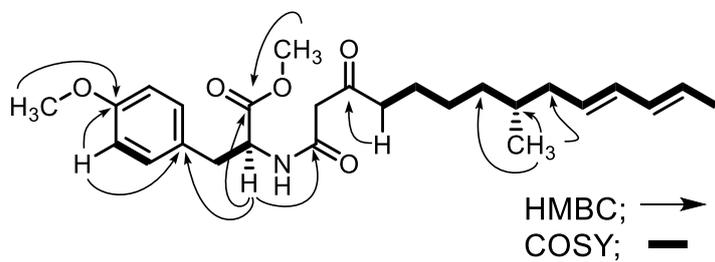
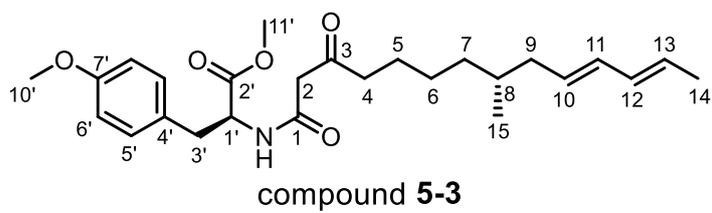
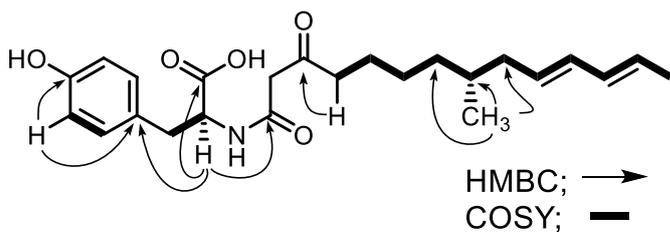
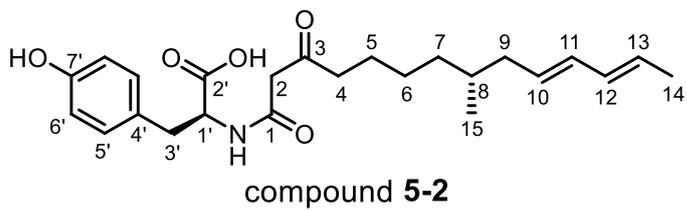
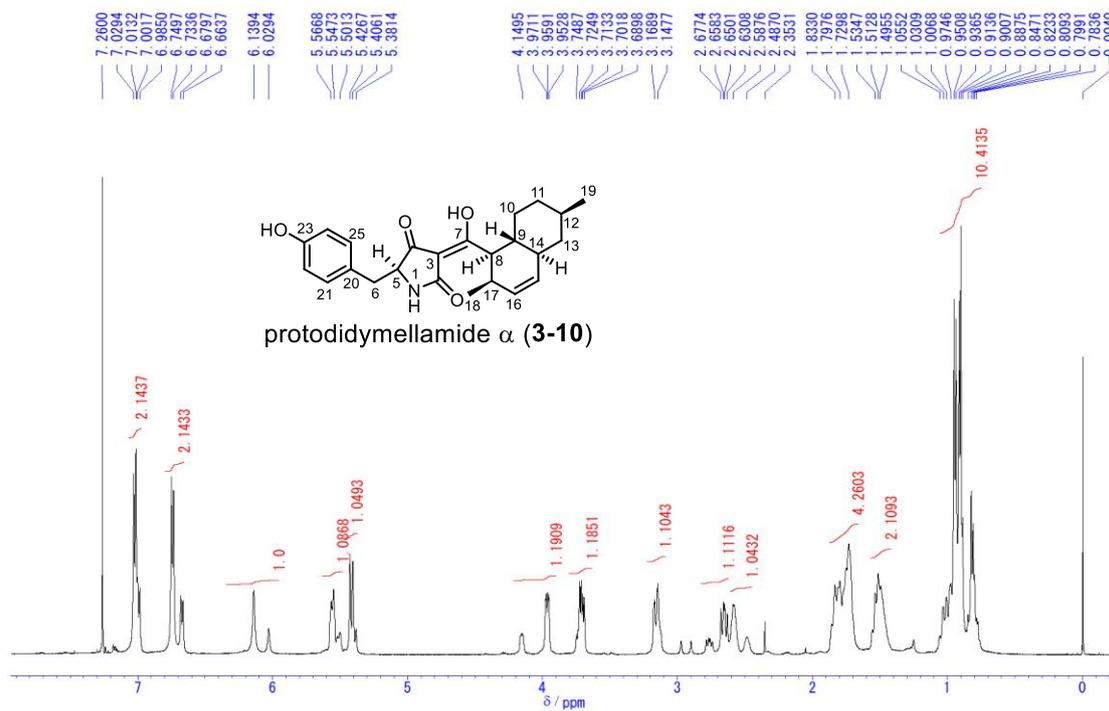


Table 6-5-2. Oligonucleotides used for construction of *expression* plasmids harboring biosynthetic genes of chimeric PKS-NRPS.

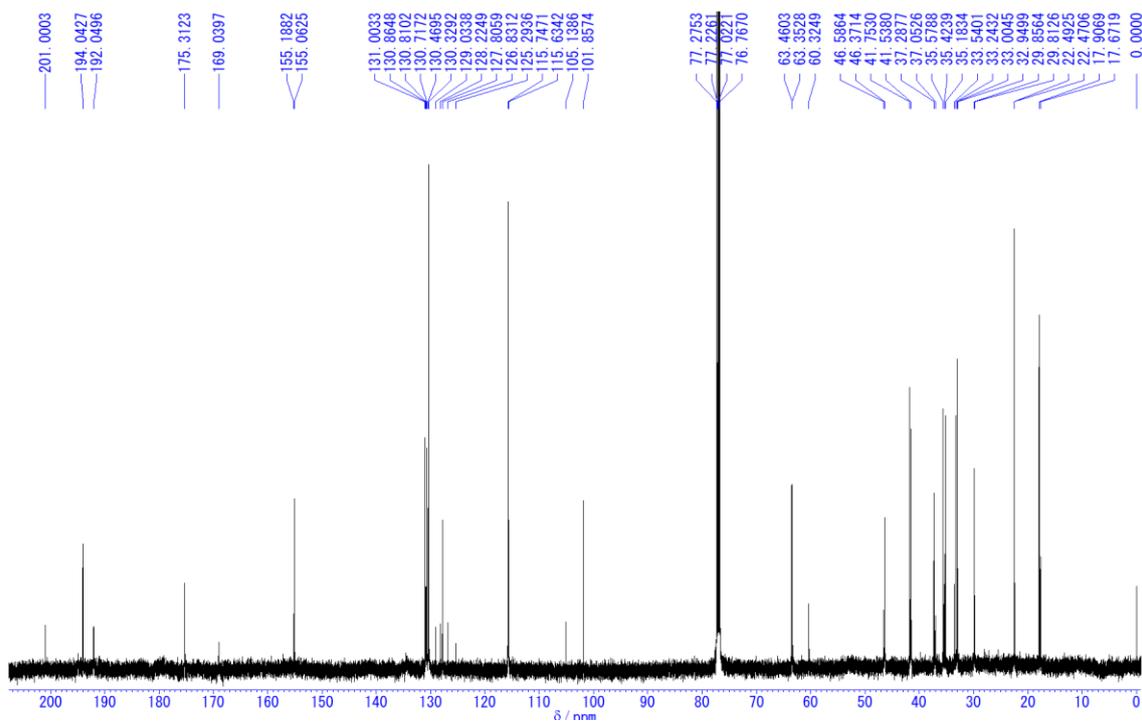
Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size
			Vector
<i>hirA<sub>A-T</sub>_1</i>	-	F: ATGTAATGTGACTCCCGGGTCGAAGGTTGCTG	1.6 kbp
		R: TGCAGGCGCATCAAGAGCATCGAATTGCCTCCAC	-
<i>hirA<sub>A-T</sub>_2</i>	-	F: ATGTAATGTGACTCCCGGGTCGAAGGTTGCTG	1.7 kbp
		R: TGTCTCCGCAGTCCAGTCAACGATACTGTCAG	-
<i>hirA<sub>A-T</sub>_3</i>	-	F: ATGTAATGTGACTCCCGGGTCGAAGGTTGCTG	1.8 kbp
		R: AGGAAGCTCGTGGCTCCAGTAAGCACCACAACC	-
<i>asolS<sub>R*</sub>_1</i>	-	F: TGGAGCAATTGCATGCTCTTGATGCGCCTGC	1.3 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCGGGTCACATGGCCCCGAGG	-
<i>asolS<sub>R*</sub>_2</i>	-	F: TGACAGTATCGTTGACTGGACTGCGGAGACAG	1.1 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCGGGTCACATGGCCCCGAGG	-
<i>asolS<sub>R*</sub>_3</i>	-	F: AGGTTGTGGTGCTTACTGGAGCCACGAGCTTCC	1.0 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCGGGTCACATGGCCCCGAGG	-
<i>hirA<sub>A-T</sub>/asolS<sub>R*</sub>_1</i>	<i>Sma</i> I	F: ATGTAATGTGACTCCCGGGTCGAAGGTTGCTG	2.8 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCGGGTCACATGGCCCCGAGG	pTAex3- <i>hirA</i>
<i>hirA<sub>A-T</sub>/asolS<sub>R*</sub>_2</i>	<i>Sma</i> I	F: ATGTAATGTGACTCCCGGGTCGAAGGTTGCTG	2.8 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCGGGTCACATGGCCCCGAGG	pTAex3- <i>hirA</i>
<i>hirA<sub>A-T</sub>/asolS<sub>R*</sub>_3</i>	<i>Sma</i> I	F: ATGTAATGTGACTCCCGGGTCGAAGGTTGCTG	2.8 kbp
		R: AGCTACTACAGATCCCGGGTCACATGGCCCCGAGG	pTAex3- <i>hirA</i>
<i>asolS<sub>A-T</sub>_1</i>	-	F: TATGTCCAGCTCGCATCCCGGGTGGCTGGGGTATC	1.7 kbp
		R: AGCTCAAGGAGGAGCATGGAGTTGCCGCC	-
<i>asolS<sub>A-T</sub>_2</i>	-	F: TATGTCCAGCTCGCATCCCGGGTGGCTGGGGTATC	1.8 kbp
		R: TCGTTTCAACCTCCAATCGATGTCTTCCGG	-
<i>asolS<sub>A-T</sub>_3</i>	-	F: TATGTCCAGCTCGCATCCCGGGTGGCTGGGGTATC	1.9 kbp
		R: AAGCCCCTGAACCACTCAGCAGCACCTC	-
<i>hirA<sub>R</sub>_1</i>	-	F: TGGGGCAACTCCATGCTCCTCCTTGAGCTG	1.2 kbp
		R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTTATTTTCCTTGAAG	-
<i>hirA<sub>R</sub>_2</i>	-	F: ACCCGGAAGACATCGATTGGGAGGTTGAAACG	1.1 kbp
		R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTTATTTTCCTTGAAG	-
<i>hirA<sub>R</sub>_3</i>	-	F: AGGTCGTGCTGACTGGTTCAACGGGCTTCC	1.0 kbp
		R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTTATTTTCCTTGAAG	-

<i>asolS<sub>A-T</sub>/hirA<sub>R</sub>_1</i>	<i>Sma</i> I	F: TATGTCCAGCTCGCATCCCGGGTGGCTGGGGTATC	2.8 kbp
		R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTATTTTCCTTGAAG	pUARA2- <i>asolC</i> - <i>asolS_egfp</i>
<i>asolS<sub>A-T</sub>/hirA<sub>R</sub>_2</i>	<i>Sma</i> I	F: TATGTCCAGCTCGCATCCCGGGTGGCTGGGGTATC	2.8 kbp
		R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTATTTTCCTTGAAG	pUARA2- <i>asolC</i> - <i>asolS_egfp</i>
<i>asolS<sub>A-T</sub>/hirA<sub>R</sub>_3</i>	<i>Sma</i> I	F: TATGTCCAGCTCGCATCCCGGGTGGCTGGGGTATC	2.8 kbp
		R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTATTTTCCTTGAAG	pUARA2- <i>asolC</i> - <i>asolS_egfp</i>



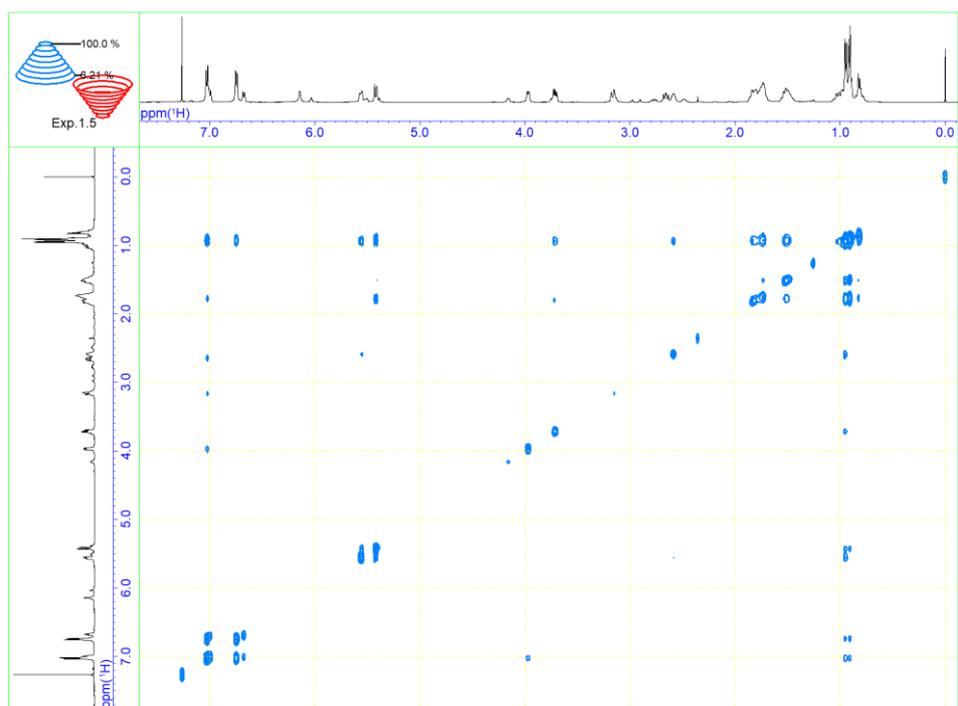
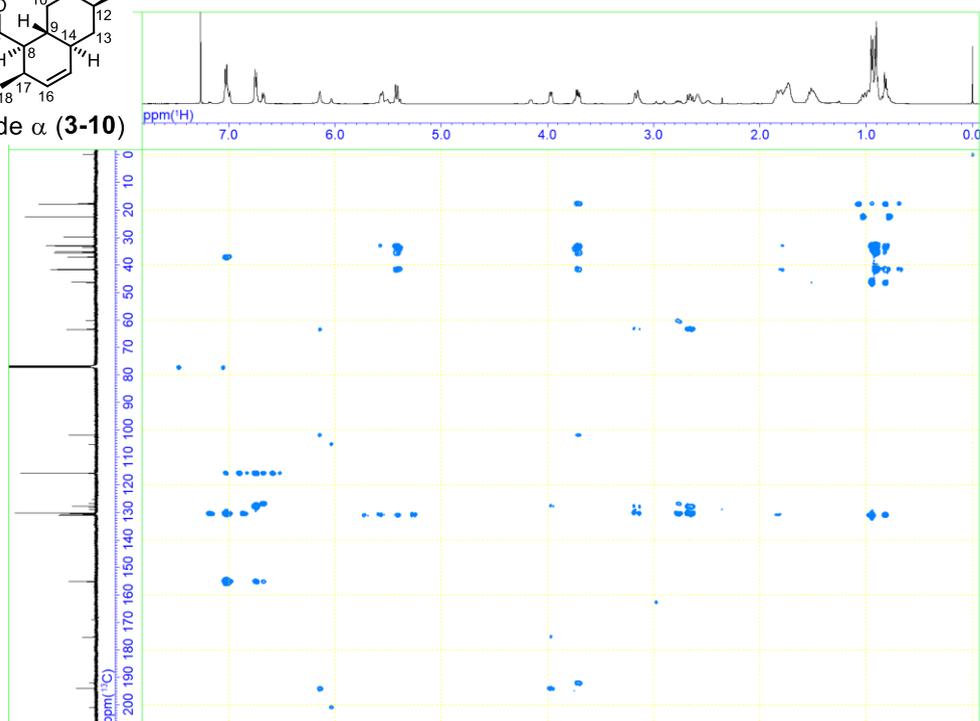
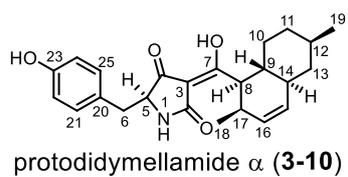


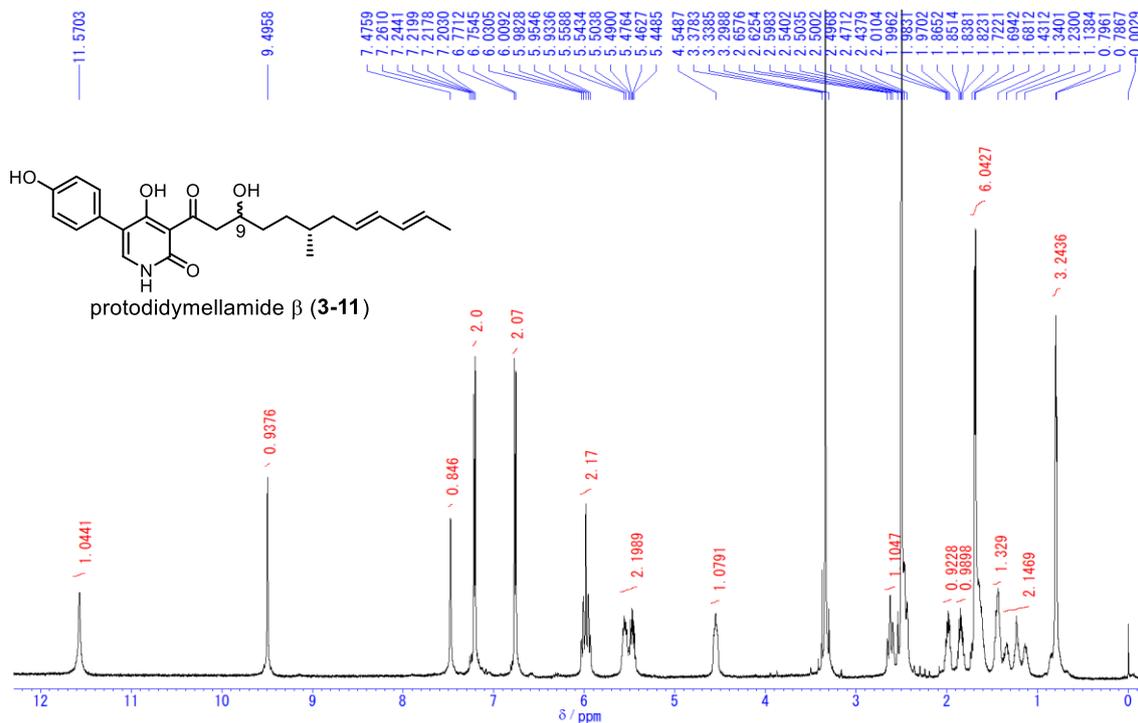
$^1\text{H-NMR}$  spectrum of **3-10** (in  $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



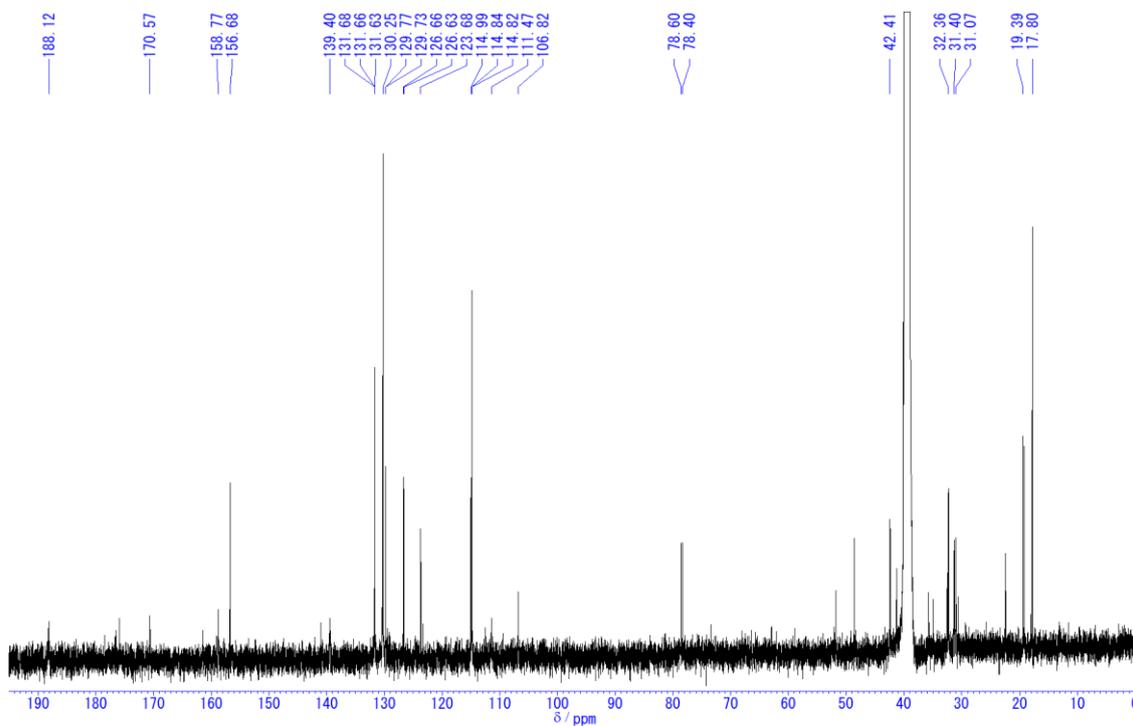
$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of **3-10** (in  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)



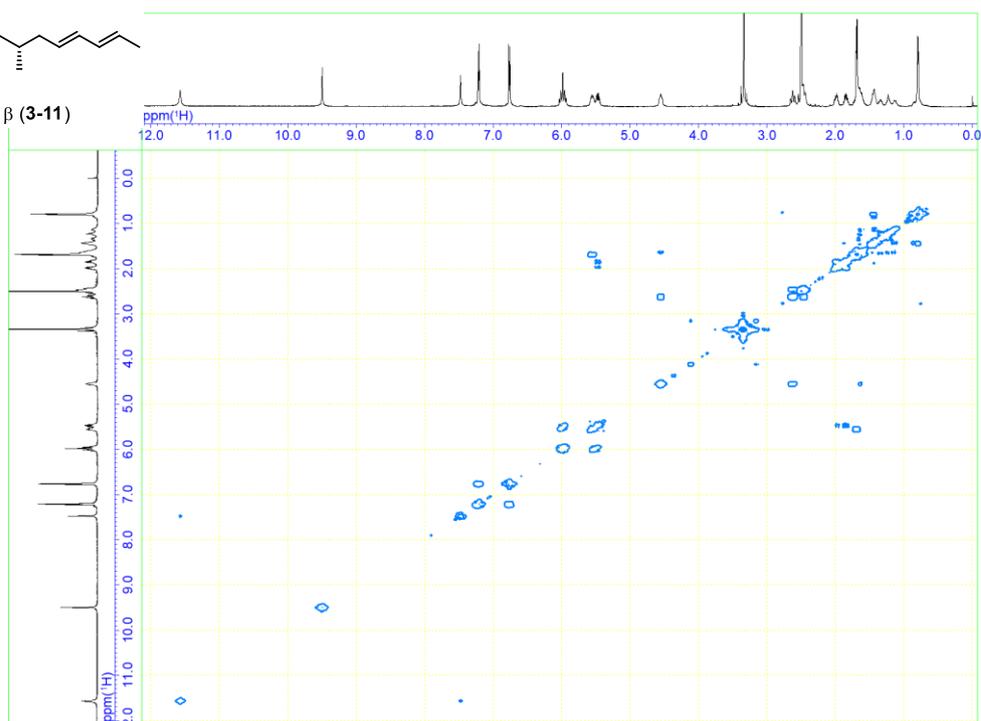
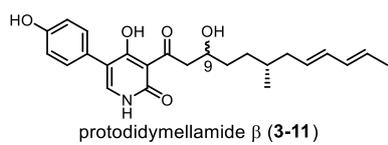




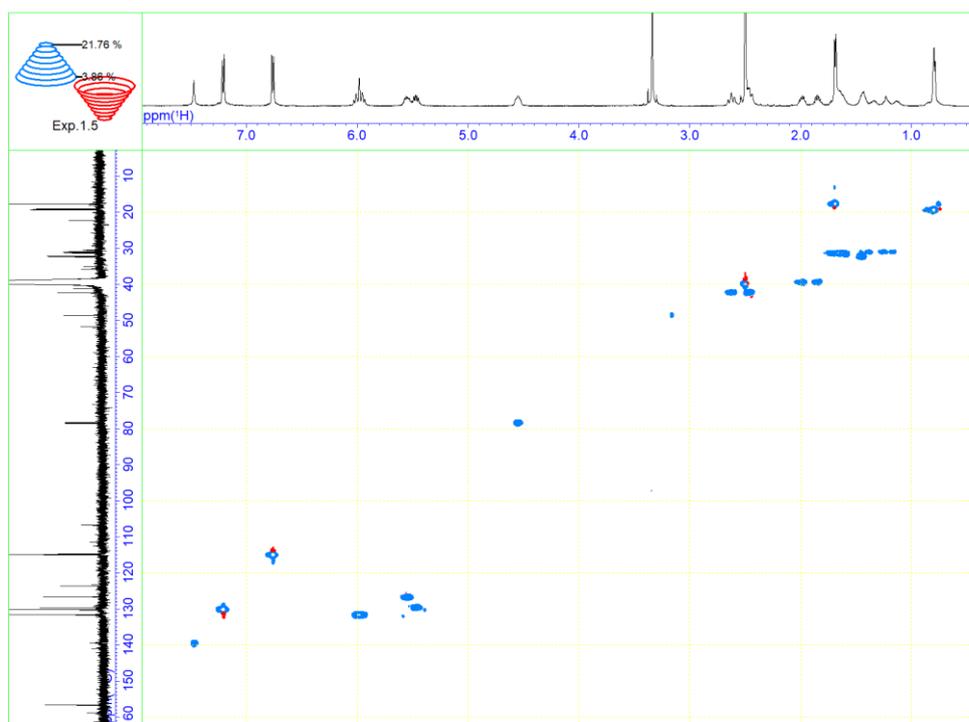
$^1\text{H-NMR}$  spectrum of **3-11** (in  $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz)



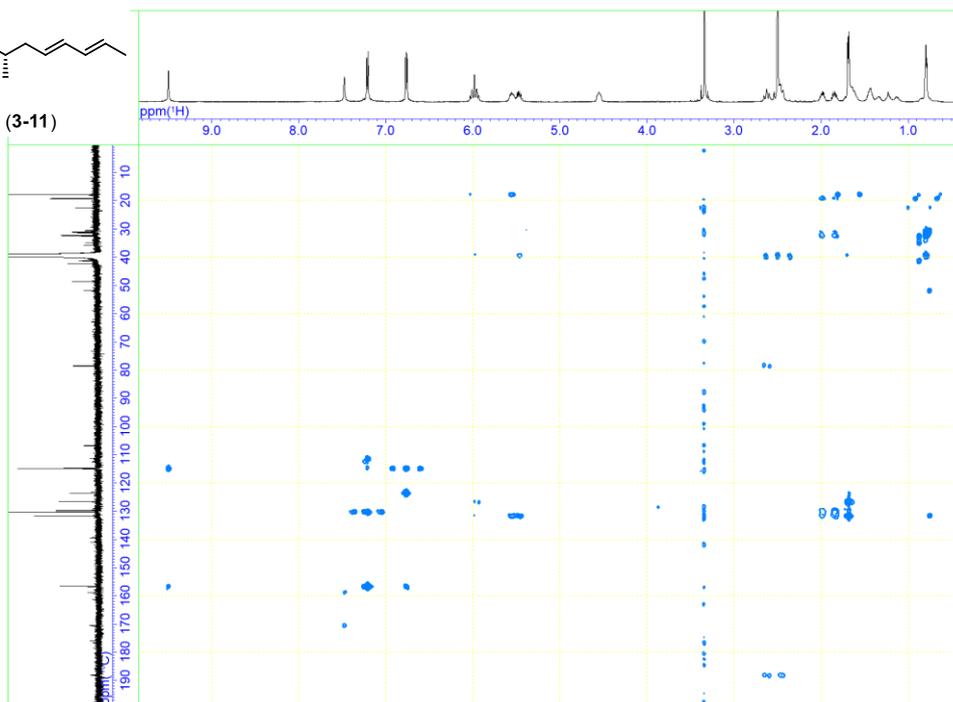
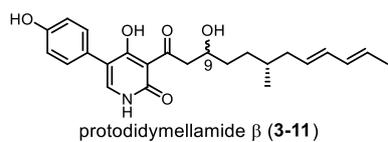
$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of **3-11** (in  $\text{DMSO-d}_6$ , 125 MHz)



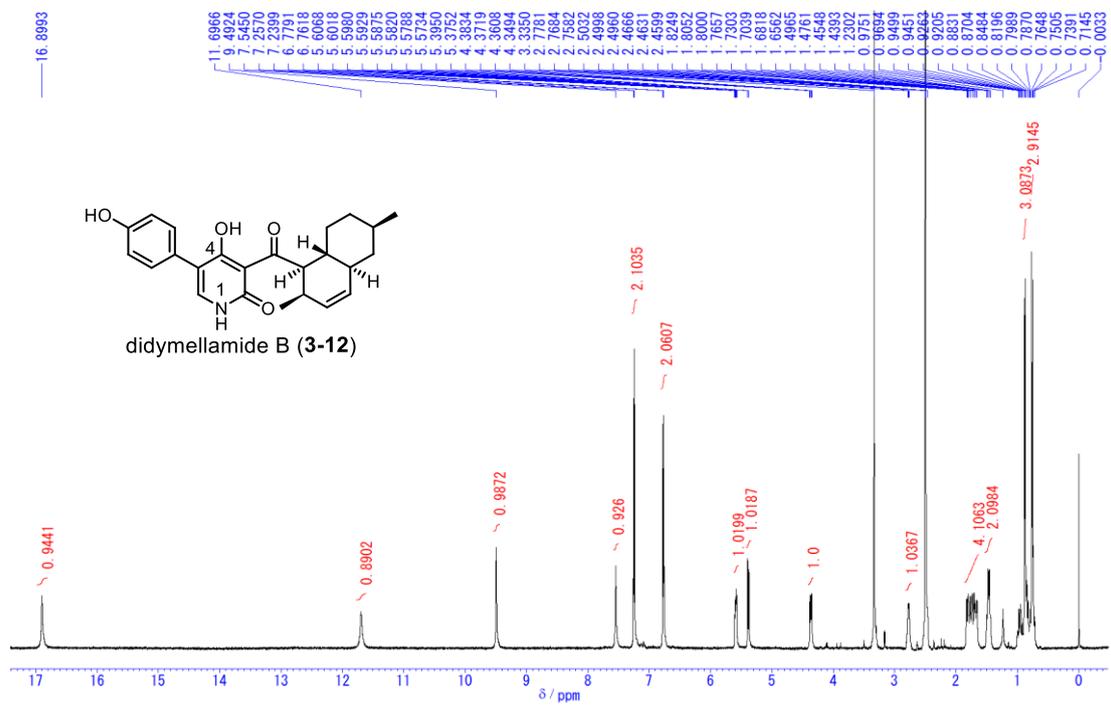
COSY spectra of **3-11** (in DMSO- $d_6$ )



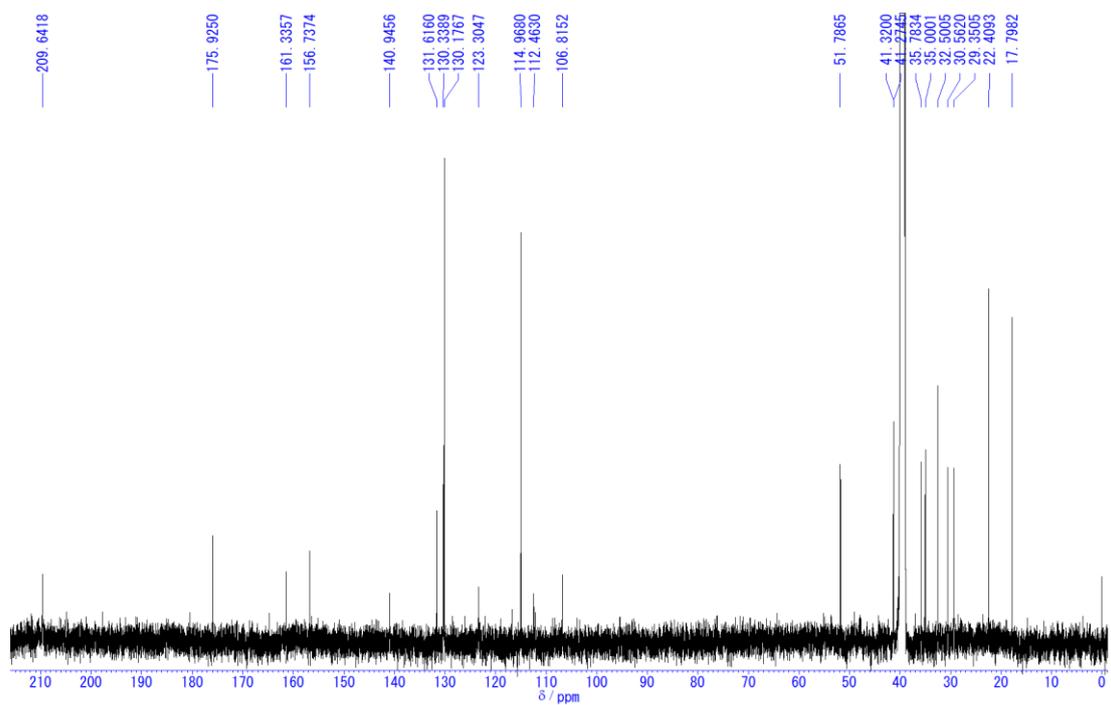
HSQC spectra of **3-11** (in DMSO- $d_6$ )



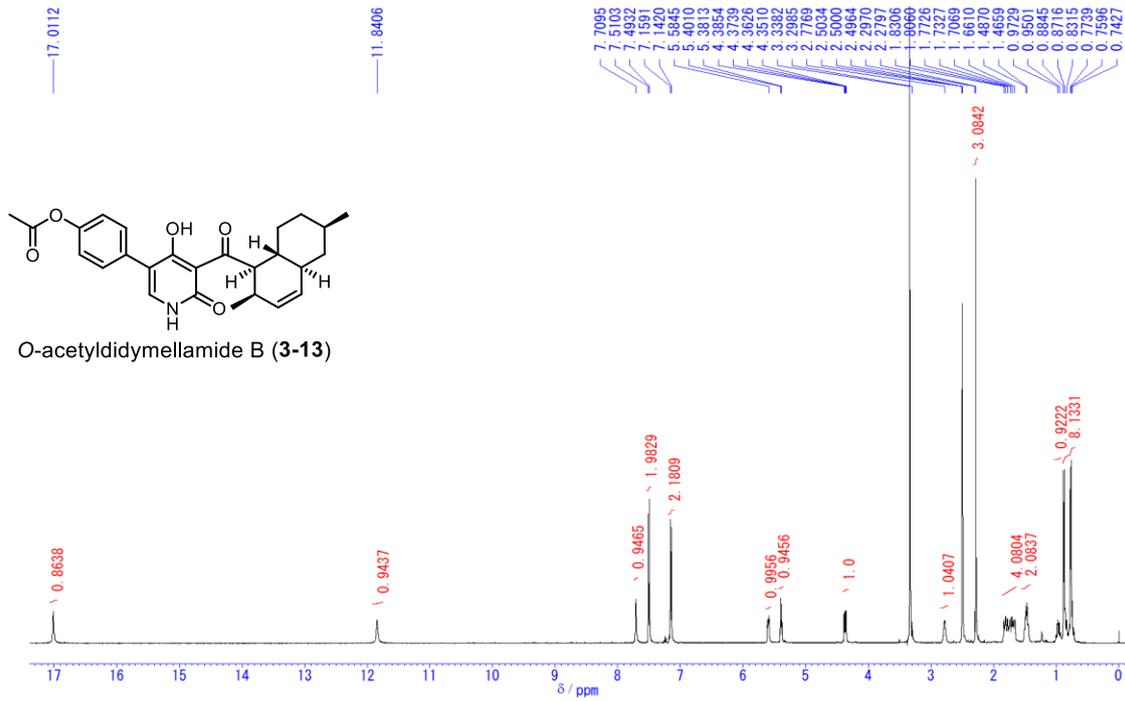
HMBC spectra of **3-11** (in DMSO- $d_6$ )



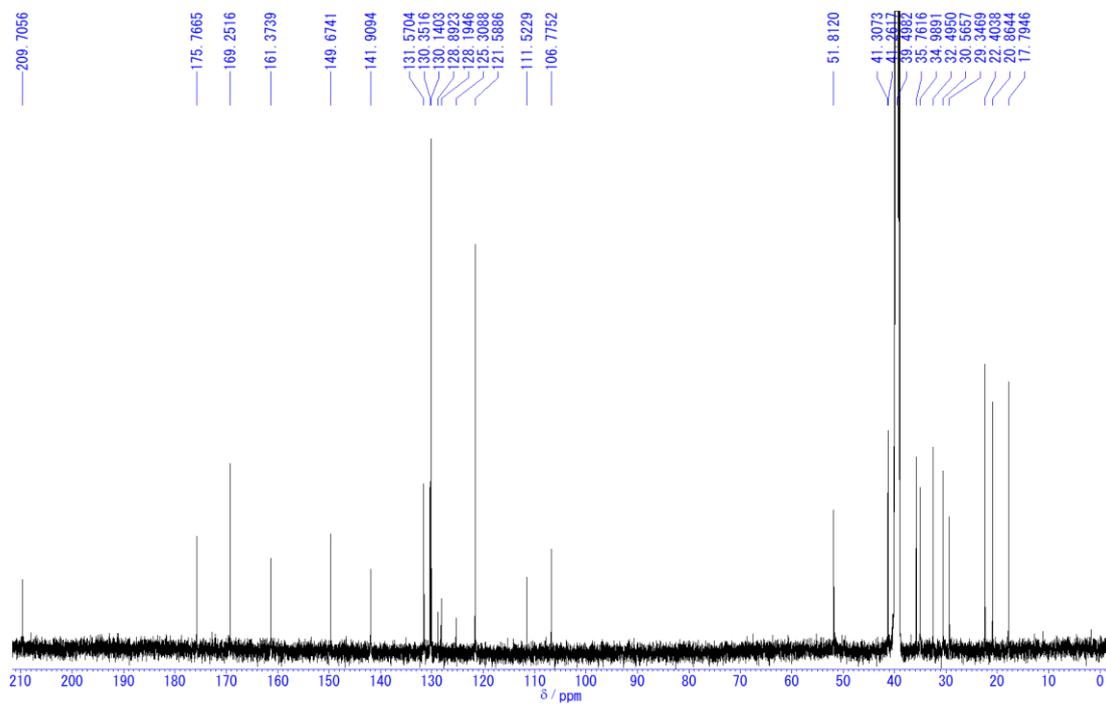
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of 3-12 (in DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)



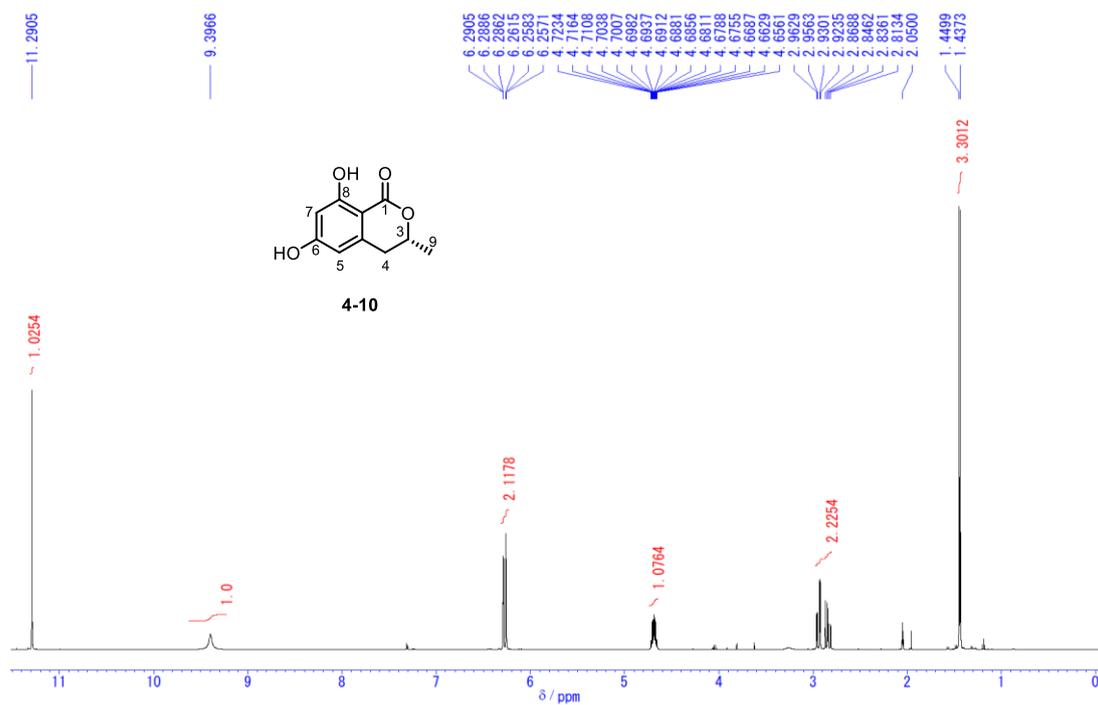
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of 3-12 (in DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz)



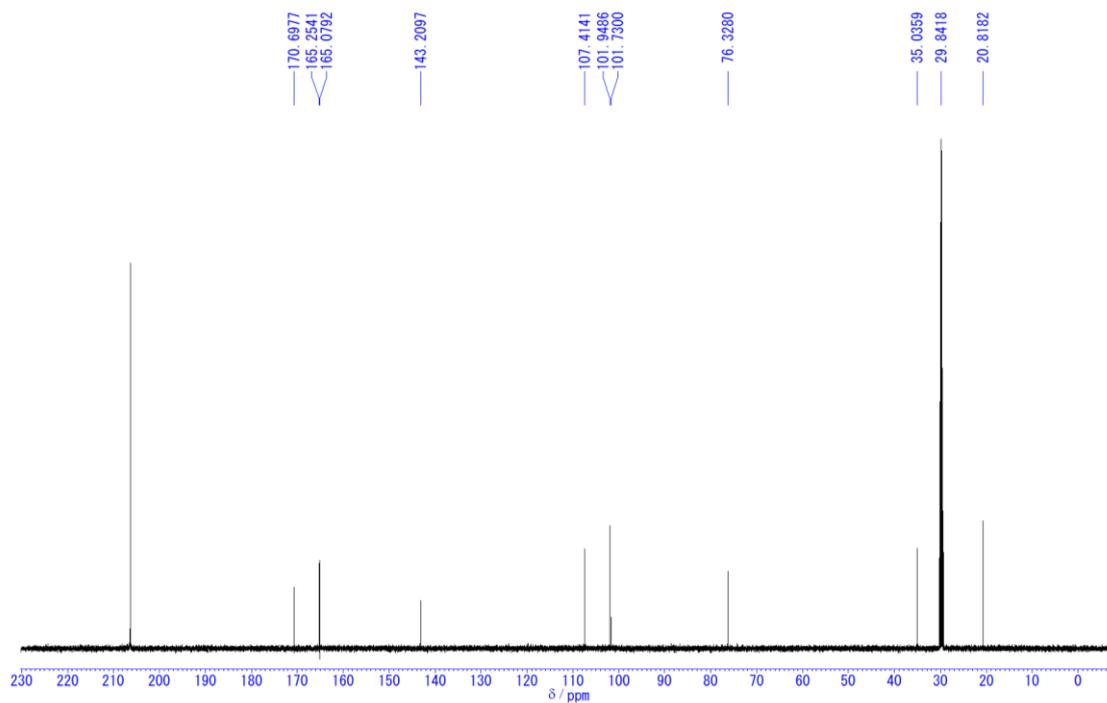
$^1\text{H-NMR}$  spectrum of **3-13** (in  $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz)



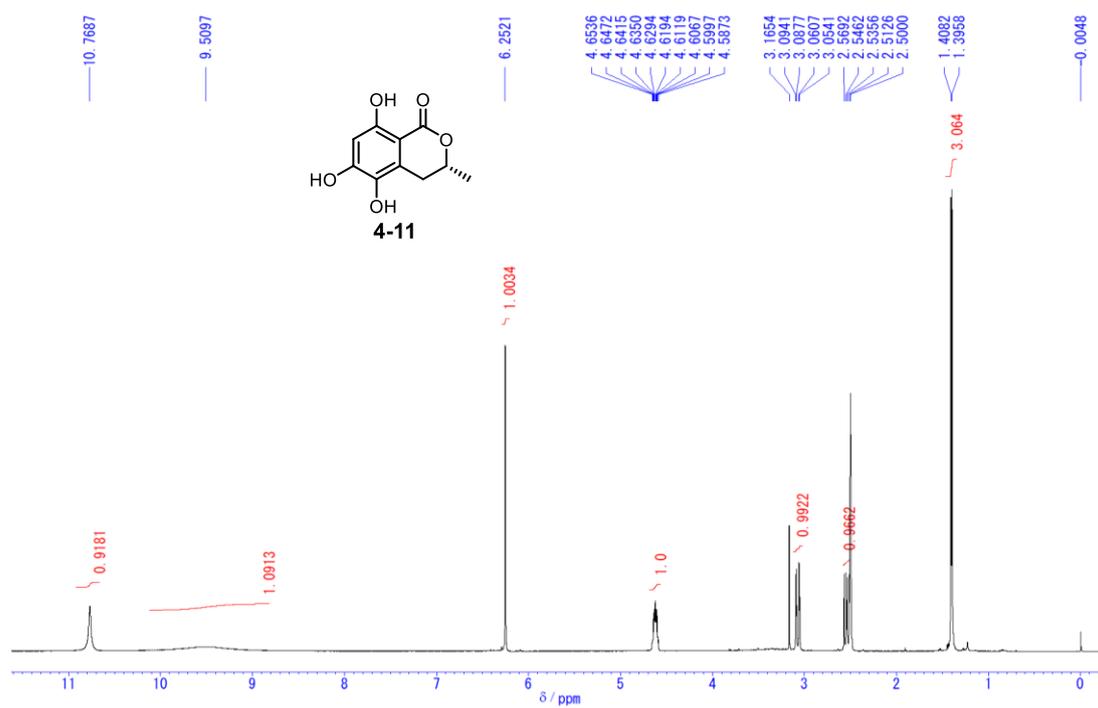
$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of **3-13** (in  $\text{DMSO-d}_6$ , 125 MHz)



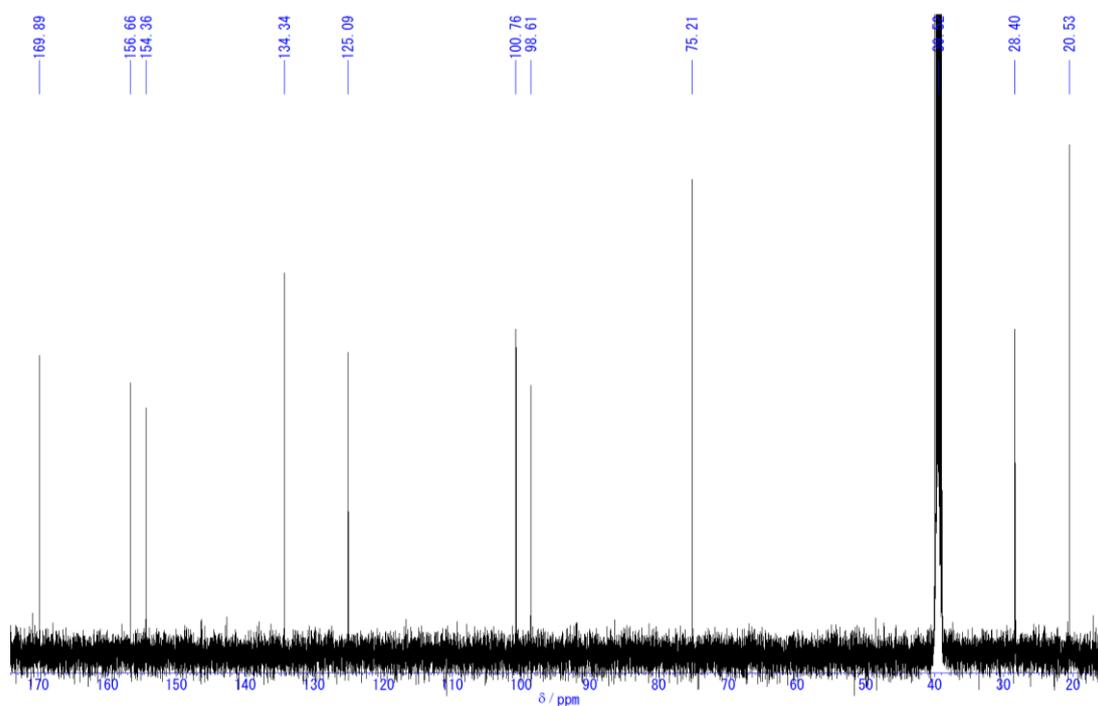
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-10** (in acetone-d<sub>6</sub>, 500 MHz)



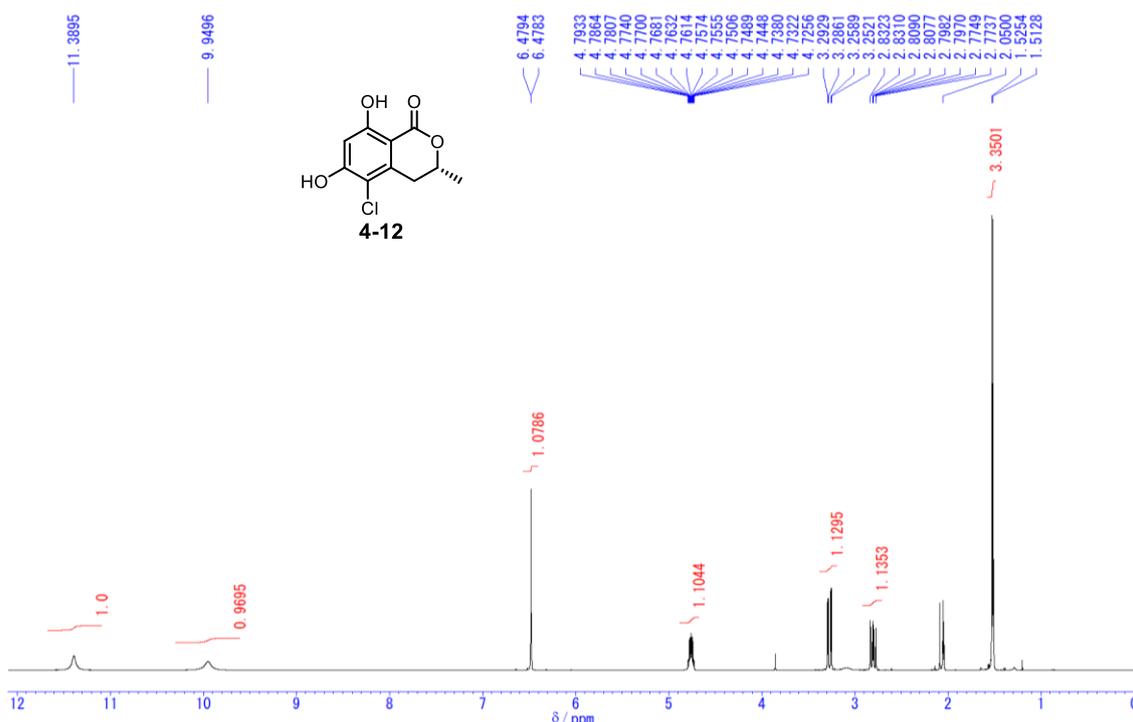
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-10** (in acetone-d<sub>6</sub>, 125 MHz)



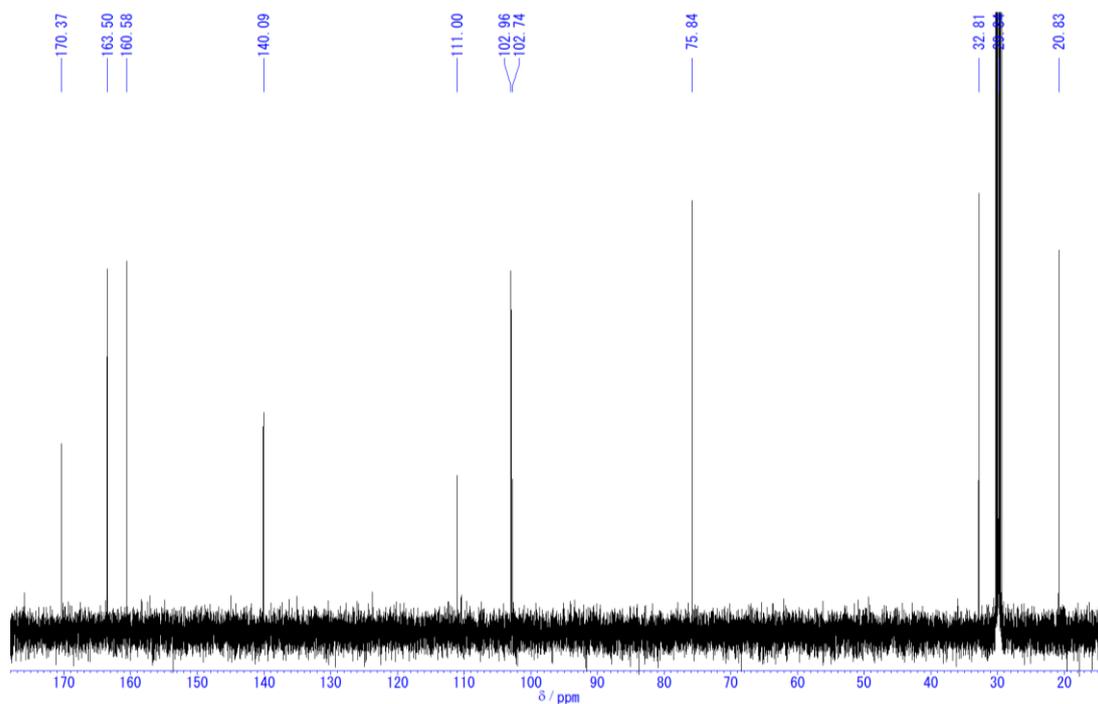
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-11** (in DMSO-d<sub>6</sub>, 500 MHz)



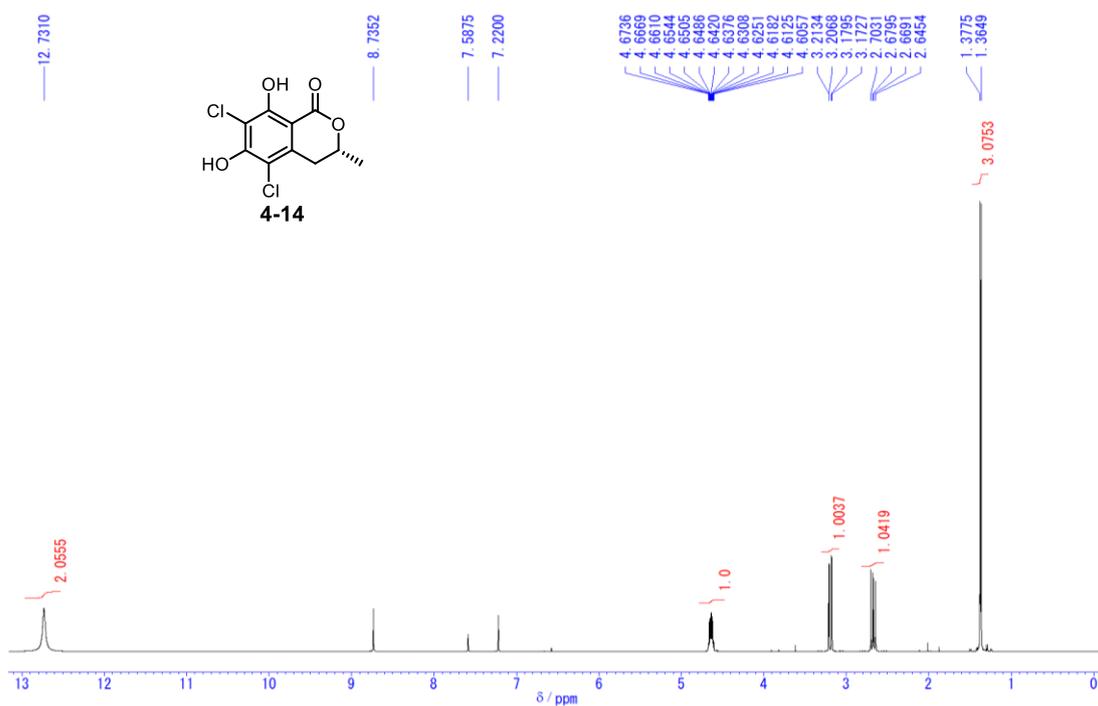
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-11** (in DMSO-d<sub>6</sub>, 125 MHz)



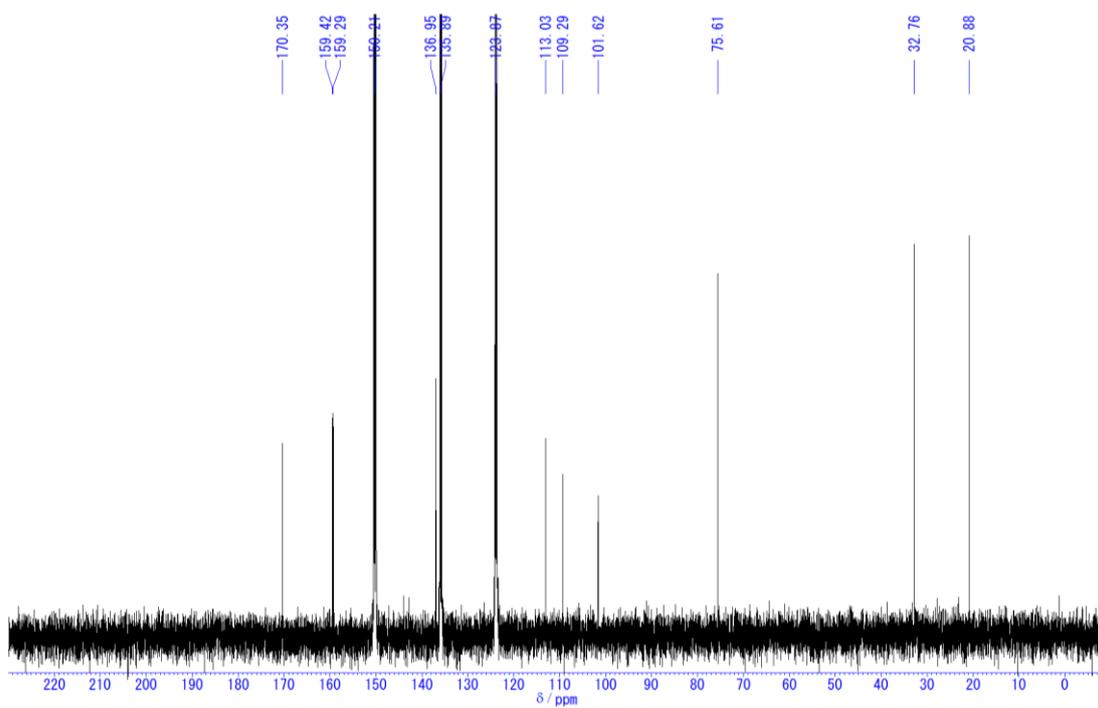
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-12** (in acetone-d<sub>6</sub>, 500 MHz)



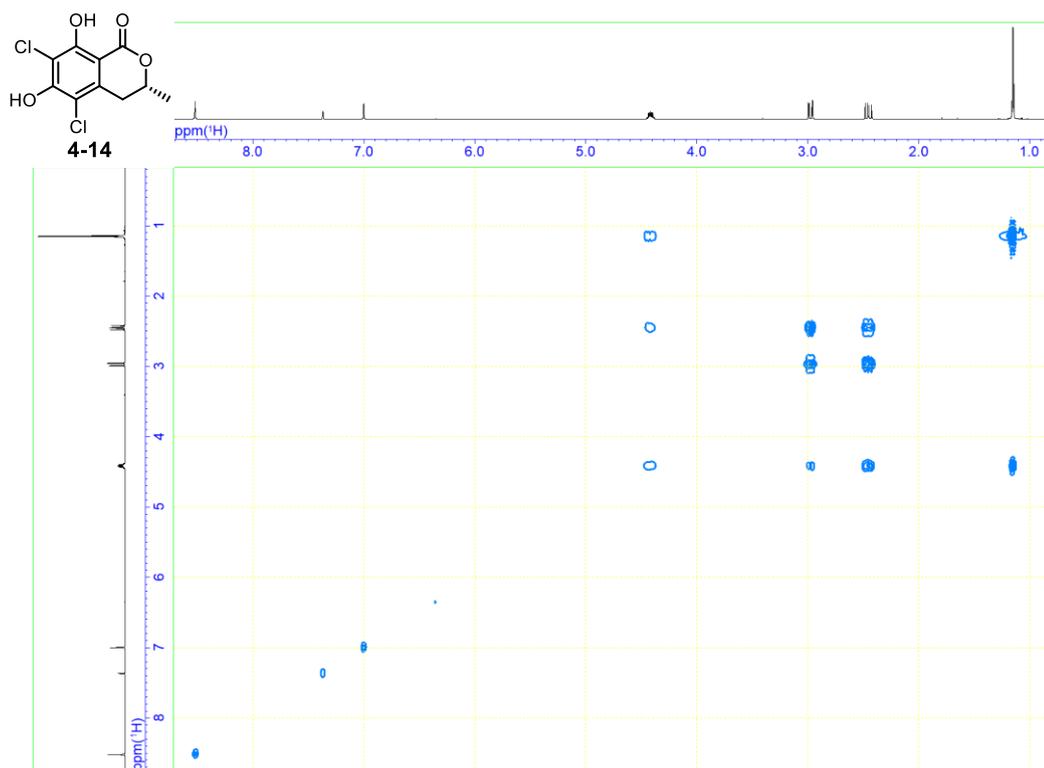
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-12** (in acetone-d<sub>6</sub>, 125 MHz)



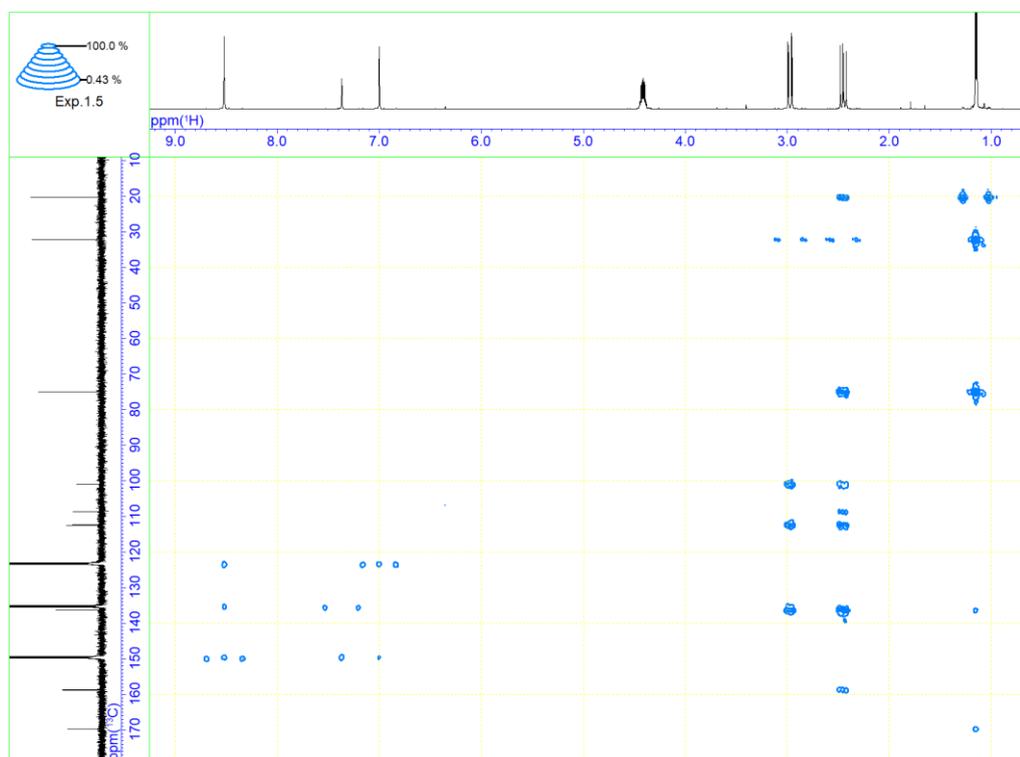
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-14** (in pyridine-d<sub>5</sub>, 500 MHz)



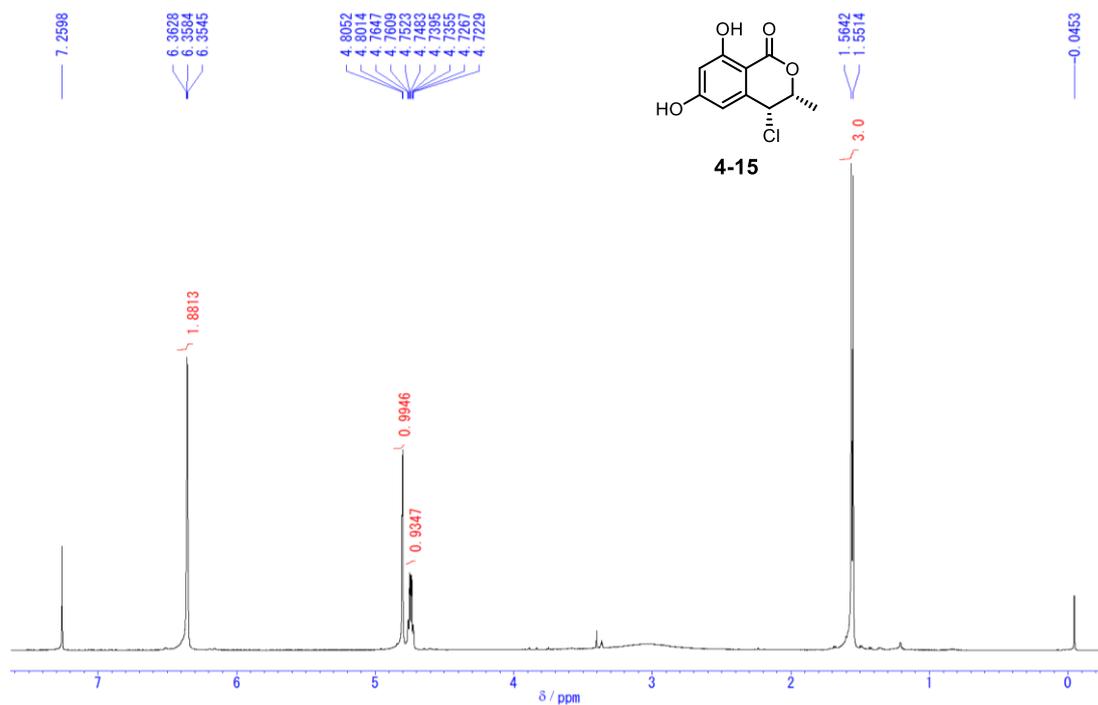
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-14** (in pyridine-d<sub>5</sub>, 125 MHz)



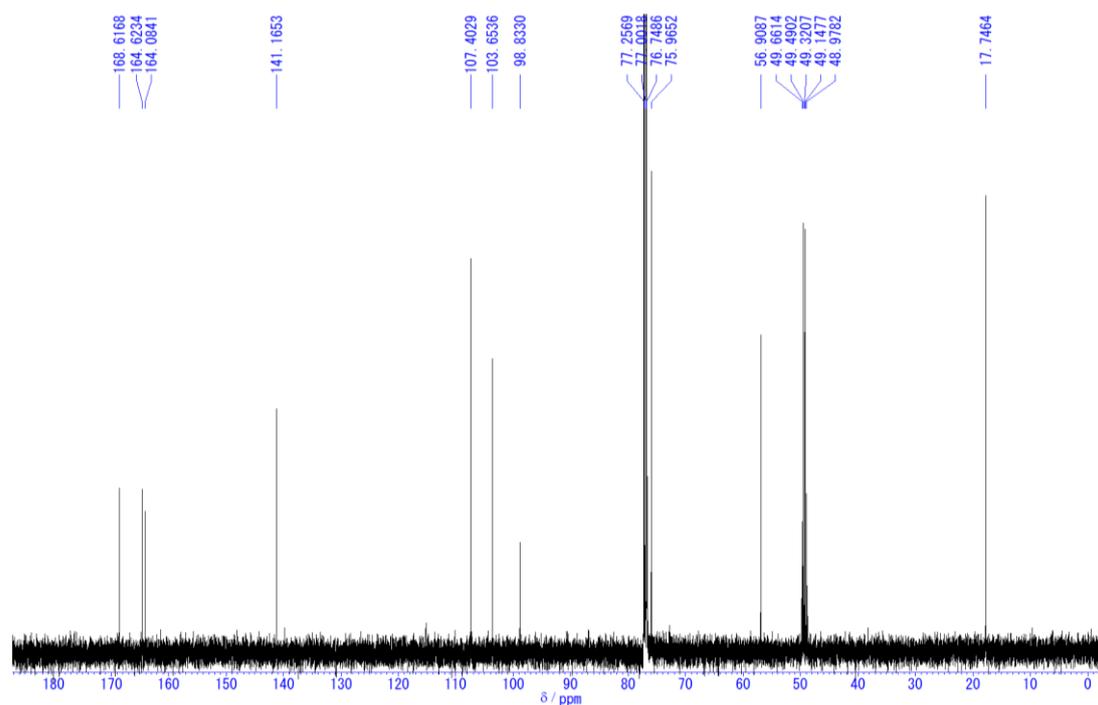
COSY spectra of **4-14** (in pyridine- $d_5$ )



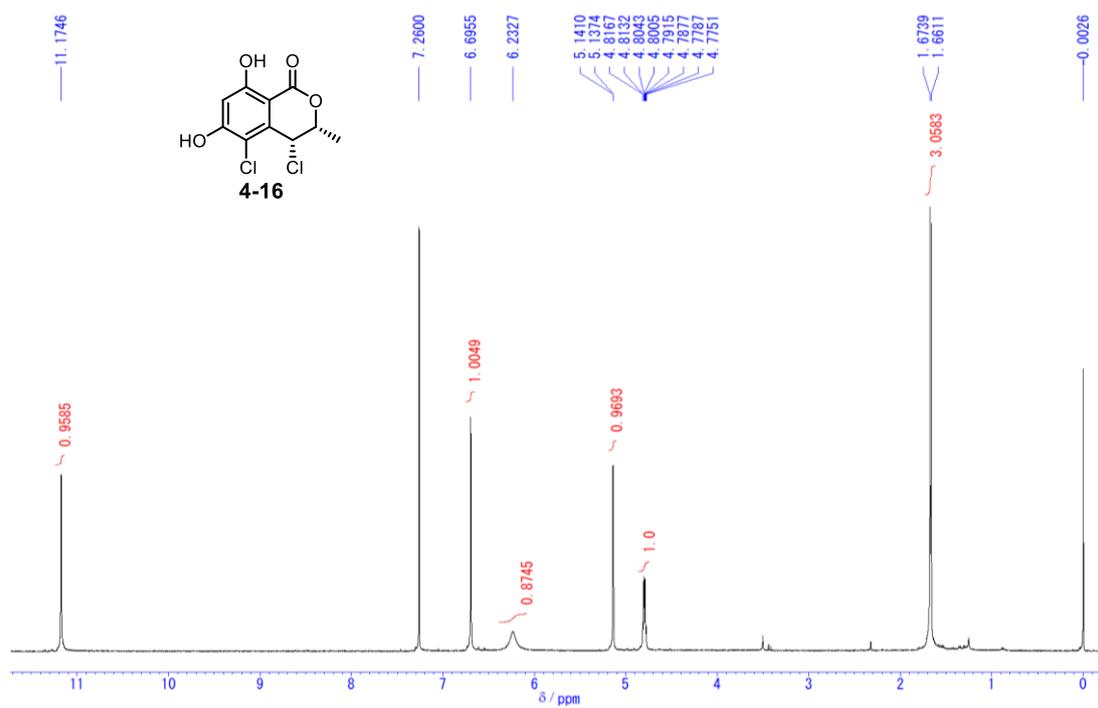
HMBC spectra of **4-14** (in pyridine- $d_5$ )



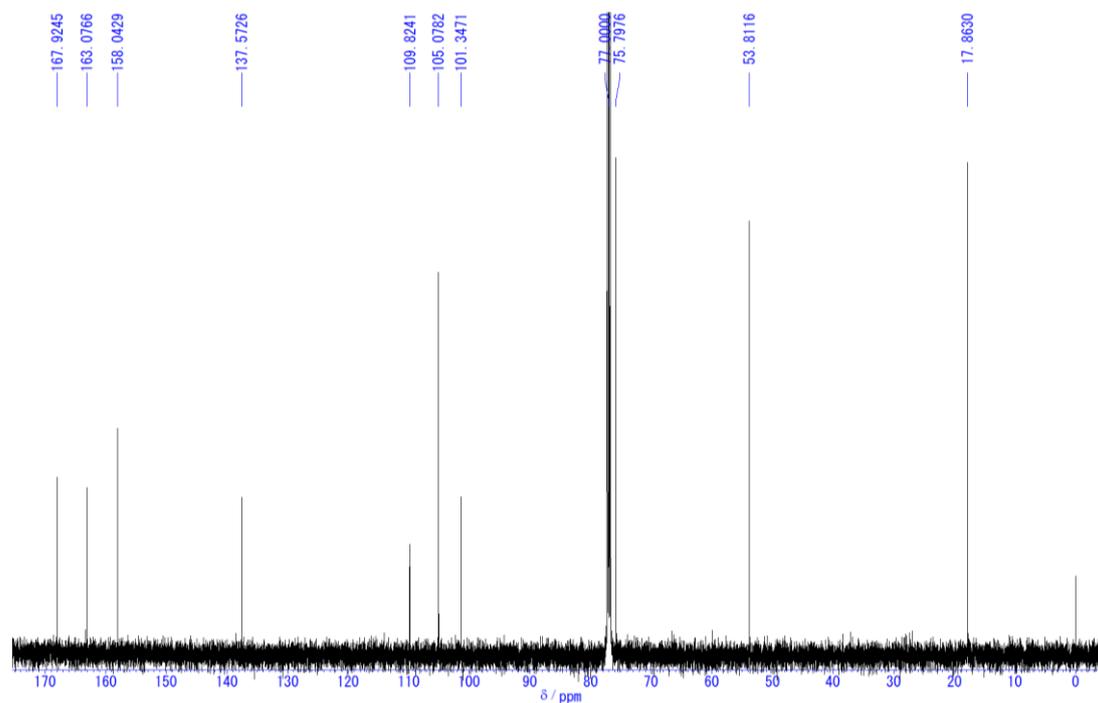
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-15** (in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD = 20, 500 MHz)



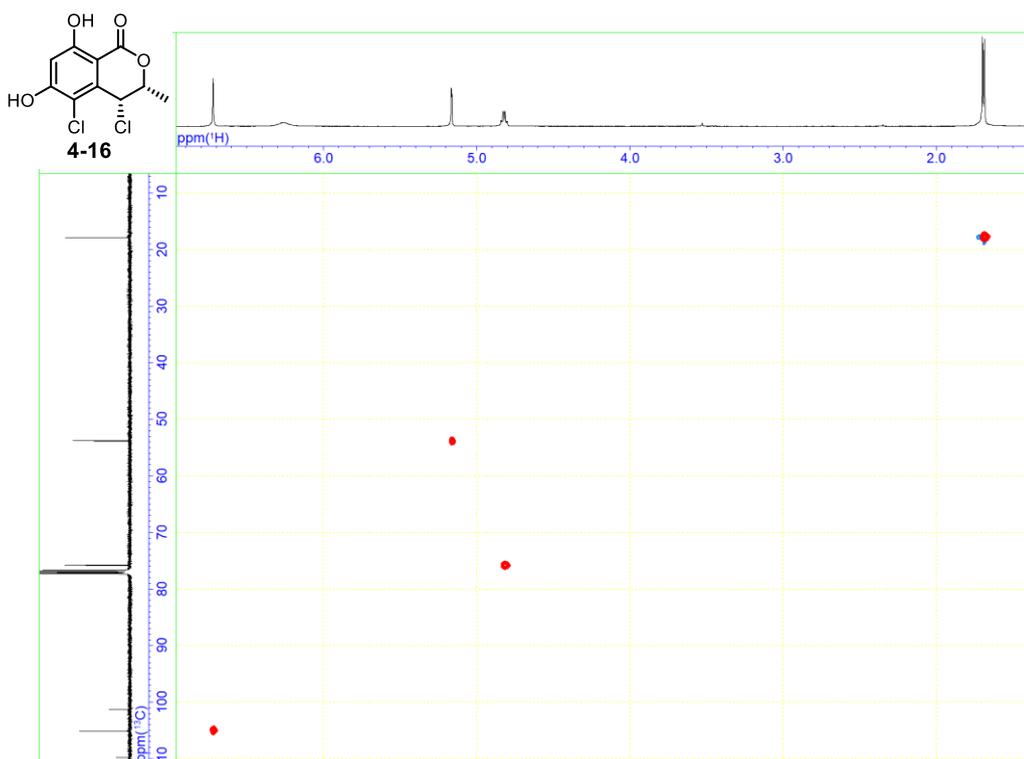
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-15** (in CDCl<sub>3</sub>/CD<sub>3</sub>OD = 20, 125 MHz)



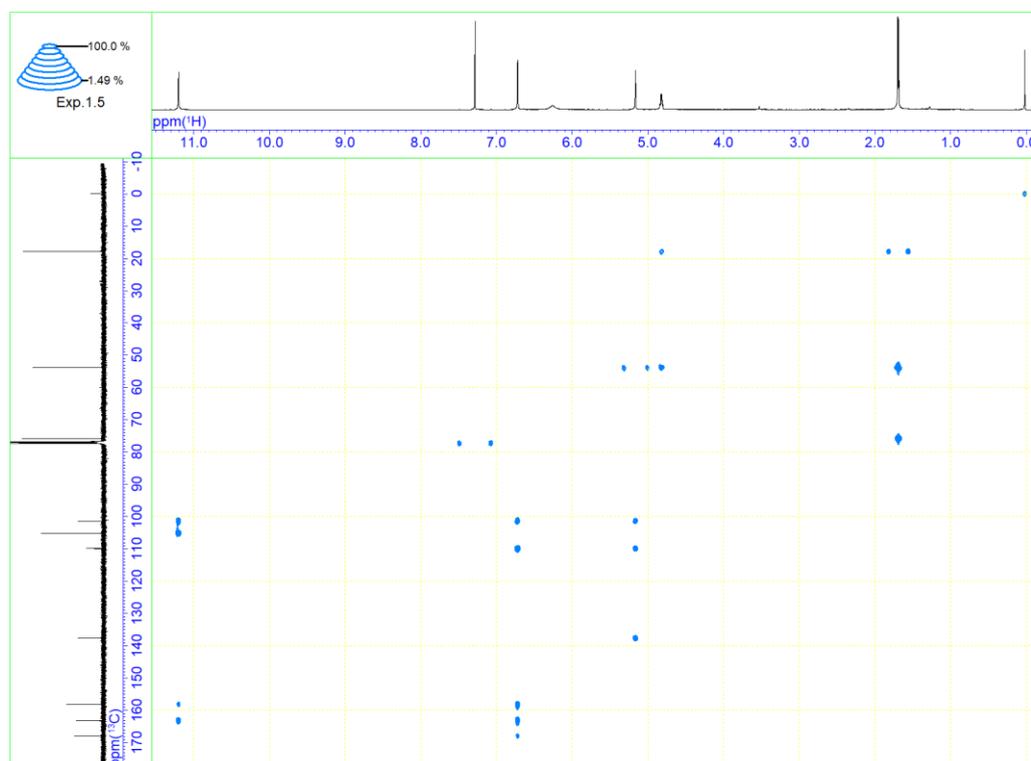
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-16** (in CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



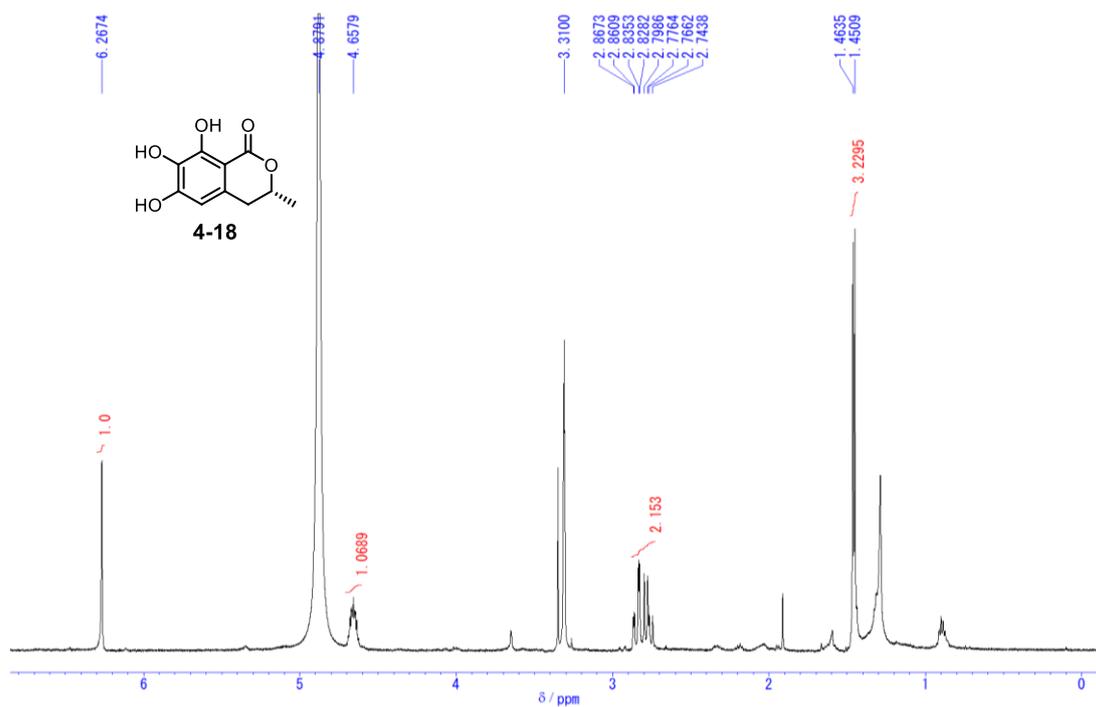
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-16** (in CDCl<sub>3</sub>, 125 MHz)



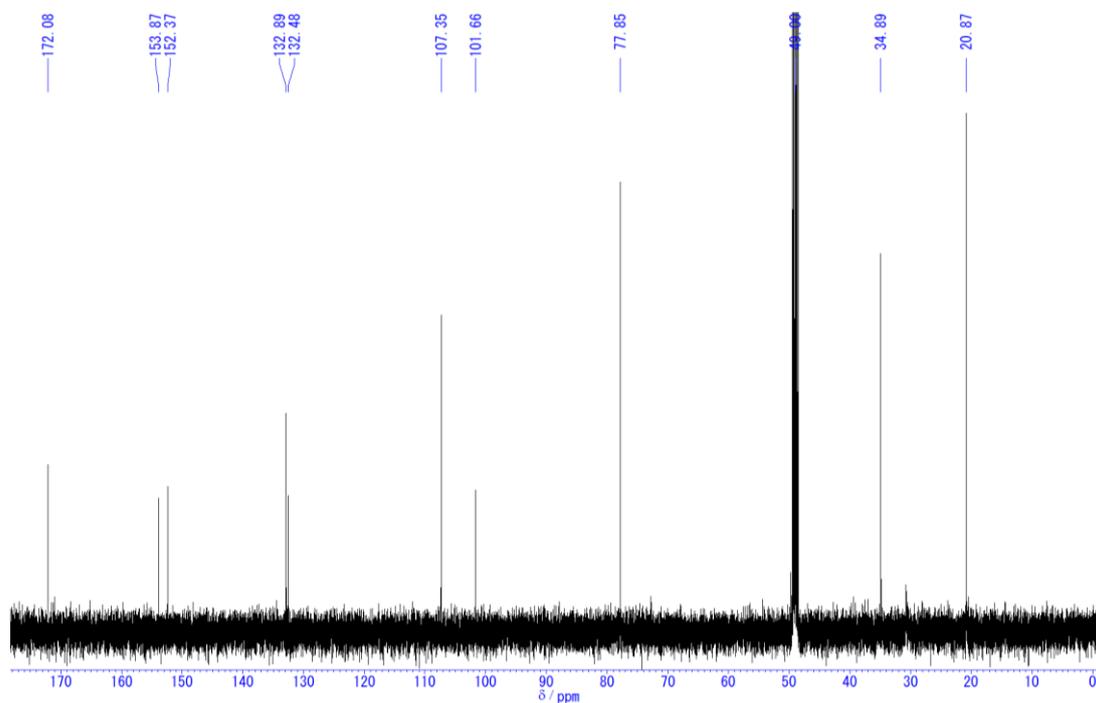
HSQC spectra of 4-16 (in CDCl<sub>3</sub>)



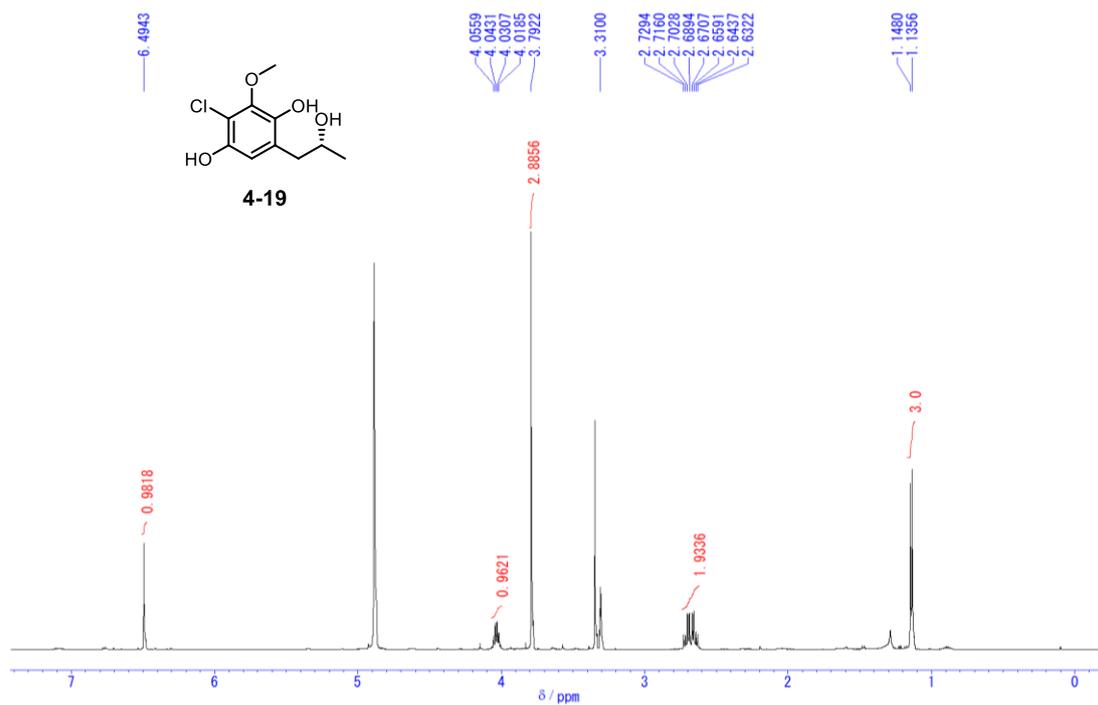
HMBC spectra of 4-16 (in CDCl<sub>3</sub>)



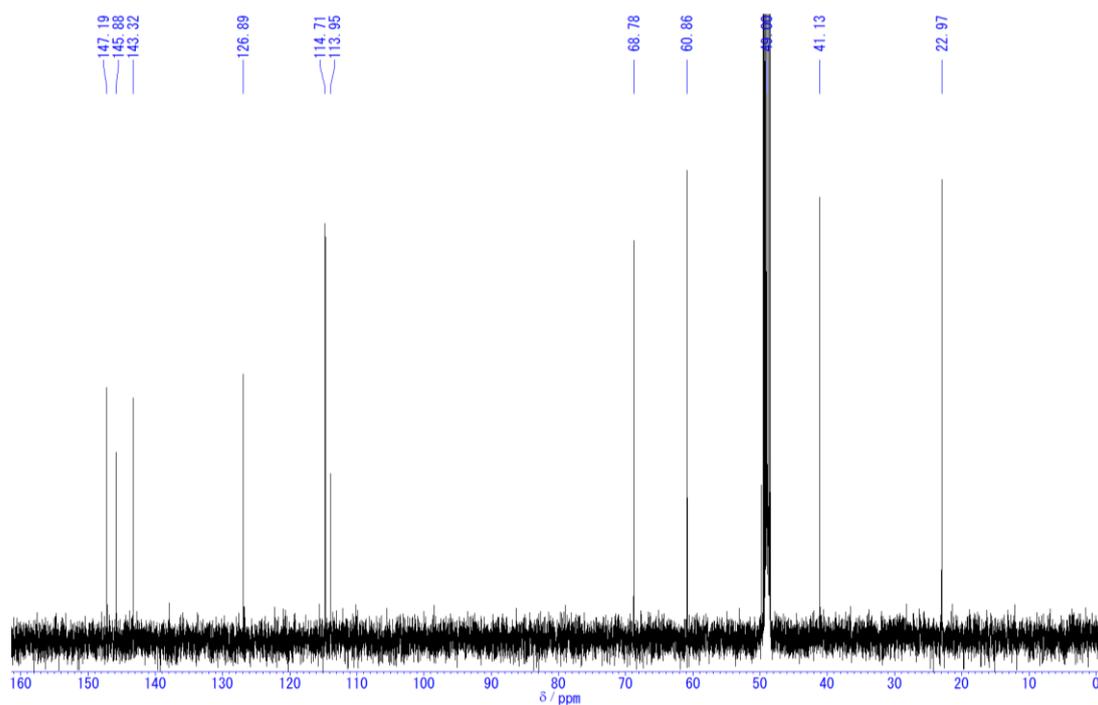
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-18** (in CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



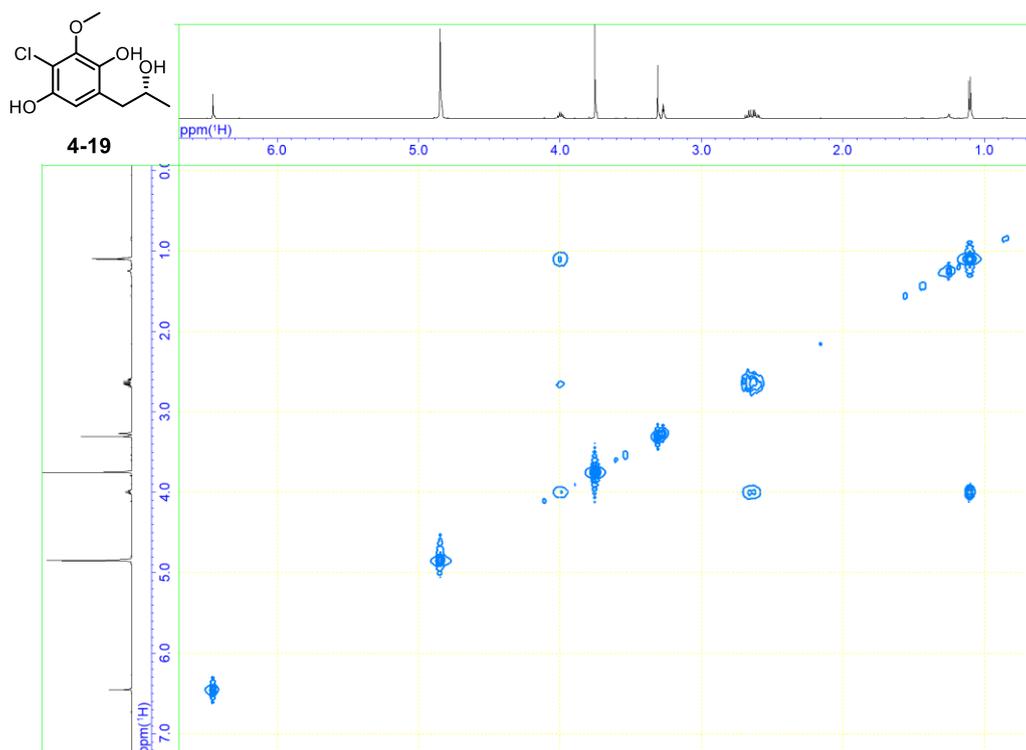
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-18** (in CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



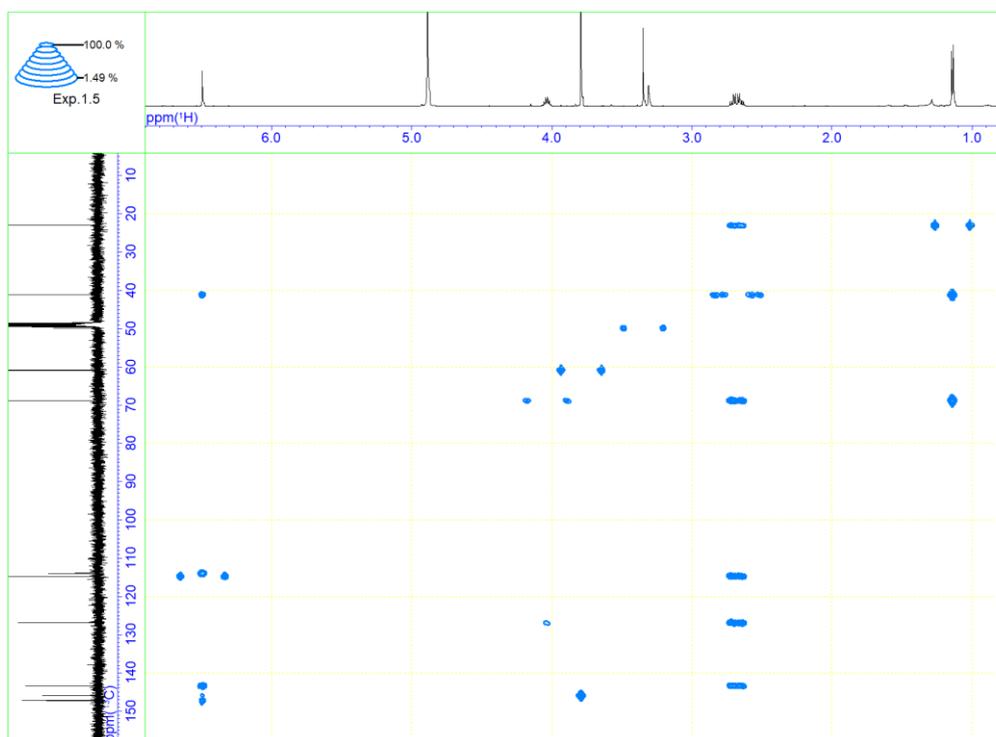
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-19** (in CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



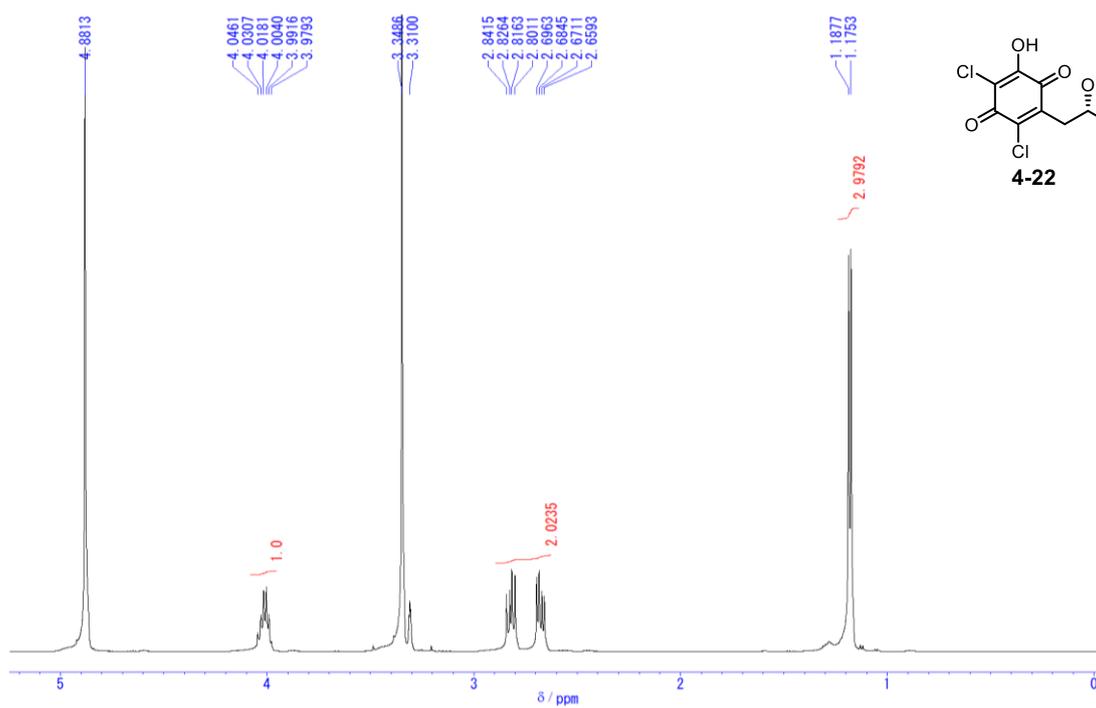
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-19** (in CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



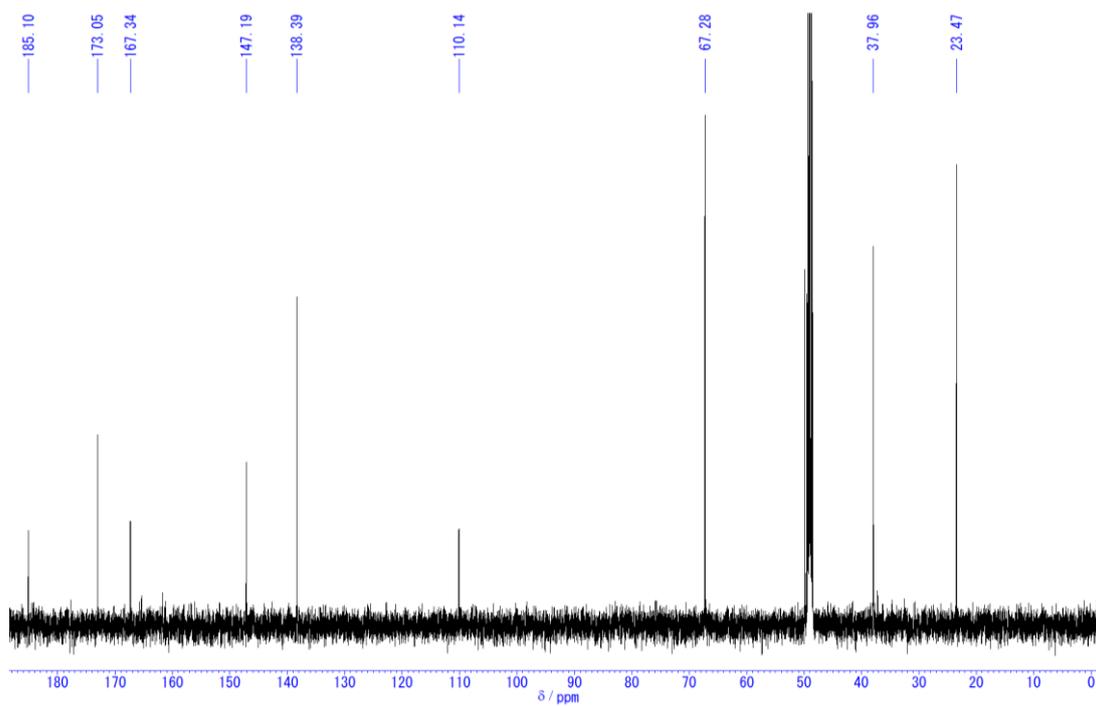
COSY spectra of **4-19** (in CD<sub>3</sub>OD)



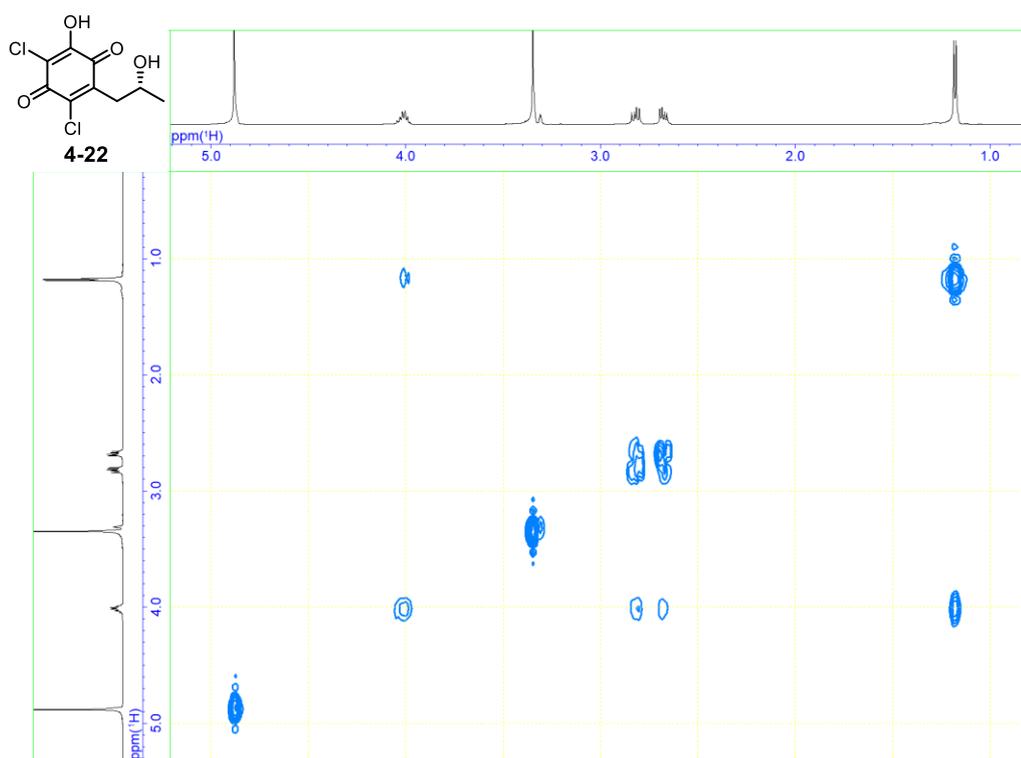
HMBC spectra of **4-19** (in CD<sub>3</sub>OD)



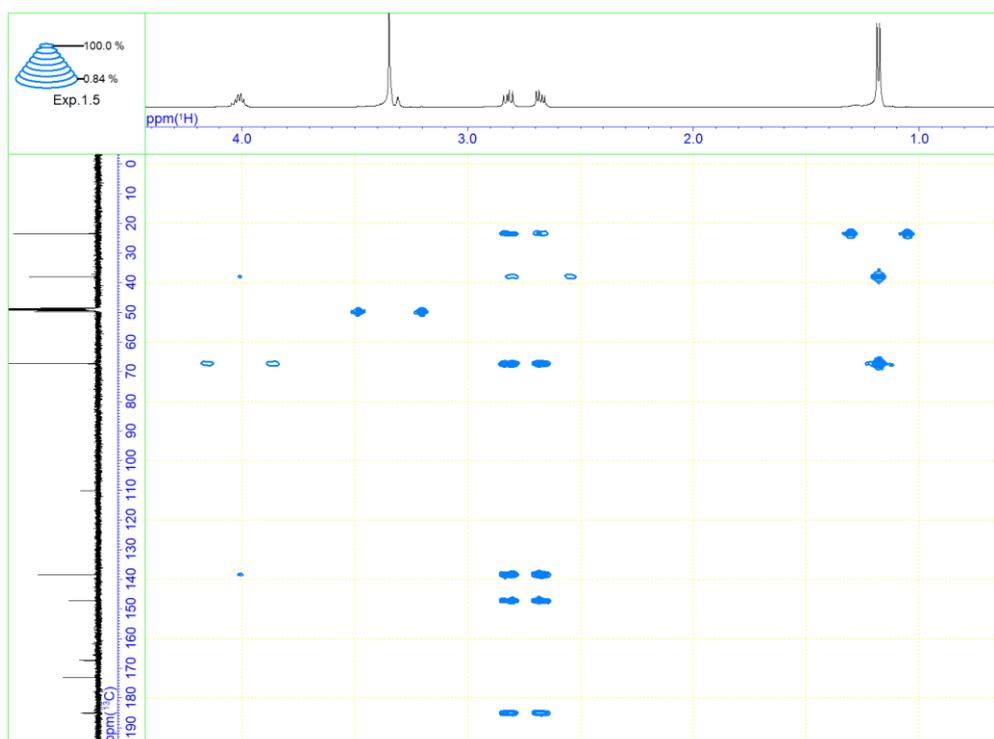
$^1\text{H-NMR}$  spectrum of **4-22** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



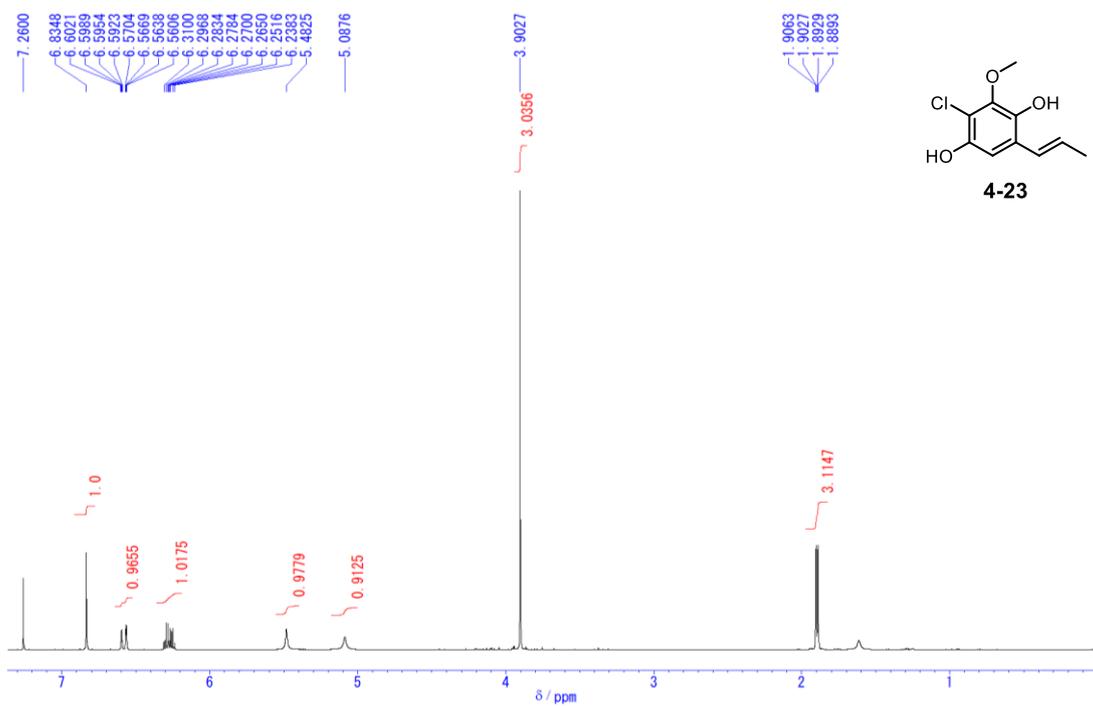
$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of **4-22** (in  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)



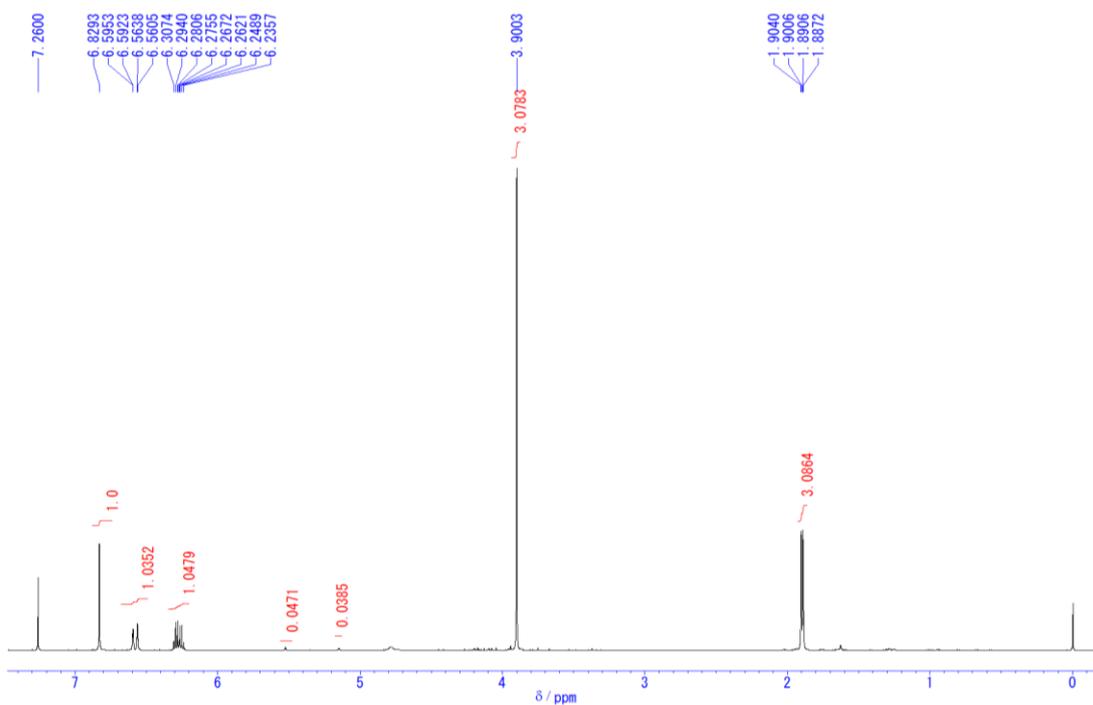
COSY spectra of **4-22** (in CD<sub>3</sub>OD)



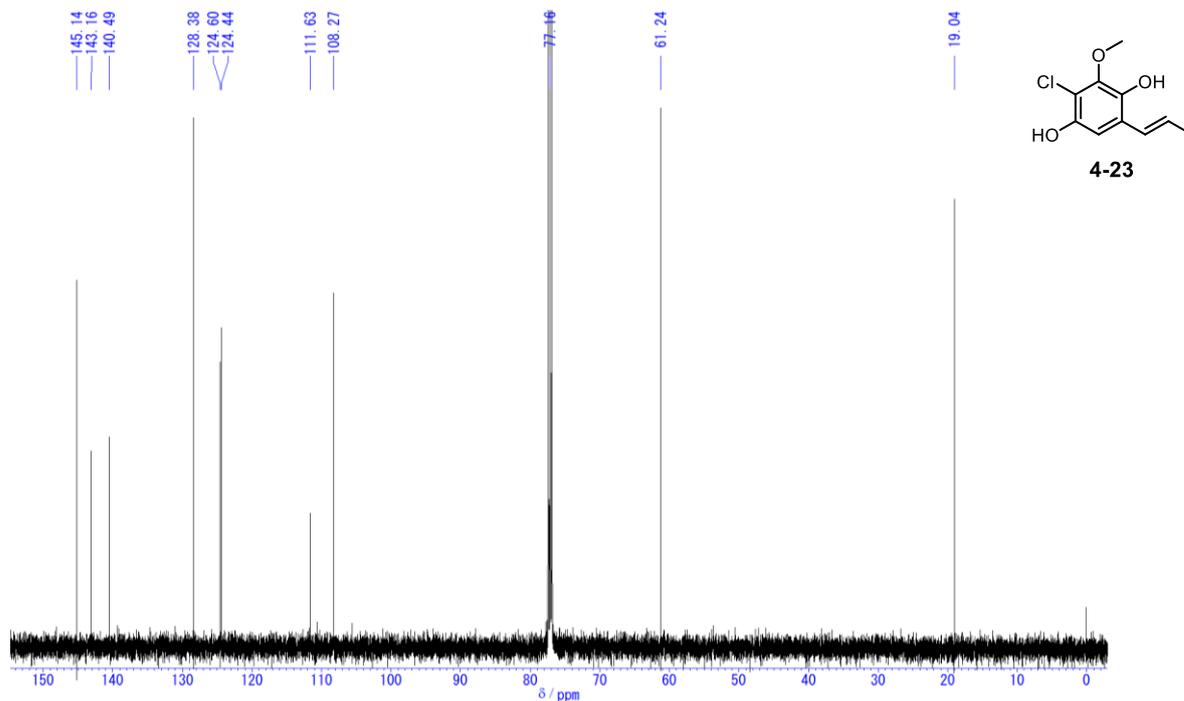
HMBC spectra of **4-22** (in CD<sub>3</sub>OD)



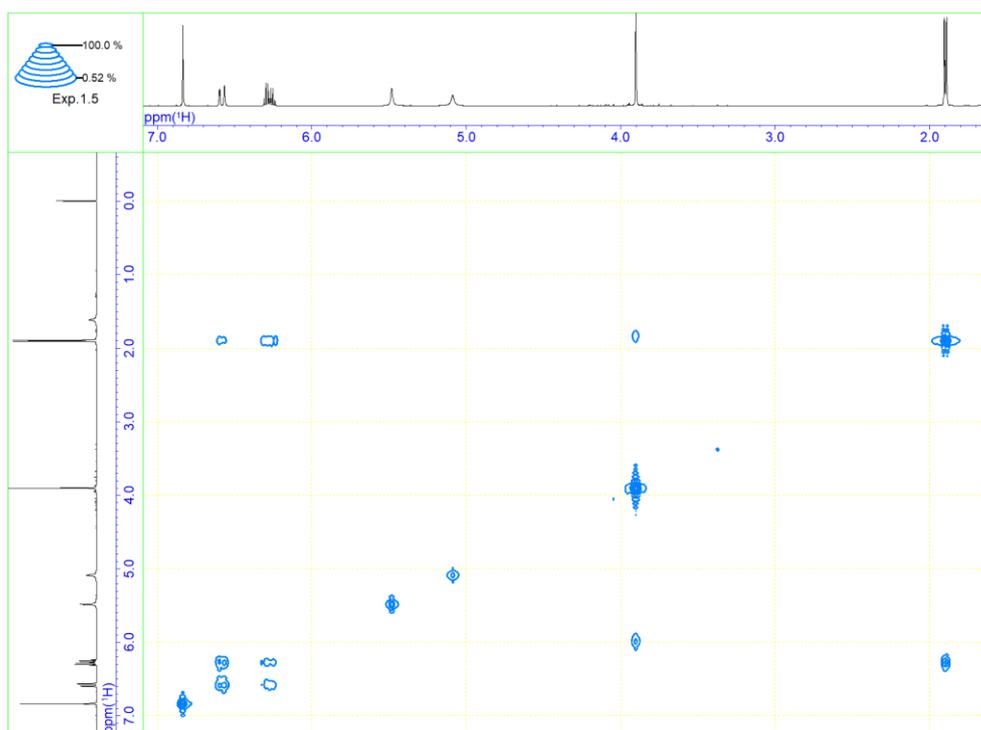
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-23** (in CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)



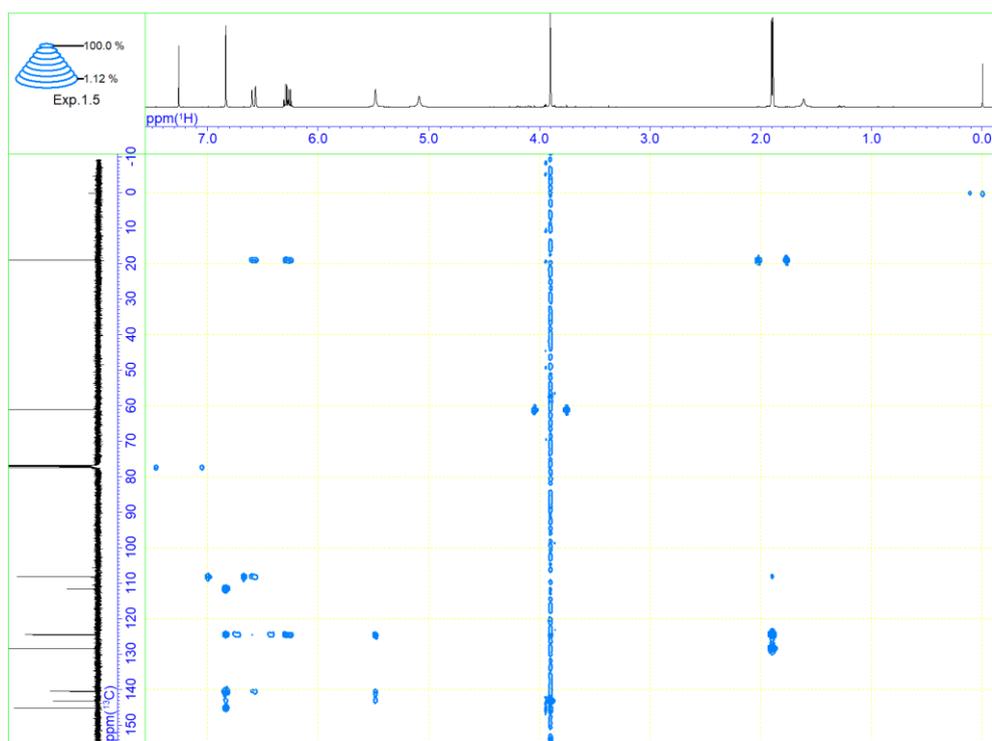
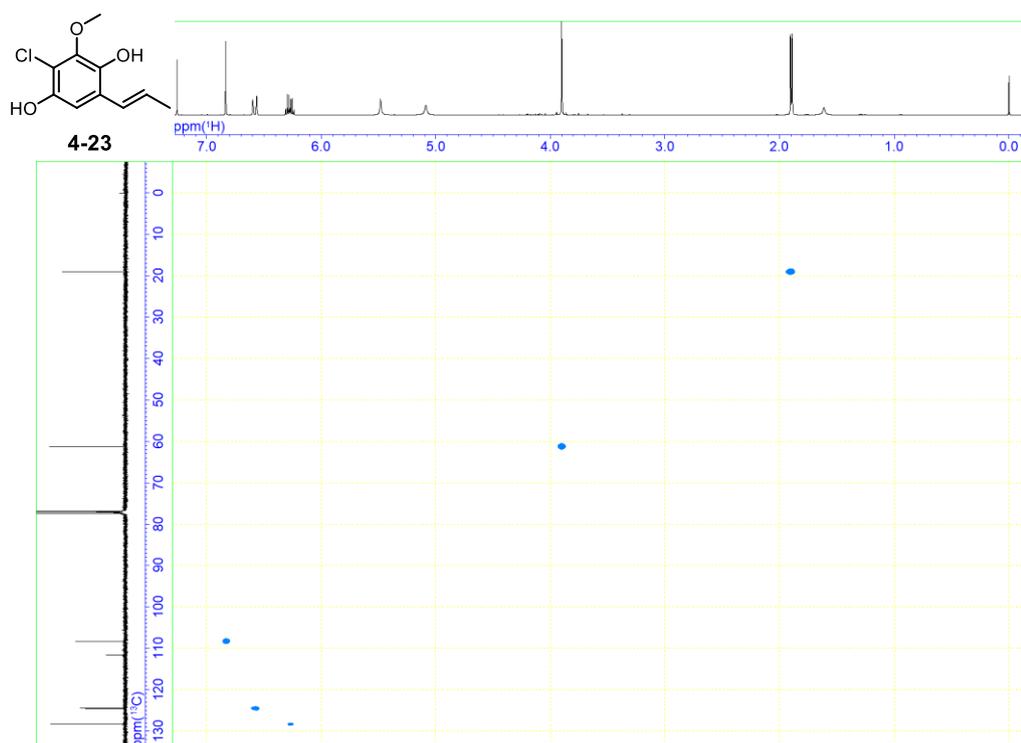
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-23** (in CDCl<sub>3</sub>, added D<sub>2</sub>O, 500 MHz)

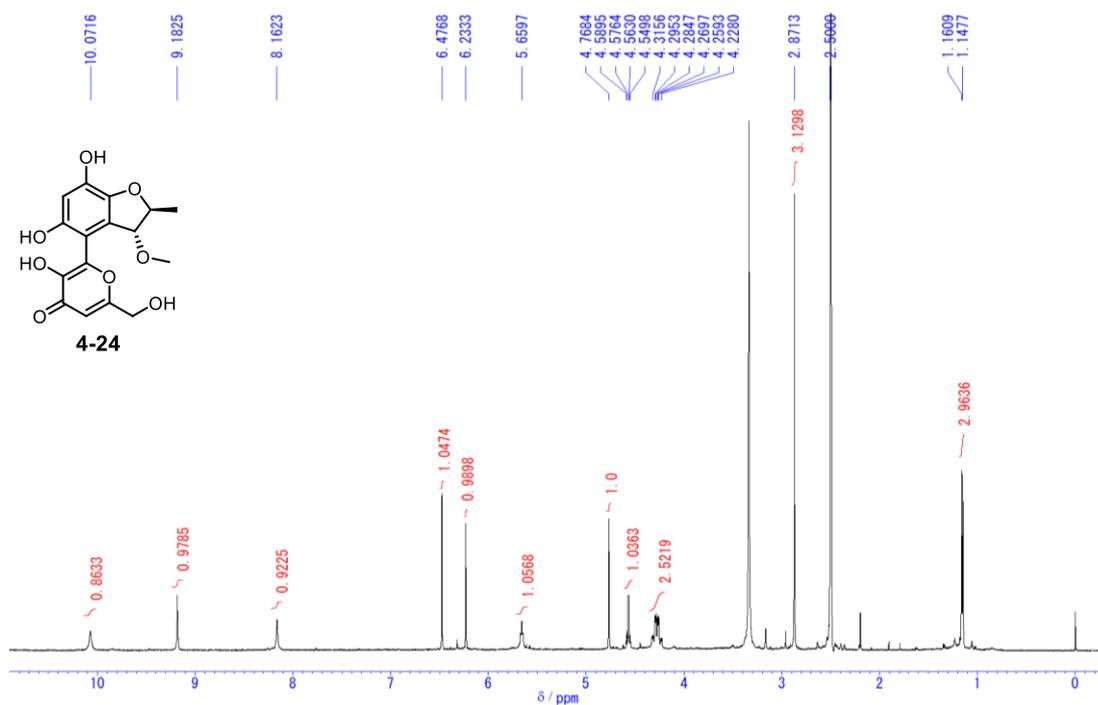


$^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of **4-23** (in  $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)

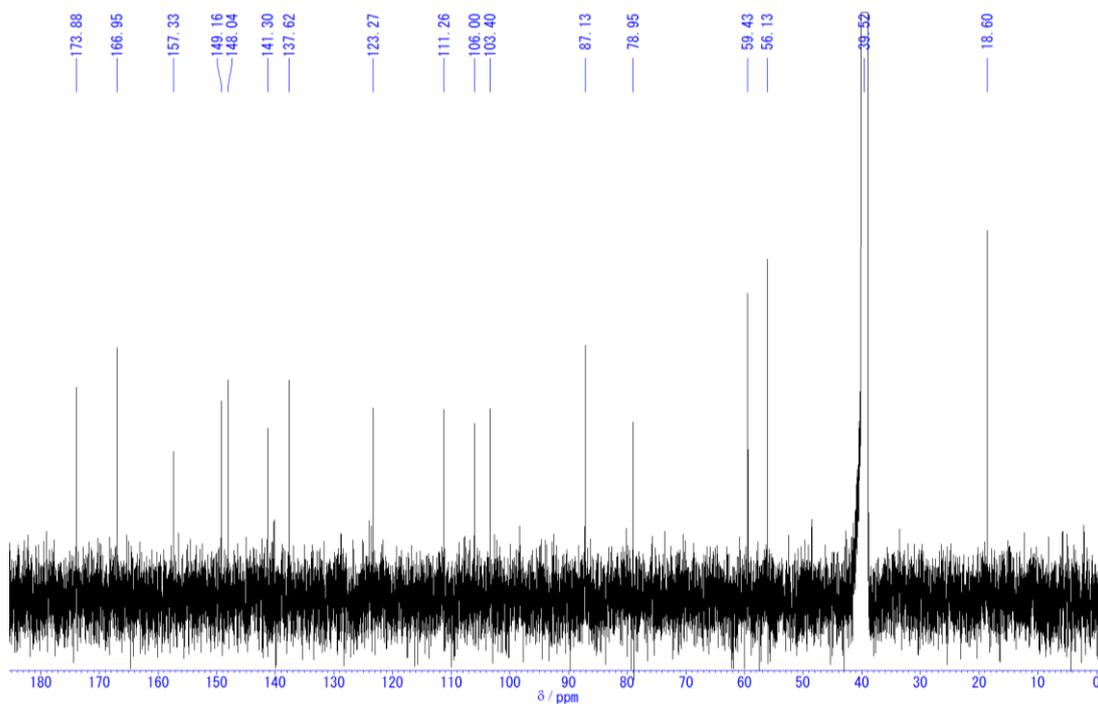


COSY spectra of **4-23** (in  $\text{CDCl}_3$ )

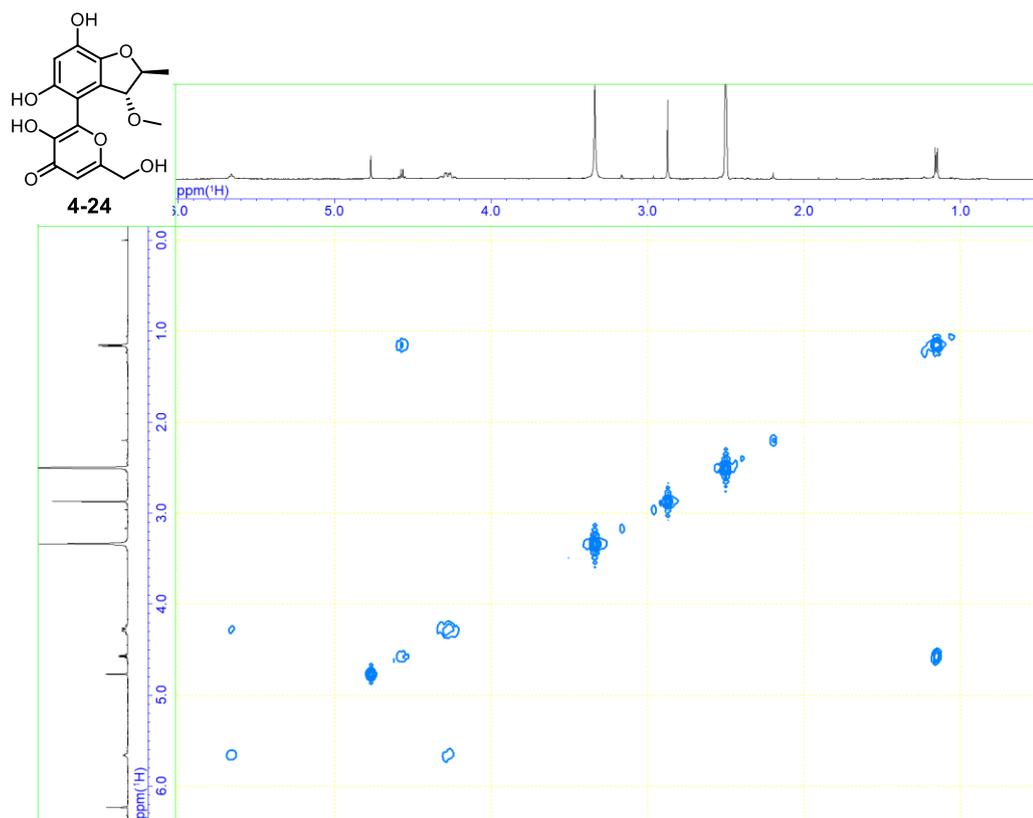




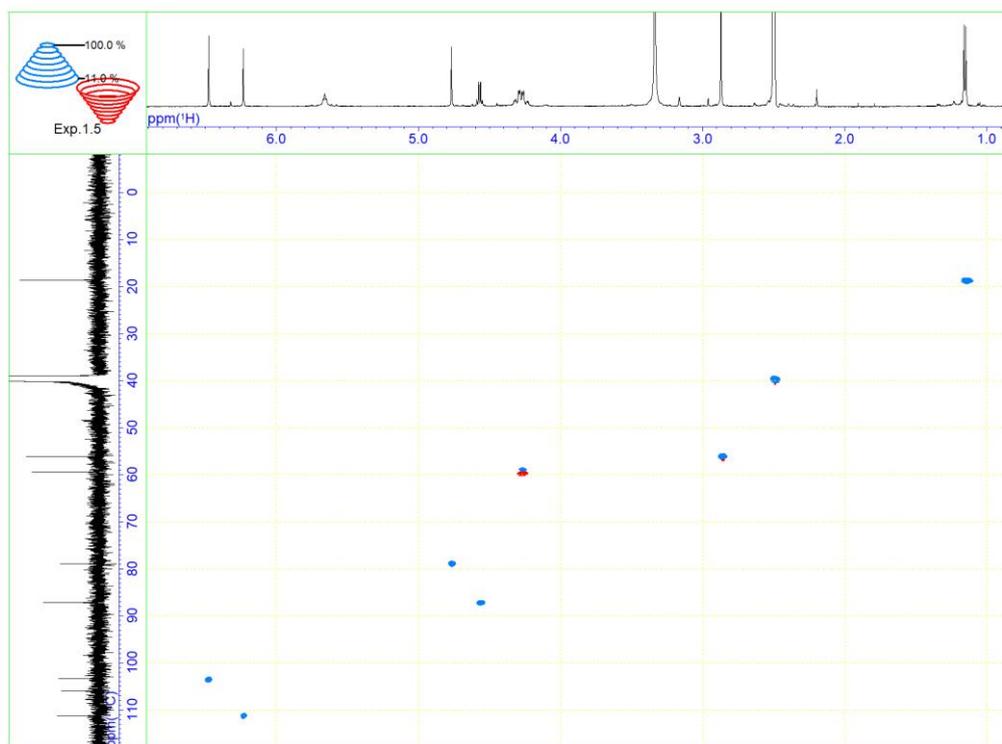
$^1\text{H-NMR}$  spectrum of **4-24** (in  $\text{DMSO-d}_6$ , 500 MHz)



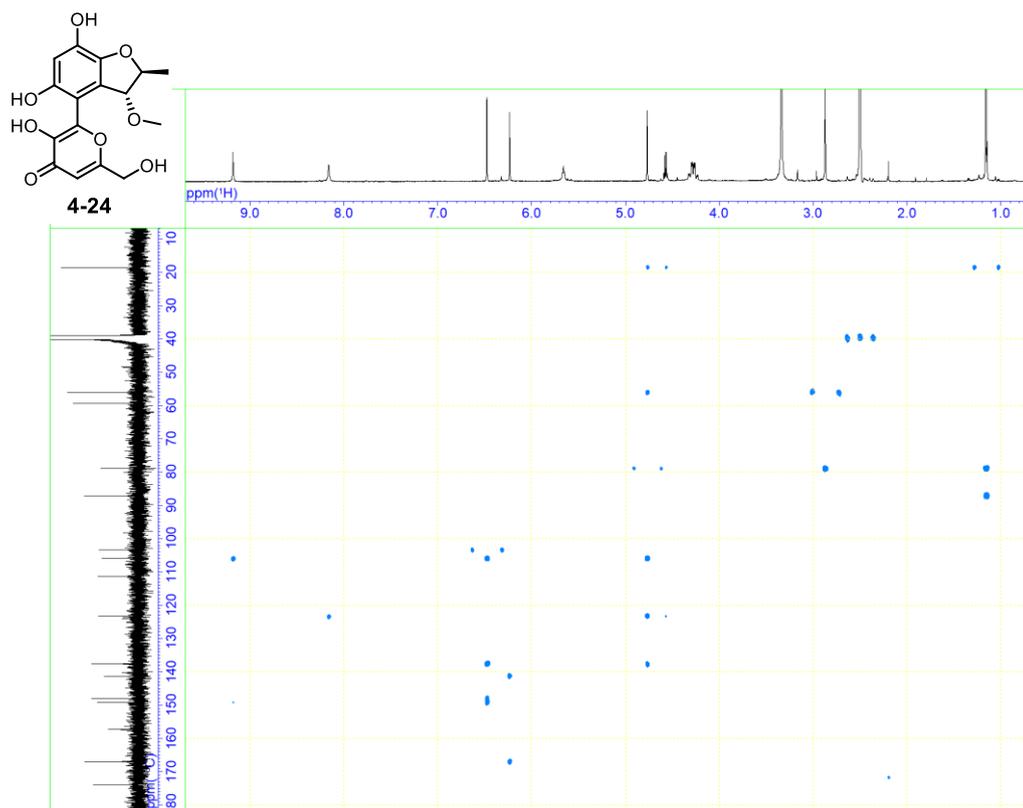
$^{13}\text{C-NMR}$  spectrum of **4-24** (in  $\text{DMSO-d}_6$ , 125 MHz)



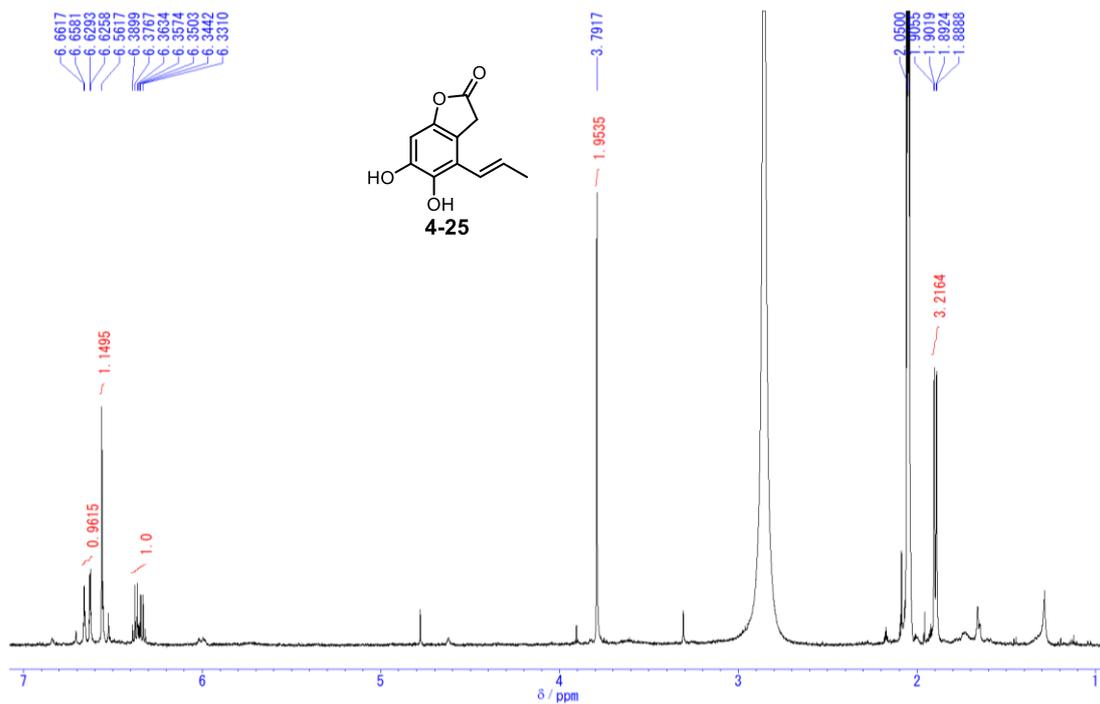
COSY spectra of 4-24 (in DMSO-d<sub>6</sub>)



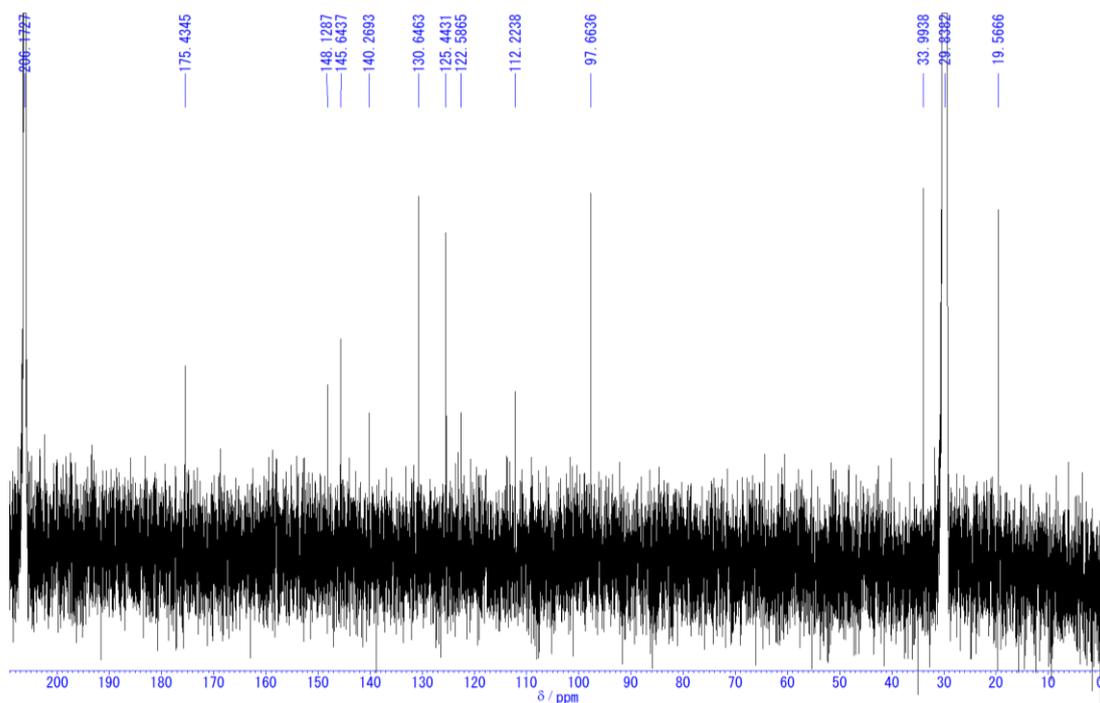
edHSQC spectra of 4-24 (in DMSO-d<sub>6</sub>)



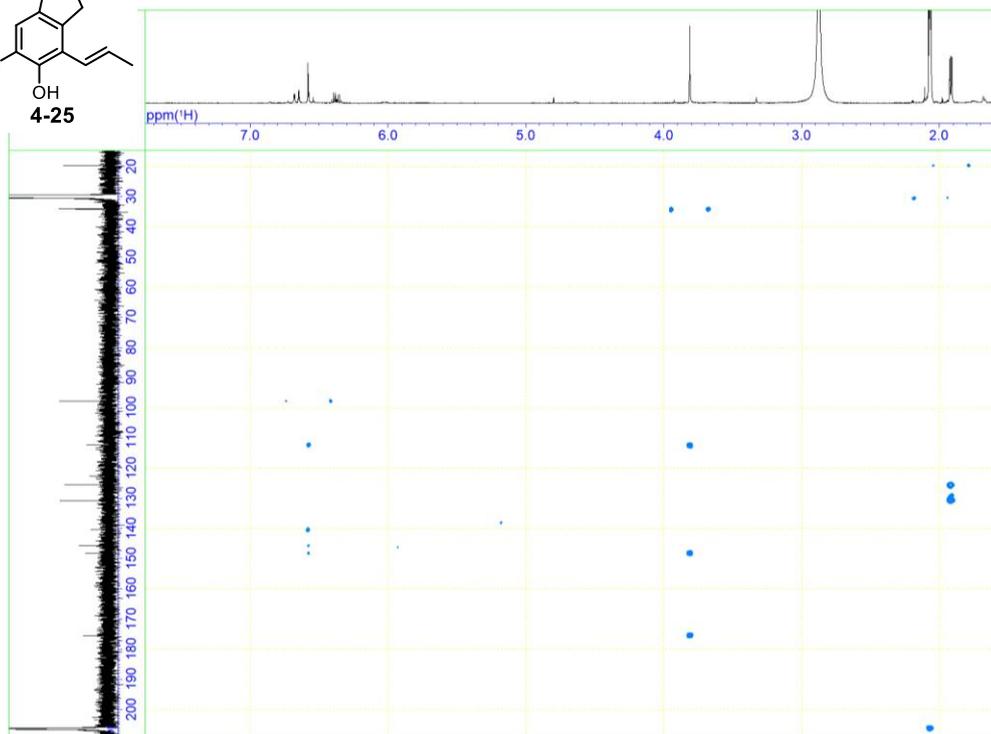
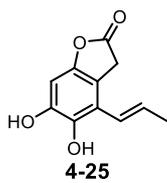
HMBC spectra of **4-24** (in DMSO-d<sub>6</sub>)



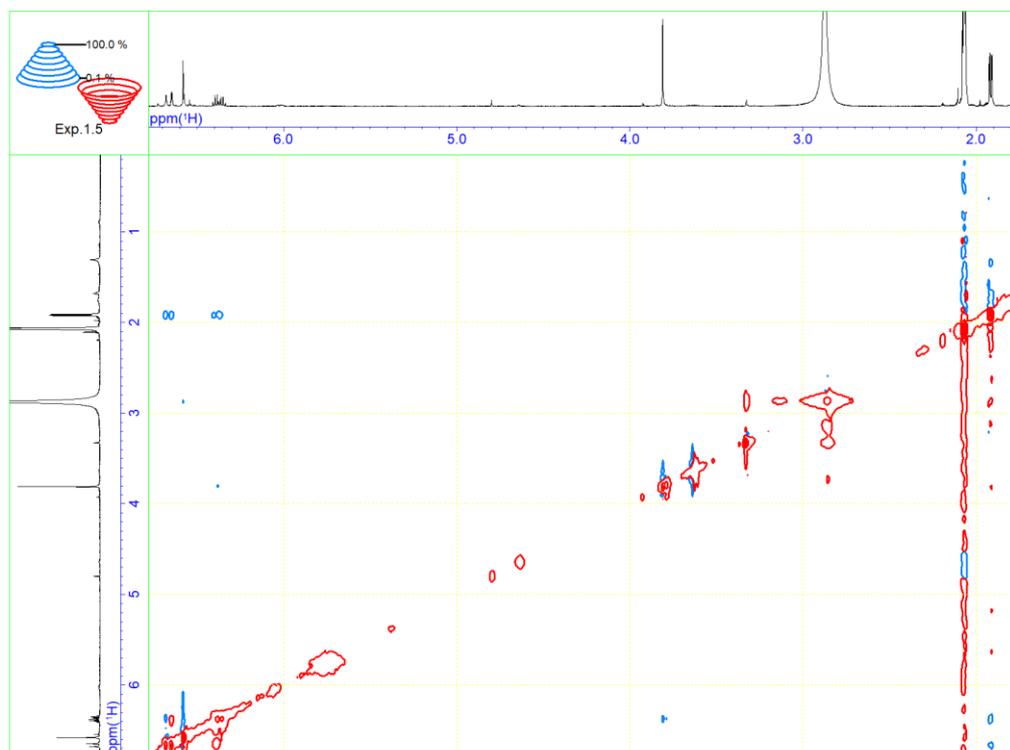
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **4-25** (in acetone-d<sub>6</sub>, 500 MHz)



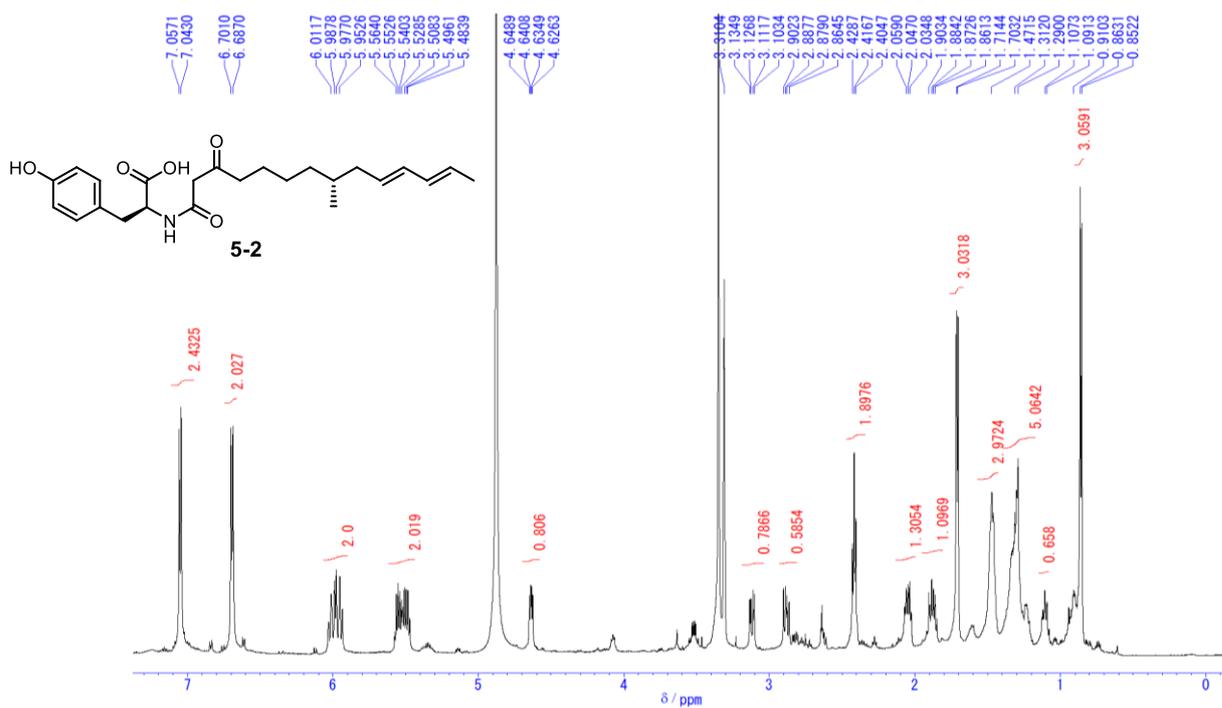
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **4-25** (in acetone-d<sub>6</sub>, 500 MHz)



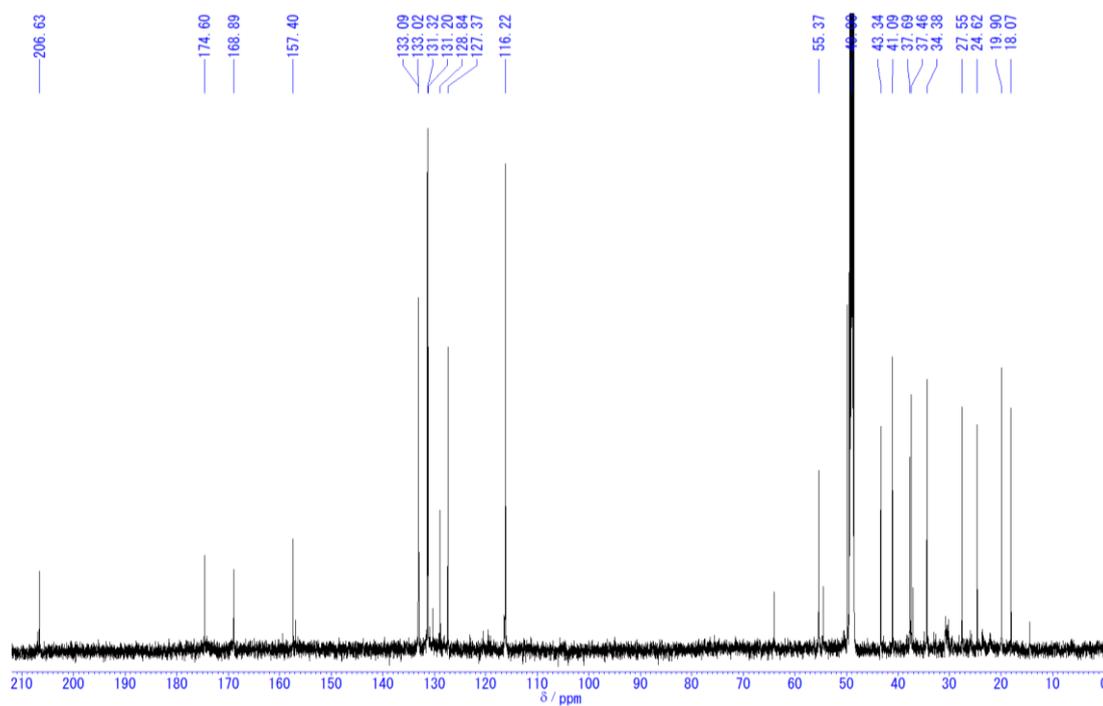
HMBC spectra of **4-25** (in acetone-d<sub>6</sub>)



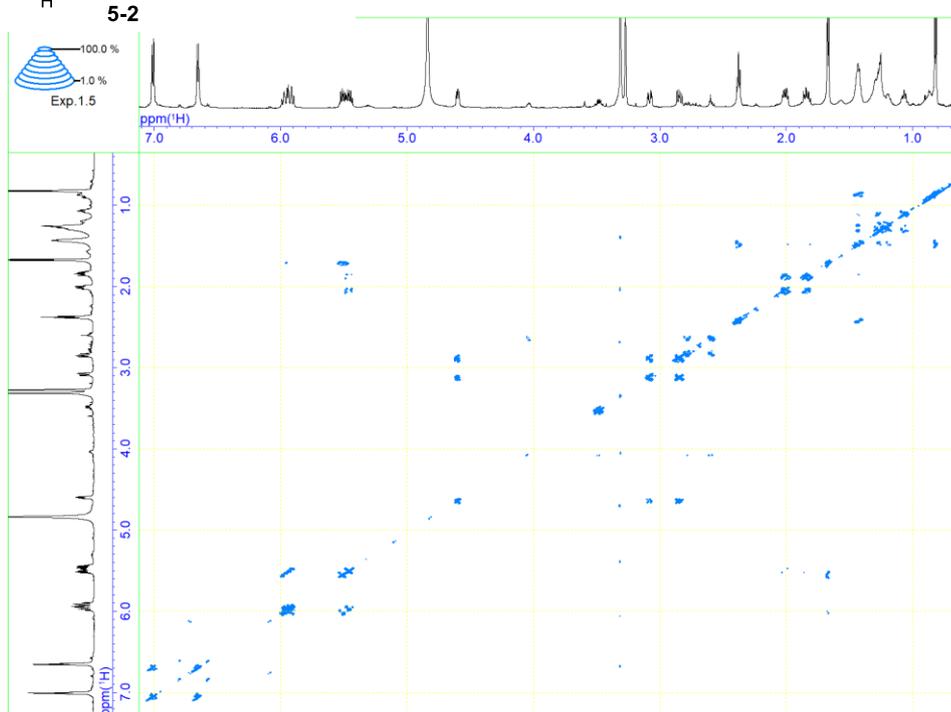
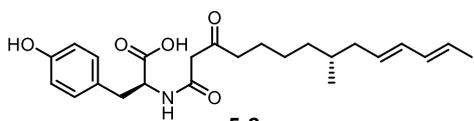
NOESY spectra of **4-25** (in acetone-d<sub>6</sub>)



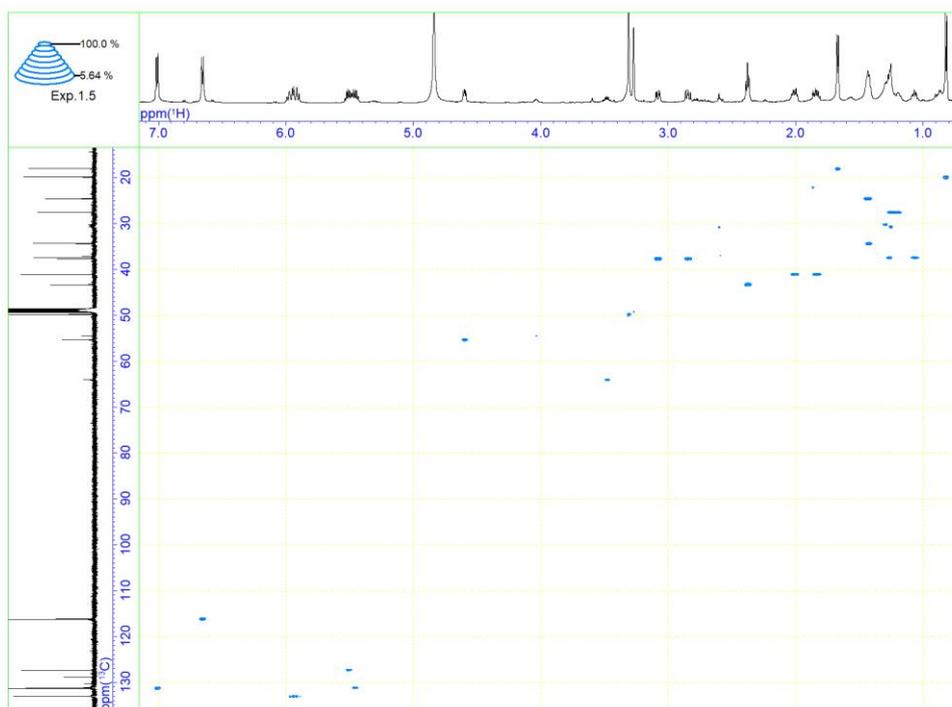
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **5-2** (in CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



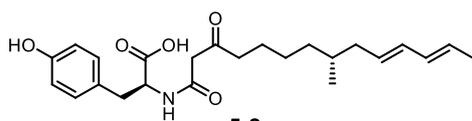
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **5-2** (in CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



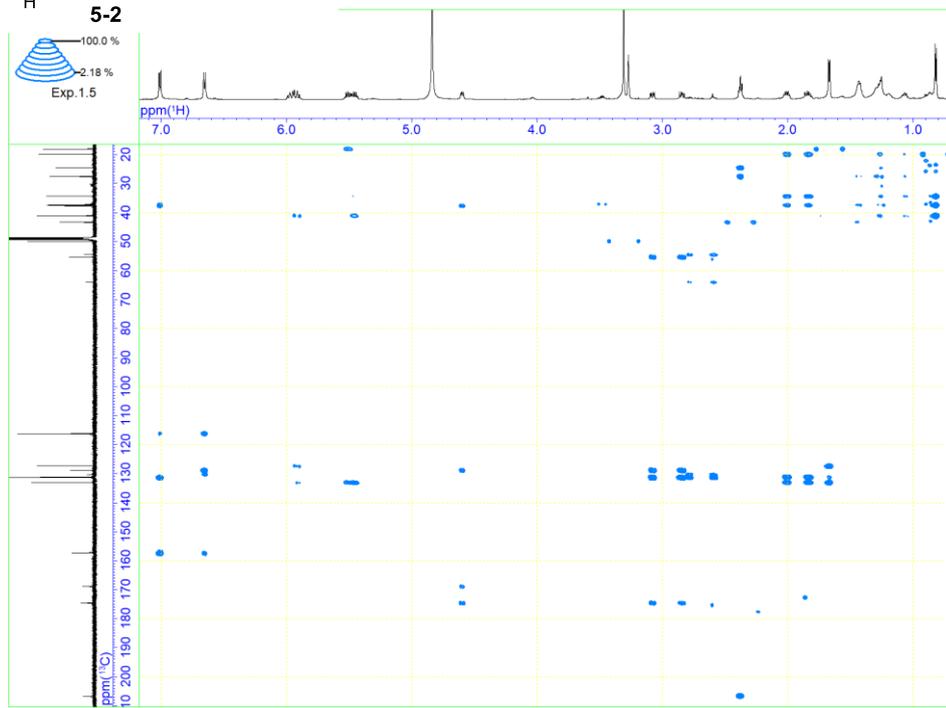
COSY spectra of **5-2** (in CD<sub>3</sub>OD)



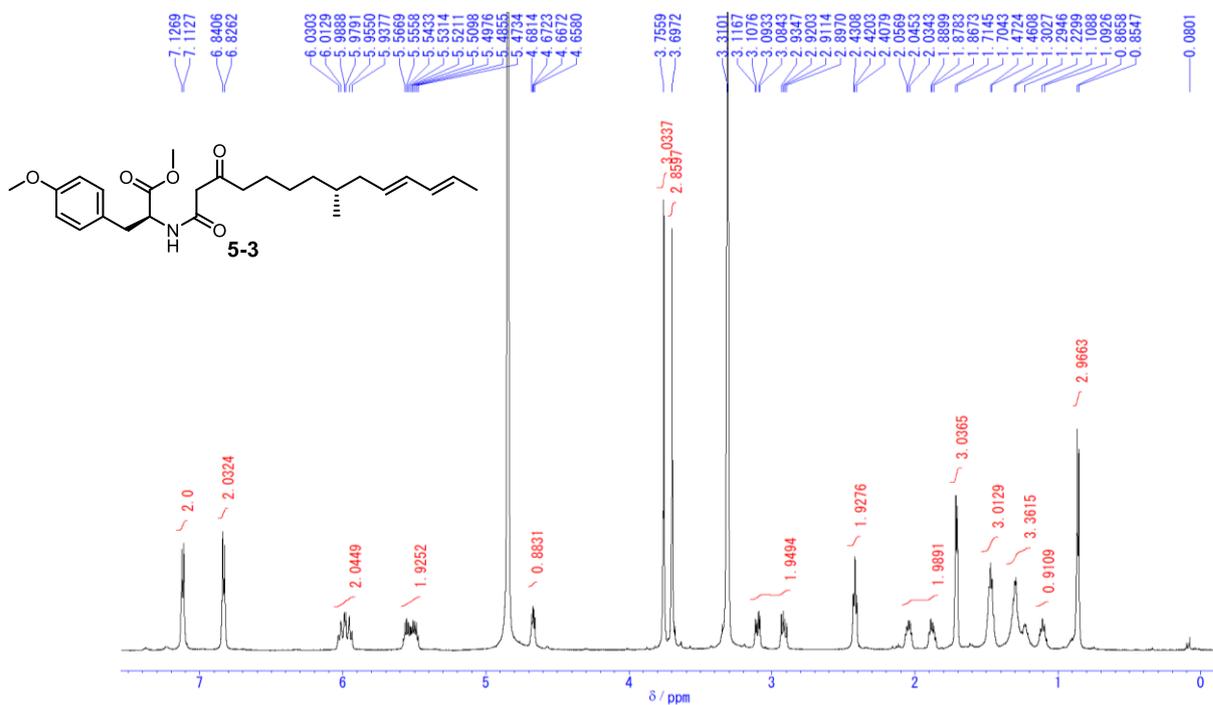
HSQC spectra of **5-2** (in CD<sub>3</sub>OD)



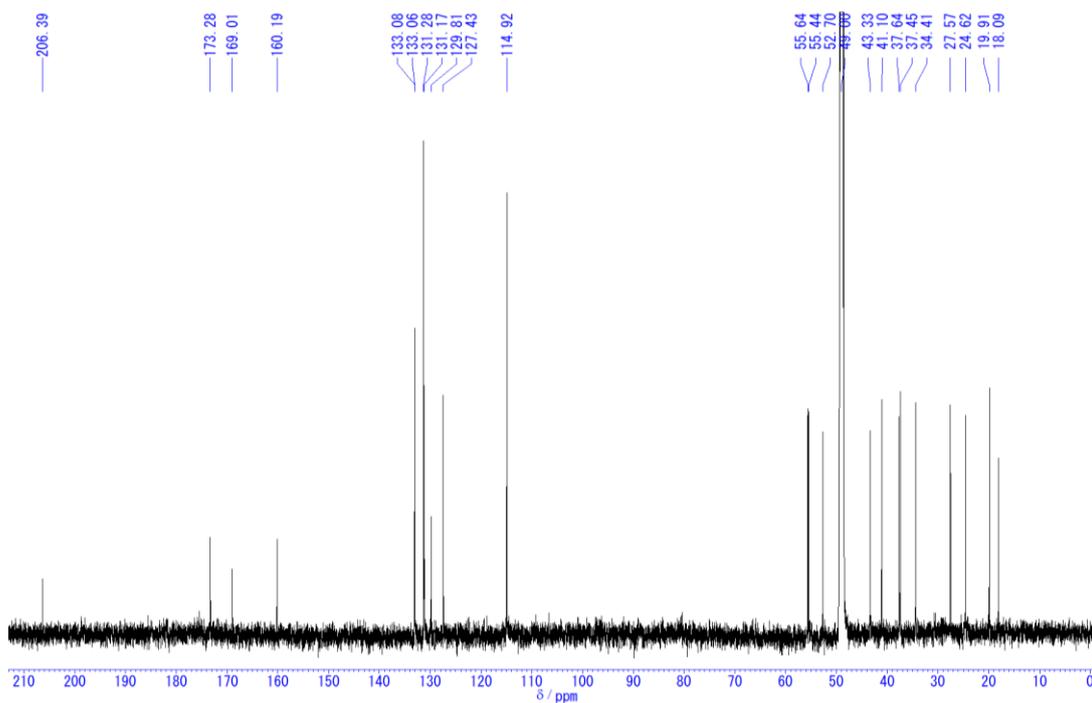
5-2



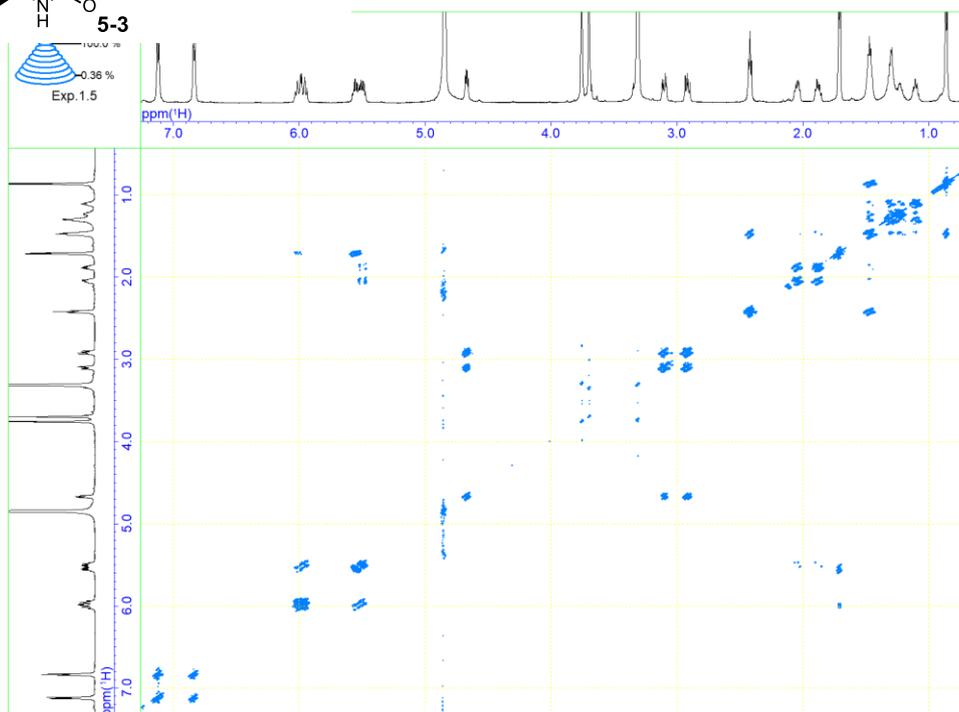
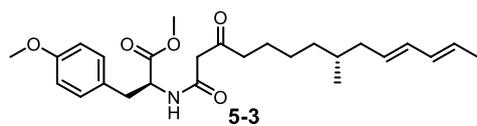
HMBC spectra of 5-2 (in CD<sub>3</sub>OD)



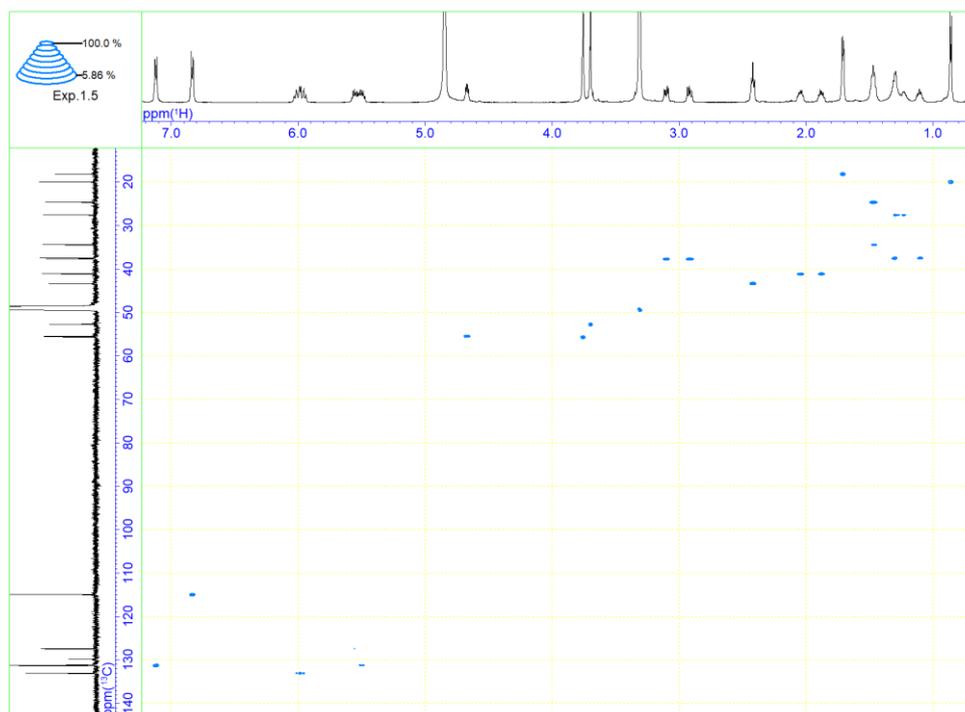
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **5-3** (in CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)



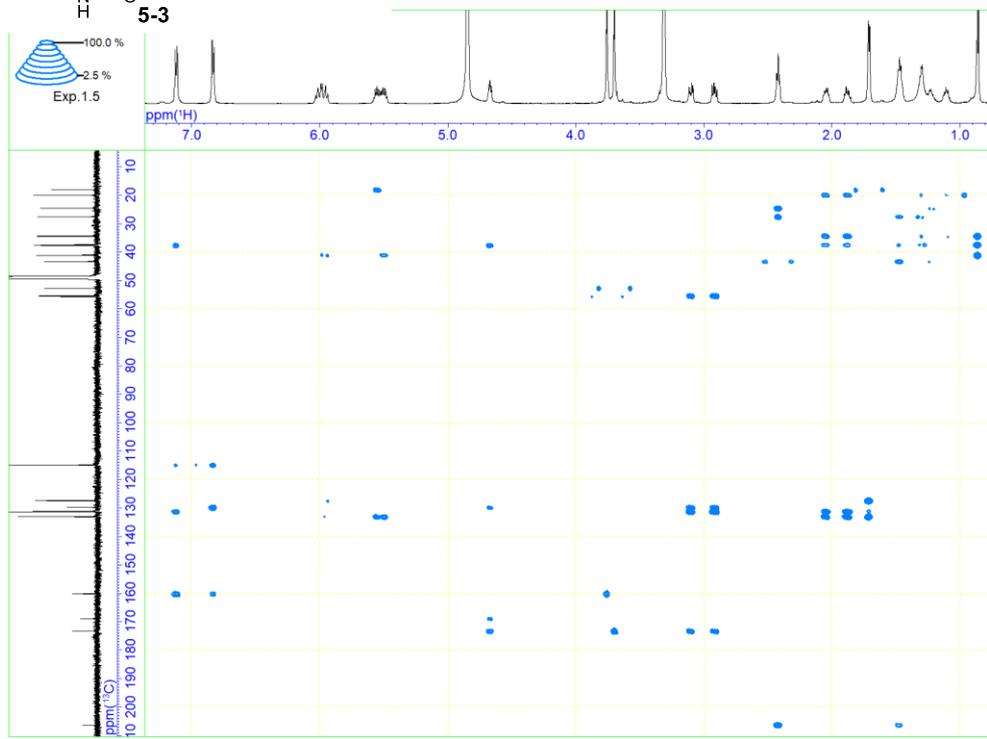
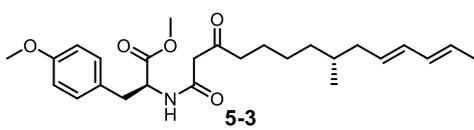
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **5-3** (in CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



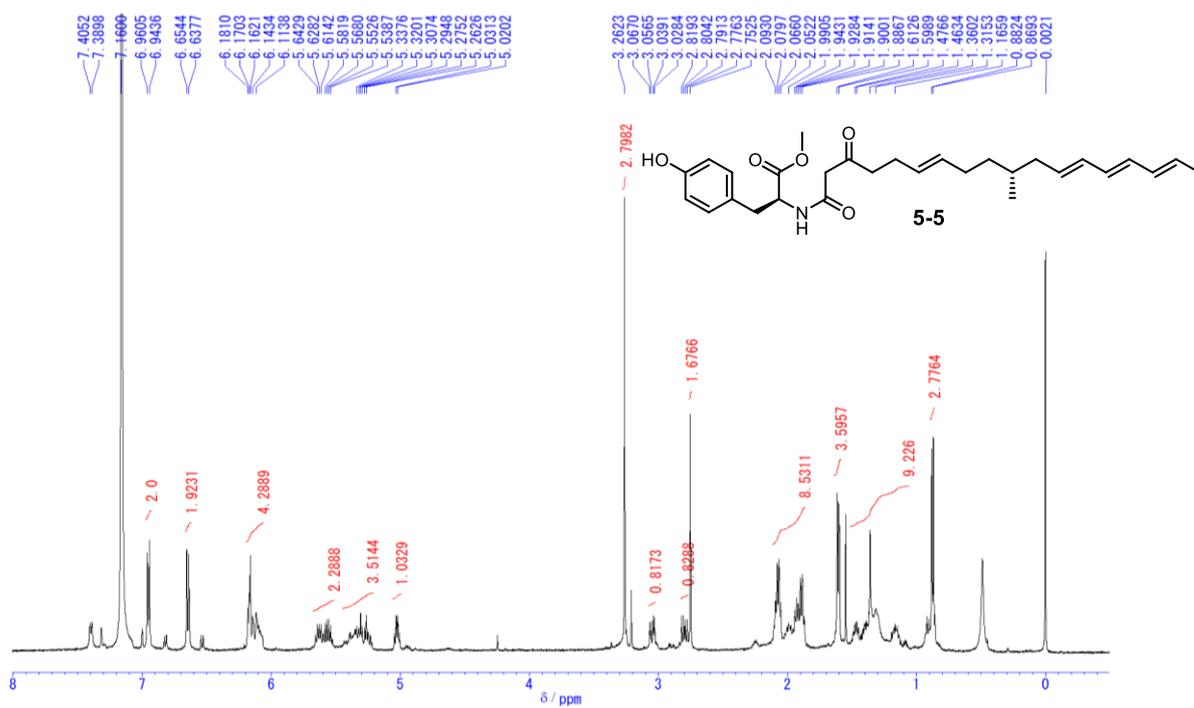
COSY spectra of **5-3** (in CD<sub>3</sub>OD)



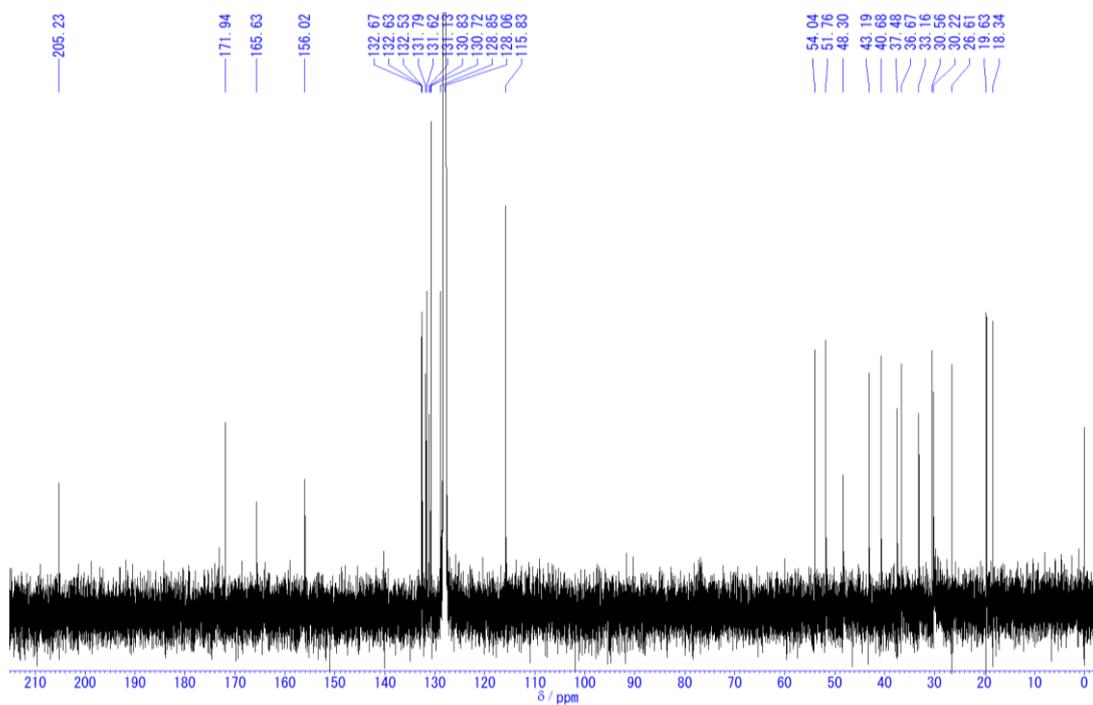
HSQC spectra of **5-3** (in CD<sub>3</sub>OD)



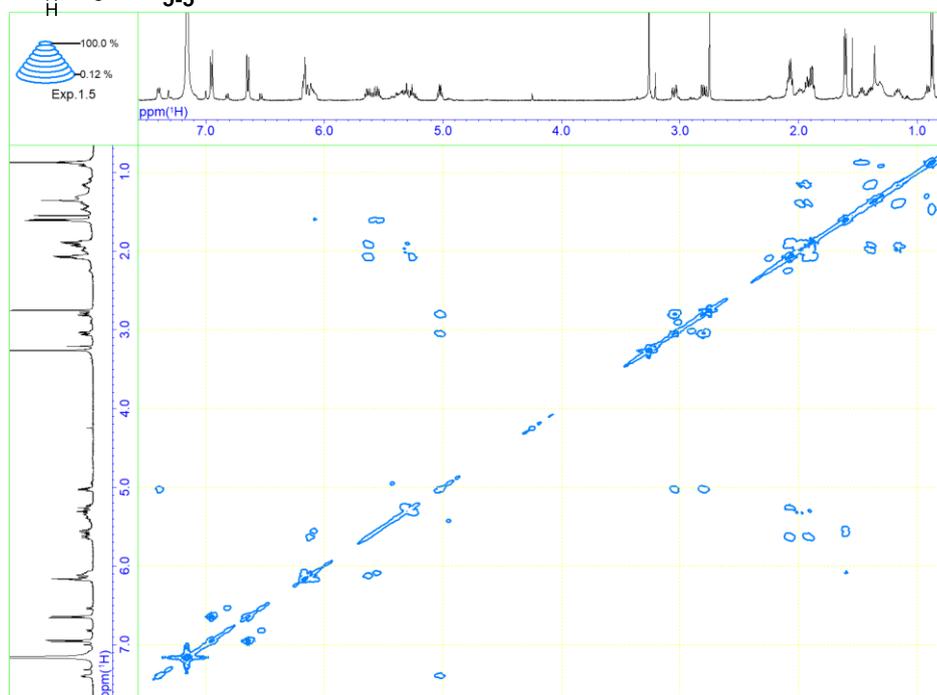
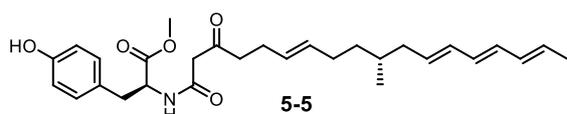
HMBC spectra of **5-3** (in CD<sub>3</sub>OD)



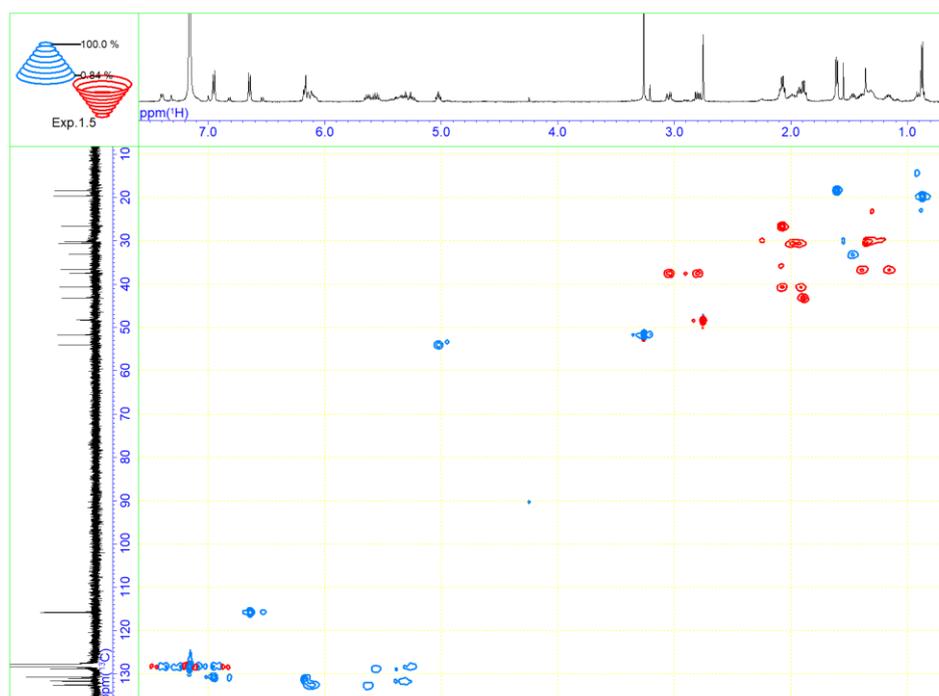
<sup>1</sup>H-NMR spectrum of **5-5** (in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 500 MHz)



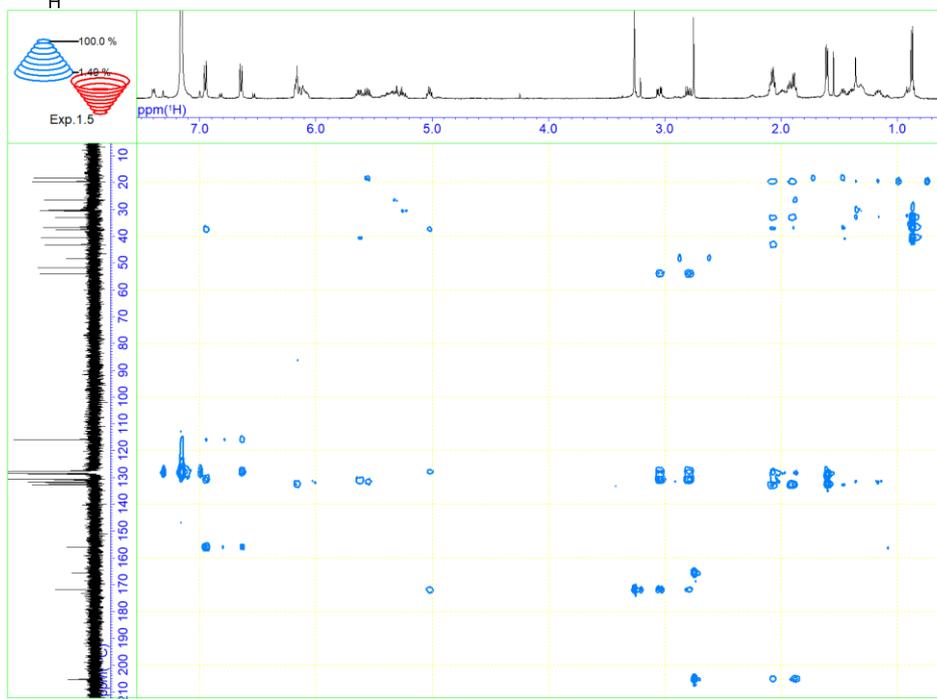
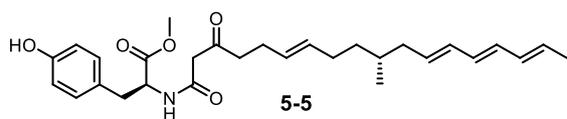
<sup>13</sup>C-NMR spectrum of **5-5** (in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, 125 MHz)



COSY spectra of **5-5** (in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)



edHSQC spectra of **5-5** (in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)



HMBC spectra of **5-5** (in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>)

## References

- 1) A. Haga, H. Tamoto, M. Ishino, E. Kimura, T. Sugita, K. Kinoshita, K. Takahashi, M. Shiro, and K. Koyama, *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 750.
- 2) X. Mo, Q. Li, and J. Ju, *RSC Adv.* **2014**, *4*, 50566.
- 3) H. Oikawa, T. Kobayashi, K. Katayama, Y. Suzuki, and A. Ichihara, *J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 8748.
- 4) R. Fujii, T. Ugai, H. Ichinose, M. Hatakeyama, T. Kosaki, K. Gomi, I. Fujii, A. Minami, H. Oikawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2016**, *80*, 426.
- 5) C. Zaehle, M. Gressler, E. Shelest, E. Geib, C. Hertweck, and M. Brock, *Chem. Biol.* **2014**, *21*, 719.
- 6) C. Liu, K. Tagami, A. Minami, T. Matsumoto, J. C. Frisvad, H. Suzuki, J. Ishikawa, K. Gomi, and H. Oikawa, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54*, 5748.
- 7) A. Shimada, M. Kusano, S. Takeuchi, S. Fujioka, T. Inokuchi, and Y. Kimura, *Z. Naturforsch.* **2002**, *57c*, 459.
- 8) K. Krohn, R. Bahramsari, U. Flörke, K. Ludewig, C. Klichespory, A. Michel, H.-J. Aust, S. Draeger, B. Schulz, and S. Antus, *Phytochemistry* **1997**, *45*, 313.
- 9) M. Stadler and H. Anke, *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 267.
- 10) X. Li, J. H. Jeong, K. T. Lee, J. R. Rho, H. D. Choi, J. S. Kang, and B. W. Son, *Arch. Pharm. Res.* **2003**, *26*, 532.
- 11) M. Yamane, Master thesis, Hokkaido University, **2016**.

## 第7章 総括

ポリケタイド系天然物は糸状菌、バクテリア、植物などが生産する天然物の一群であり、1章で述べた通り高脂血症薬である lovastatin や免疫抑制剤 cyclosporin に代表される有用な生物活性物質を含んでいる。その構造多様性は、①2,000～アミノ酸からなるポリケタイド合成酵素 (PKS) によるポリケタイド鎖 (PK) の構築、②修飾酵素による PK の官能基化・構造複雑化を受けることで創出されている。PKS は数種類に分類されるが、その中でも繰り返し型 PKS は他の PKS に比べて煩雑な触媒制御機構を有しており、先行研究例も少ない。近年では、天然物の入手手段として伝統的な有機合成的手法だけでなく、生合成遺伝子の異種発現という分子生物学的な手法による天然物生産が可能になってきている。しかしポリケタイド系天然物の生合成は、その酵素の巨大さによる取り扱いの難しさや、異種発現系が普及していないことから研究例は限定的である。例として、PK の構築による PKS の機能解析は 1999 年に *Aspergillus nidulans* を用いた LovB<sup>1</sup>、2005 年に *Aspergillus oryzae* を用いた PKSN<sup>2</sup>、2006 年に同じく *A. oryzae* を用いた PKSF<sup>3</sup> など数例が知られているが、ポリケタイド系天然物の全生合成という観点からは tenellin<sup>4</sup> の 1 例のみである。

そこで本研究では異種発現系を用いて、繰り返し型 PKS の関与する天然物の全生合成、ならびに生合成機構の解析を行った。本研究の成果と、過去の知見を組み合わせることで将来的に多様な物質生産を行うための知見を得ることを目的とした。

2章では、糸状菌由来植物毒素 betaenone の酵素的全合成を行った。先行研究より、betaenone はポリケタイド系天然物であり、その生合成経路には P450 酸化酵素が関与していると判明していた。その情報をもとに生産菌 *Phoma betae* のドラフトゲノムシーケンスを行い、生合成遺伝子クラスターを探索したところ、bet 遺伝子クラスターの特定に成功した。得られた遺伝子を麹菌に導入して機能解析を行った。その結果、繰り返し型 PKS 遺伝子である bet1 だけを導入した麹菌 AO-bet1 では生成物を与えず、その機能を補助する trans ER である bet3 を共発現した株 AO-bet13 によって betaenone 類の基本骨格である dehydroprobetaenone I (2-5) の異種生産に成功した。続いて酸化還元酵素遺伝子 bet4 の追加導入によって既知化合物 2-4、酸化酵素 P450 遺伝子 bet2 の追加導入によって天然物 betaenone B (2-2) の酵素的全合成を達成した (図 7-1)。

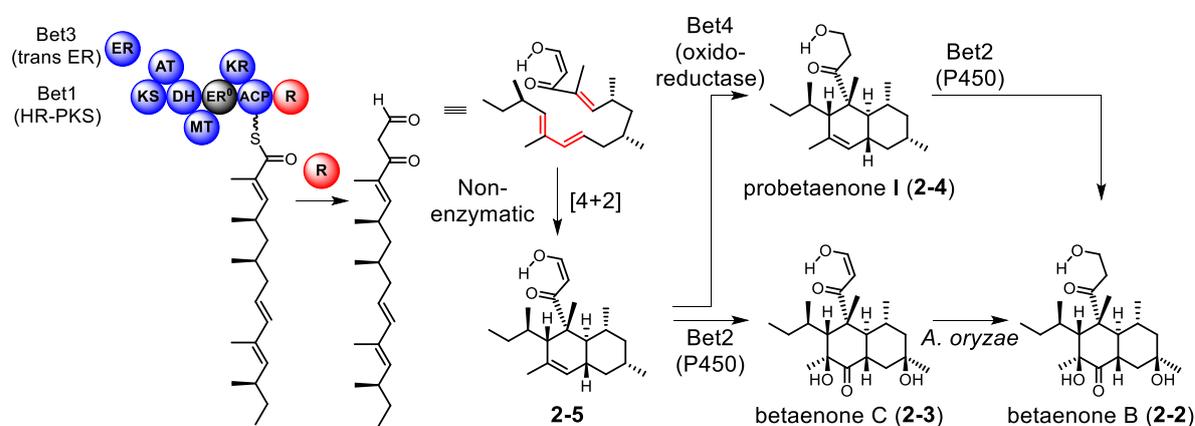


図 7-1. Betaenone 類の生合成経路

3章では、機能未知遺伝子の強制発現による天然物探索 (=ゲノムマイニング) を PKS に適用した。糸状菌におけるゲノムマイニングは、遺伝子サイズが小さく、ORF の推定やクローニングが容易で、網羅的な解析に対する労力が少なく済むテルペン環化酵素に注目して行われてきた。その理由は、候補遺伝子の中には酵素機能を消失した配列が常に混入しうるものの、対象とする遺伝子数が多ければ機能を保持した酵素の絶対数も多くなるため問題にはならないからである。その一方で、ポリケタイドを対象としたゲノムマイニングは限定的である。その主な原因として、テルペン環化酵素遺伝子は最大でも 2 kbp 程度の小さな遺伝子なのに対し、PKS の酵素遺伝子サイズが 7 - 12 kbp と巨大なため、1つの遺伝子を解析するだけでもテルペン環化酵素とは比較にならないほどの時間と労力を要するためである。よって、ゲノムマイニングの候補として選んだ PKS 遺伝子において、LovB のようにポリケタイド鎖を酵素から切り出すドメインが欠如していたり、または機能が最初から失活している場合、生成物が得られずに研究が進展しない恐れがある。この短所を回避するため、数ある候補の中から機能しうる遺伝子を絞り込んで異種発現を行った。

絞り込むための手法として、①候補遺伝子が糸状菌内で発現していること、②2章で異種発現に成功した *Bet1* のように、ポリケタイド鎖を酵素から切り離すためのドメインを有していること、に注目した。その結果、9 個の候補から 1 つの PKS-NRPS である *asolS* を含む *asol* 遺伝子クラスターを発見した。得られた遺伝子を麹菌に導入して機能解析を行ったところ、PKS-NRPS 遺伝子である *asolS* と、その機能を補助する trans ER である *asolC* を共発現した AO-*asolSC* の代謝産物から新規化合物 protodidymellamide  $\alpha$  (**3-10**) が観測された。続いて P450 酸化酵素遺伝子 *asolA* の追加導入によって 1 : 1 のジアステレオマー混合物 **3-11**, 天然物 didymellamide B (**3-12**) の生産を確認した。さらに、本化合物群のデカリン骨格は有機溶媒条件下においても単一の環化付加体を与えることを確認した (図 7-2)。以上から、PKS (-NRPS) を対象としたゲノムマイニングに成功し、今後の標的遺伝子を選択する際の知見を得ることができた。

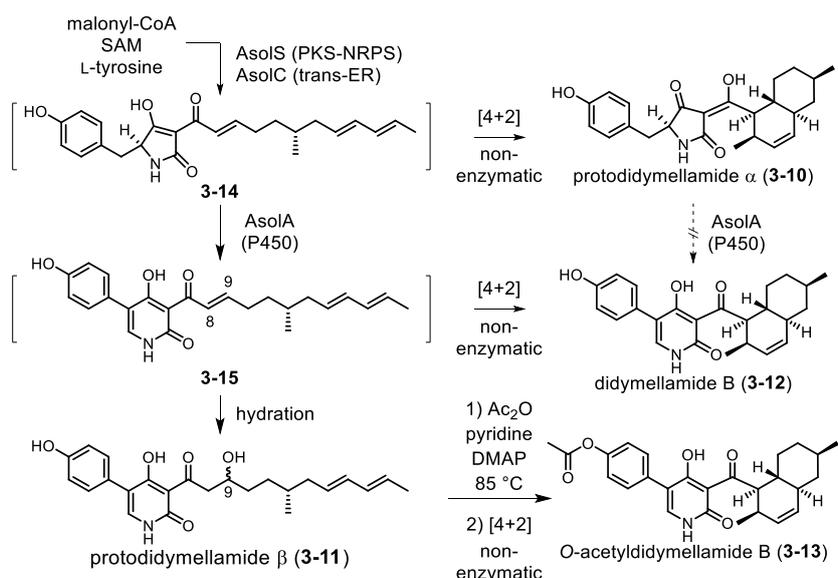


図 7-2. Didymellamide 類の生合成経路

2, 3 章を通して得られた **betaenone**, **didymellamide** は、両者ともに *endo* 付加体を唯一の生成物として与えた。これまでの知見において、**lovastatin** や **solanapyrone** のように [4+2] 環化付加反応は **DAase** 存在下で進行するものと考えられていたが、本研究から **DAase** 非存在下でデカリン骨格を形成するはじめての例を提唱することができた。[4+2] 環化付加で得られる化合物の立体構造は、PKS の MT ドメインによって導入されたメチル基の立体化学によって大きな影響を受ける。すなわち、生合成経路が明らかになっていない **fischerin** などの天然物において、*endo* 付加体の方がエネルギー的に安定であると推定できるにもかかわらず *exo* 付加体が優先して生成しているような場合、その生合成には **DAase** が関与していると考えられる。よって、生合成酵素遺伝子探索の際に指針となりうる情報であるため、今後のデカリン骨格を有する天然物の生合成研究において有用である。

4 章では、複雑な生合成機構が想定されていたシクロペンテン骨格を共通構造として有するポリケタイド系天然物 **cyclohelminthol** および **terrein** の生合成研究を行った。2, 3 章で得られた知見から、生合成遺伝子の探索と麹菌での機能解析を行った。

その結果、**terrein** 類の予想生合成中間体や、**cyclohelminthol** 類の予想生合成中間体 **4-14** の異種生産、並びに修飾酵素の特定に成功した。次に、先行研究における遺伝子破壊実験で推定されていた生合成酵素遺伝子と、そのホモログの機能解析を行った。その結果、**terrein** に関する先行研究において得られていなかった **TerC** ホモログによる酸化的な脱炭酸反応の生成物と、**TerQ** ホモログによる脱水生成物が得られたことから、**terrein** 類の生合成中間体は酸化を受けやすいヒドロキノン構造を有していることを明らかにするとともに、**terrein** に至る合理的な生合成経路を提唱した (図 7-3)。

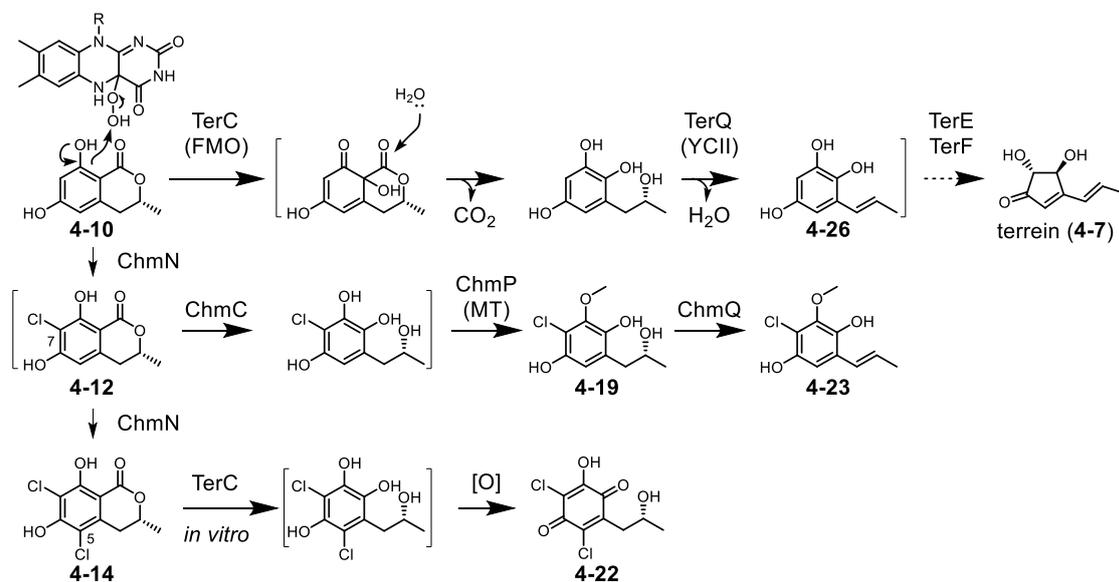


図 7-3. Terrein, cyclohelminthol 類の不安定中間体

2, 3, 4 章で得られた結果から、麴菌異種発現系に導入した異種由来の生合成遺伝子は過不足なく機能することを明らかにした。よって、本発現系を人工改変したキメラ酵素の機能解析に適応させる知見を得るため、キメラ酵素の発現を試みた。

5 章では、12 kbp の巨大な酵素遺伝子である PKS-NRPS を材料とし、化合物を還元的に切り出す R ドメインと、Dieckmann 環化を触媒する R\*ドメインを交換したキメラ酵素遺伝子を麴菌に導入し、生産した生成物の構造から機能解析を行った。その結果、キメラ酵素によって生産した化合物 **5-4**, **5-2** の構造から R, R\*ドメインのキメラ酵素における活性と、基質特異性に関する知見を得た (図 7-4)。さらなる詳細な検討は必要であるが、本研究で用いたキメラ酵素遺伝子構築法は多検体の検討には不適であるため、合成 DNA と CRISPR/Cas9 を用いた迅速な構築法を検討する必要がある。

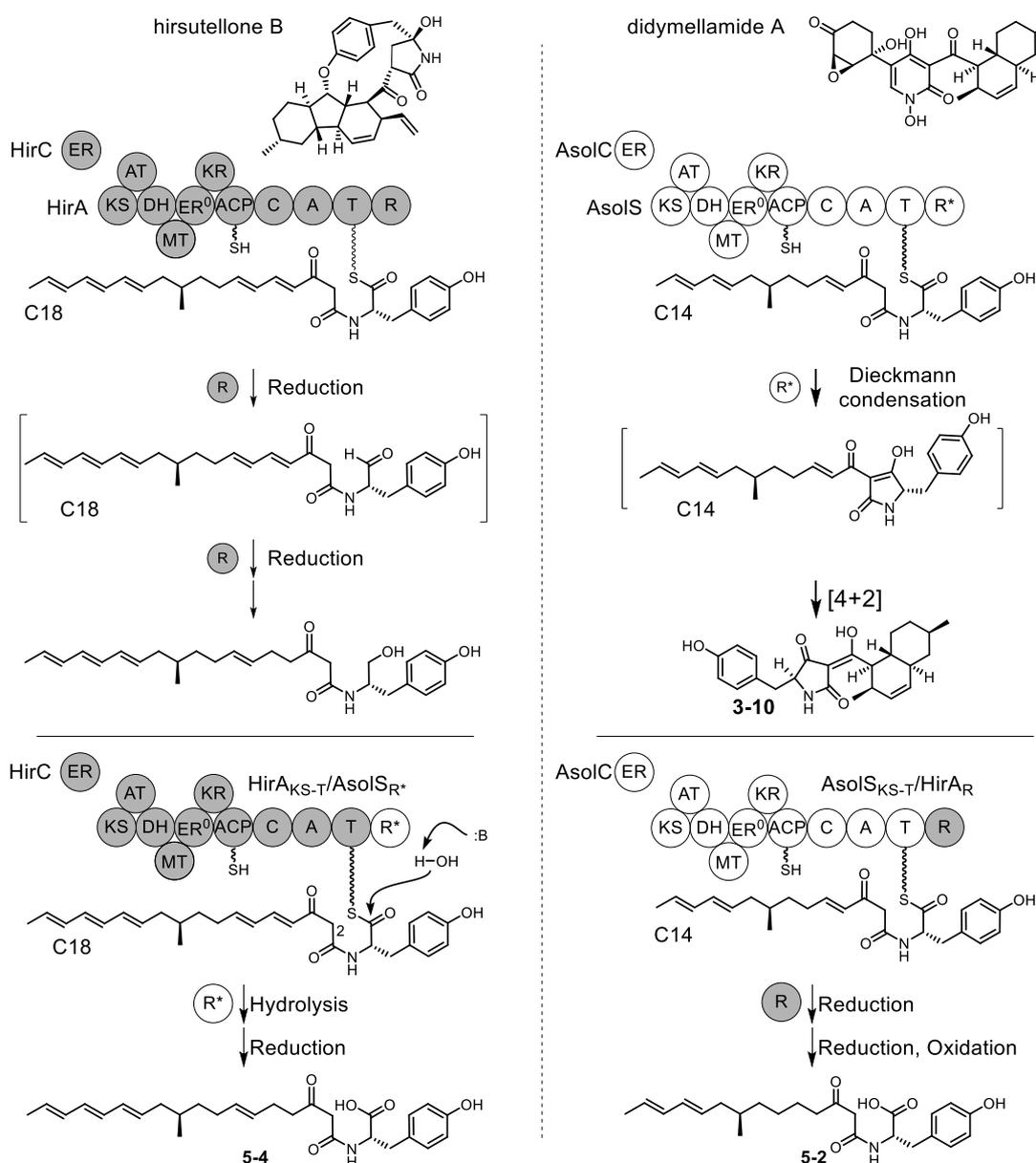


図 7-4. AsoS, HirA を材料としたキメラ酵素と生成物

以上、本学位論文では糸状菌由来のポリケタイド系天然物の生合成研究を通して繰り返し型 PKS が関与する生合成機構の解析に成功した。加えて、将来における人工機能改変酵素の構築や多様な物質生産のための知見を得ることができた。

#### References

- 1) J. Kennedy, K. Auclair, S. G. Kendrew, C. Park, J. C. Vederas, C. R. Hutchinson, *Science* **1999**, *284*, 1368.
- 2) I. Fujii, N. Yoshida, S. Shimomaki, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *Chem. Biol.* **2005**, *12*, 1301.
- 3) K. Kasahara, I. Fujii, H. Oikawa, and Y. Ebizuka, *ChemBioChem* **2006**, *7*, 920.
- 4) M. N. Heneghan, A. A. Yakasai, L. B. Halo, Z. S. Song, A. M. Bailey, T. J. Simpson, R. J. Cox, and C. M. Lazarus, *ChemBioChem*, **2010**, *11*, 1508.

## 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 教授、南篤志 准教授、尾崎太郎 助教授、劉成偉 助教授に心より感謝いたします。

東京農工大学大学院工学研究院応用化学部門 大栗博毅 教授には、有機化学に関する知識や指摘をいただきました。心より感謝いたします。

北海道大学大学院工学研究院 応用生物化学研究室 大利徹 教授、大学院理学研究院 有機化学第一研究室 鈴木孝紀 教授、同有機化学第二研究室 谷野圭持 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、化合物の供与や微生物株の分譲、依頼測定などでお世話になりました。深謝いたします。

- ・弘前大学 農学生命科学部 分子生命科学科 有機化学実験室 橋本勝 教授
- ・東北大学大学院 農学研究科 生物産業創成化学専攻 遺伝子情報システム学分野 五味勝也 教授
- ・東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻醸造微生物学寄付講座 丸山潤一 准教授
- ・筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生命産業科学専攻 バイオ産業科学 繁森英幸 教授
- ・北海道大学農学部 福士江里 博士
- ・東京農工大学 大学院工学研究院 応用化学部門 谷藤涼 氏