



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	酸化酵素による天然物の構造多様性創出機構に関する研究 : ポリケタイドおよびテルペノイド生合成における特異な反応機構の解析
Author(s)	深谷, 充功
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第15636号
Issue Date	2023-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15636
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93114
Type	doctoral thesis
File Information	FUKAYA_Mitsunori.pdf



酸化酵素による天然物の構造多様性創出機構に関する研究：ポリケタイドおよびテルペノイド生合成における特異な反応機構の解析

北海道大学大学院 総合化学院 有機反応論研究室
深谷 充功
2023 年 博士論文

目次

第1章 序論

- 1-1. 天然物に修飾を与える酸化酵素
- 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

第2章 *Talaromyces islandicus* が生産するアントラキノン系天然物生合成経路の解明：構造多様化に関わる修飾酵素の機能解析

- 2-1. 序
 - 2-1-1. アントラキノン系天然物の生合成研究に関する現状
 - 2-1-2. *Talaromyces islandicus* が生産するアントラキノン系天然物
- 2-2. Skyrin の酵素的全合成及び二量化酵素の機能解析
 - 2-2-1. 生合成遺伝子クラスターの探索
 - 2-2-2. チトクローム P450 (*skyM*) の機能解析
 - 2-2-3. 麹菌を用いた emodin 及び skyrin の異種生産
- 2-3. 二量化酵素 SkyM の機能解析
 - 2-3-1. 微生物変換実験による基質特異性の検討
 - 2-3-2. 推定反応機構
- 2-4. chrysophanol 生合成経路の解明
 - 2-4-1. 生合成遺伝子の探索
 - 2-4-2. 生合成酵素の機能解析
 - 2-4-3. 推定反応機構
- 2-5. AQ/BQ の生合成についての考察
- 2-6. まとめ
- 2-7. 実験部 (skyrin)
- 2-8. References

第3章 メレオライド生合成経路の解明：二機能性酸化酵素 Mld7 の反応機構解析

- 3-1. 序
 - 3-1-1. 担子菌由来天然物の生合成研究に関する現状
 - 3-1-2. Melleolide 類の生合成研究について
- 3-2. 麹菌異種発現系を用いた Mld1、Mld7 の機能解析
- 3-3. Mld7 の機能解析
 - 3-3-1. 大腸菌発現系を用いた Mld7 の機能解析
 - 3-3-2. 麹菌異種発現系を用いた Mld7 *in vitro* 酵素反応

- 3-3-3. Mld7 が触媒する特異な多段階反応のメカニズム解明.
- 3-4. 考察
- 3-5. まとめ
- 3-6. 実験部 (melleolide)
- 3-7. References

第 4 章 総括

謝辞

第1章 序論

1-1. 天然物に修飾を与える酸化酵素

糸状菌由来の二次代謝産物は、創薬に関連する重要な天然物の供給源である。 β -ラクタム系抗生物質である penicillin が初めてアオカビから単離されて以降、多くの臨床医薬品や市販医薬品が、糸状菌を含む微生物の天然物から臨床開発されてきた。また、これらの治療薬とは別に、aflatoxin のような動物や植物に影響を及ぼす毒性を持つ化合物も生産する。こうした生物活性の多様性を反映するかのよう、これらの天然物は、特徴的で複雑な化学構造を有する。代表的な例は、ポリケタイド、テルペノイド、ペプチド、アルカロイドである。これらの天然物は、数多くの生合成酵素 (=天然物をつくるための触媒) により構築されている (Figure 1-1)。

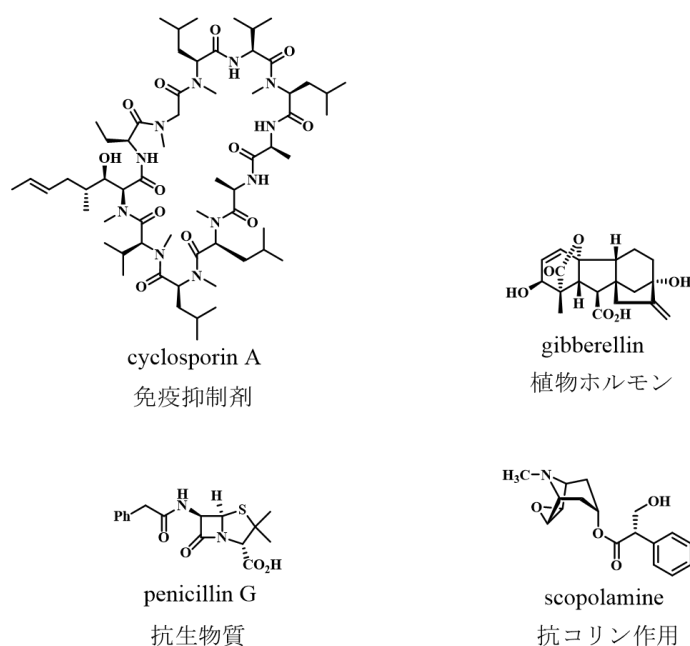
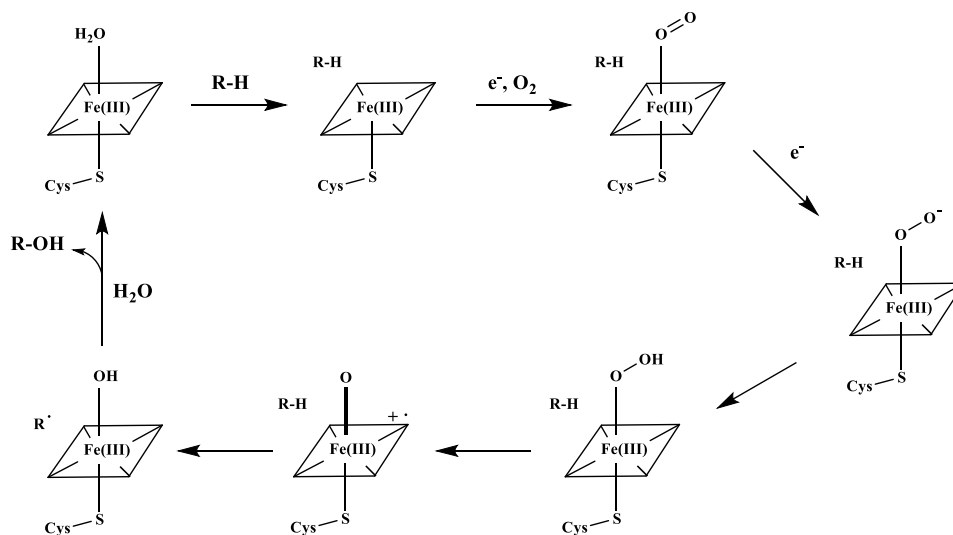


Figure 1-1. 代表的な糸状菌由来の二次代謝産物

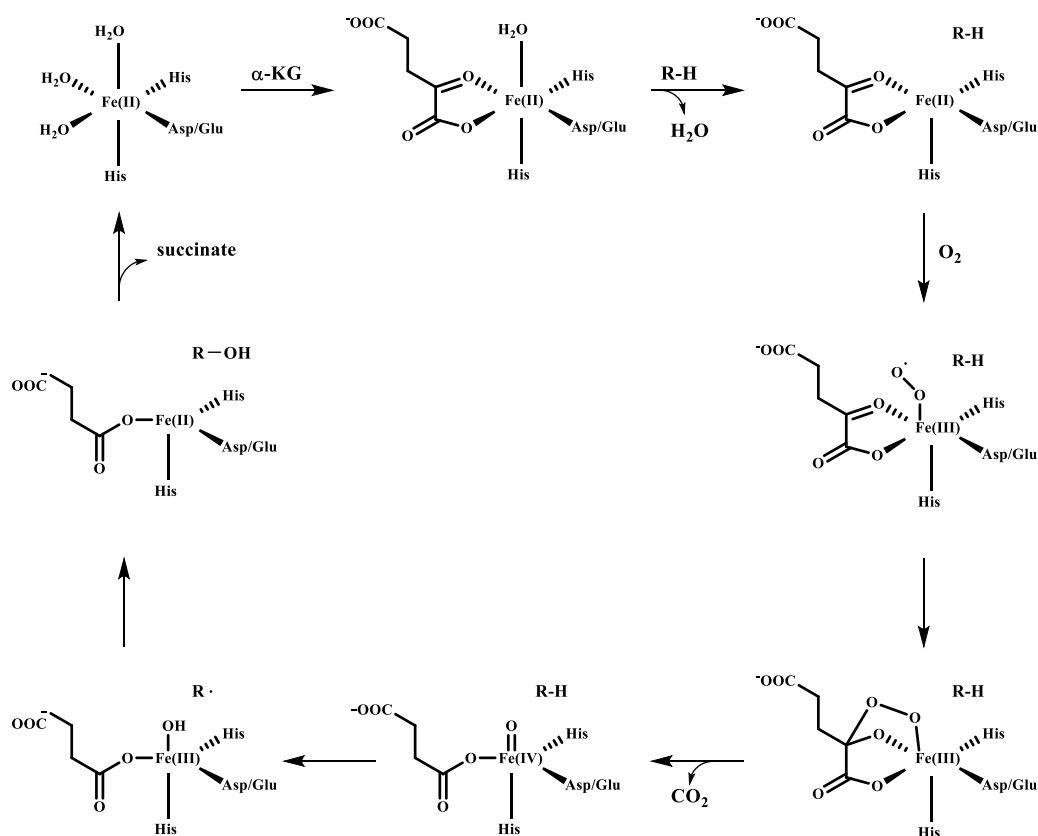
微生物の生産する天然物の構造多様性は、大きく 2 つの段階に分けられる。一つは、基本骨格の構築である。基質として利用される一次代謝産物の種類、縮合様式や縮合回数の違い、酵素からの放出様式の違いなどによって、上述したテルペン、ポリケタイド、非リボソームペプチドなどの様々な基本骨格が創出される。二つ目は、こうした基本的骨格構築後に起こる修飾反応であり、様々な修飾酵素によって触媒される。代表的な例は、アシル化、グリコシル化、アルキル化、酸化還元反応などである。この内、酸化酵素が触媒する変換反応の種類は多様であり、単純なアルコールの酸化反応に加え、水酸基の導入、二重結合の形成、酸化的な環化反応、ハロゲン化反応などがある。これらの反応を触媒する酵素の反応機構を解明することは、天然物の構造多様化を理解する上で重要である。

酸化反応を触媒する酵素グループとしては、チトクローム P450 (P450)、非ヘム鉄/ α -ケトグルタル酸(α -KG)依存性ジオキシゲナーゼ、フラボプロテインが存在する。さらには、ラジカル SAM 酵素 (SAM) や、鉄硫黄クラスターを持つ非ヘム鉄依存性オキシゲナーゼといった酵素も、天然物生合成において酸化反応を触媒することが知られている。以下、P450、 α -KG 依存性ジオキシゲナーゼ、および フラボプロテインが触媒する代表的な反応機構および反応例について述べる。

ヘム鉄依存型オキシゲナーゼであるシトクローム P450 もまた、微生物において多様な酸化変換反応を触媒することが知られている。P450 は、タンパク質部分とヘム (プロトフォルフィリン IX) からなり、ヘムが活性中心を形成する。その触媒サイクルにおいては、3 価の鉄中心に基質が配位することからはじまり、チトクローム P450 還元酵素などが関与する電子伝達系から供給される電子によって分子状酸素を還元的に活性化して、酸化活性種 (オキソフェリルポルフィリン π -カチオンラジカル: Compound I) が生成する^{1), 2)}。この活性種が基質から水素を引き抜き、反応性の高い基質ラジカルを生じる (Scheme 1-1)。本酵素が触媒する反応は、基質への水酸基の導入、アルコールの酸化、エポキシ化、C-C 結合の形成/解裂、脱水反応など多岐に及ぶ (Scheme 1-2)^{3), 4)}。また、反応性の低い二価鉄ヒドロペルオキシ種は、親電子的酸化や求核的酸化を触媒する酸化剤としても機能する例が知られている。本酵素は、 sp^3 炭素から水素を引き抜いて対応するラジカル種を発生できるため、上述したように、炭素骨格構築後の修飾反応において中心的な役割を果たしている修飾酵素であると言える。



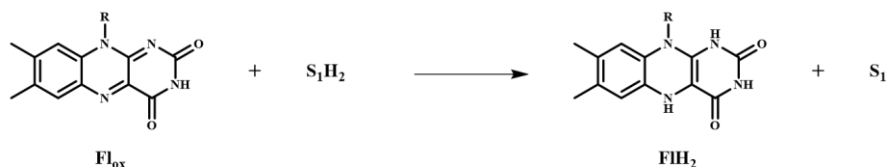
Scheme 1-1. チトクロームP450の触媒サイクル



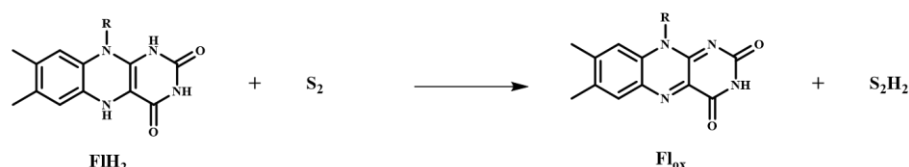
Scheme 1-3. α -KG依存性ジオキシゲナーゼの触媒サイクル

また、活性中心にフラビン補酵素（通常、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）またはフラビンモノヌクレオチド（FMN））を有する修飾酵素としてフラボプロテインが知られている。本酵素が触媒する反応は、**reductive half reaction** と **reoxidative half reaction** に大別される⁶⁾ (Scheme 1-4)。前者では、基質が酸化されると同時に酸化型フラビンが還元されることで還元型フラビンが生成する。後者では、生成した還元型フラビンが再酸化されて酸化型フラビンが再生すると同時に共基質が還元される。比較的単純な例が、**glucose-methanol-choline (GMC) oxidase** によるアルコールの酸化反応である。**Pyranose 2-oxidase (P2O)** はグルコースの2位水酸基をケトンへと酸化する酵素であるが、この酸化の過程で生じたヒドリドはフラビン補酵素へと移動して、還元型フラビンを与える (Scheme 1-5)。次いで、分子状酸素を用いたフラビンの再酸化が進行して、酸化型フラビンが再生する。この他、**4-hydroxybenzoate 3-hydroxylase (PHBH)** が触媒する水酸化、**Baeyer-Villiger monooxygenase (BVMO)** で触媒するシクロヘキサノン酸化、ハロゲン化などを触媒する例も報告されている⁶⁾。

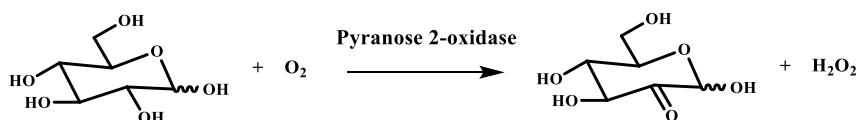
Flavin Reductive Half Reaction



Flavin Reoxidative Half Reaction



Scheme 1-4. 典型的なフラボプロテインの触媒機構



Scheme 1-5. Pyranose 2-oxidase (P2O) による酸化反応

こうした酸化酵素特有の活性種を利用した多様な反応は、天然物特有の構造多様性の創出に大きく寄与している。上述したように、各酵素の基本的な触媒機構は理解されているものの、天然物の生合成においては、意外な反応に関与する酸化酵素が同定される場合がある。こうした酵素の反応機構を正しく理解することは、「天然物の構造多様性が如何にして構築されるのか？」という本質的な疑問を解明する上で重要である。さらに、微生物のゲノム上に存在する機能未知の生合成酵素遺伝子の中から、新しいタイプの酸化酵素が発見されることもある。例えば、当研究室では、糸状菌が生産するリボソームペプチドの生合成研究では、酸化環化反応、塩素化、水酸基の導入などの反応を触媒する UstYa ファミリー酵素という酸化酵素を発見した⁸⁾。以上を踏まえ、本研究では、子囊菌が生産するアントラキノ系ポリケタイドと担子菌が生産するテルペノイドに注目して、その生合成経路の解明と酸化酵素を中心とする修飾酵素の機能解析を行うことにした。

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

天然物の生合成に関わる修飾酵素の機能解析を行う上での課題の一つに、複雑な化学構造を有する基質の調製が挙げられる。この基質の調製と生合成経路の解明を両立するための手法として、異種宿主発現系がある。特に、糸状菌由来の天然物生合成遺伝子の解析においては麹菌を宿主とした異種宿主発現系が効果的である。当研究室においては、麹菌異種宿主発現系を用いて、子囊菌由来天然物である penitrem A（天然物の種類：イ

ンドールジテルペン)³⁾、**phialotide** (ポリケタイド)⁷⁾、**ustiloxin** (リボソームペプチド)⁸⁾や **ophiobolin** (テルペノイド)⁹⁾の生合成経路の解明や異種宿主生産を実現してきた (**Figure 1-2**)。最近では、clustered regulatory interspaced short palindromic repeats (CRISPR)-Cas9 システムを活用して、独自に発見したホットスポット (=導入した遺伝子が確実に転写される領域) に生合成遺伝子を導入する第2世代遺伝子導入法を確立した¹⁰⁾。この第2世代遺伝子導入法では、*pyrG* マーカーをもつ *cas9* プラスミドの脱落を行うことができるため、原理的には、導入できる遺伝子数に制約はない上、遺伝子導入効率が高いことから、スクリーニングが不要である。これにより、担子菌由来天然物である **erinacine Q** の生合成経路の解明に成功した¹¹⁾。麴菌異種宿主発現系の最も重要な特徴は、生合成に関わる遺伝子を任意に組み合わせて麴菌へと導入することで、望みの生合成中間体やアナログ体を 100 mg/L という高い収量で合成できる点にある。こうして調製した化合物は、組み換え酵素を利用した *in vitro* 反応に加えて、単独遺伝子導入株を用いた微生物変換へと利用することができるため、注目する酵素の機能解析が可能となる。実際、**ustiloxin** の生合成研究においては、生合成の後期中間体である **ustiloxin H** を異種宿主発現系で調製し、フラビン依存性モノオキシゲナーゼである *UstF2* の触媒機構を解明した (**Scheme 1-6**)⁸⁾。以上のことから、本研究においては、麴菌異種宿主発現系を基盤とした修飾酵素の同定と機能解析を行う。ただし、第3章で詳しく述べるが、担子菌由来天然物に対する本手法の適用例は2例 (天然物：**pleuromutilin**¹²⁾、**erinacine Q**¹¹⁾) しかないため、本研究は担子菌由来天然物への麴菌異種宿主発現系の利用可能性の検証という点でも重要な意味をもつ。

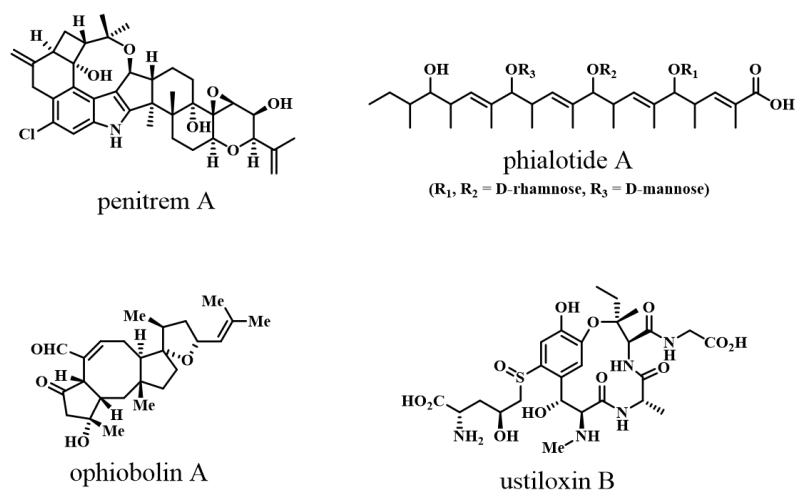
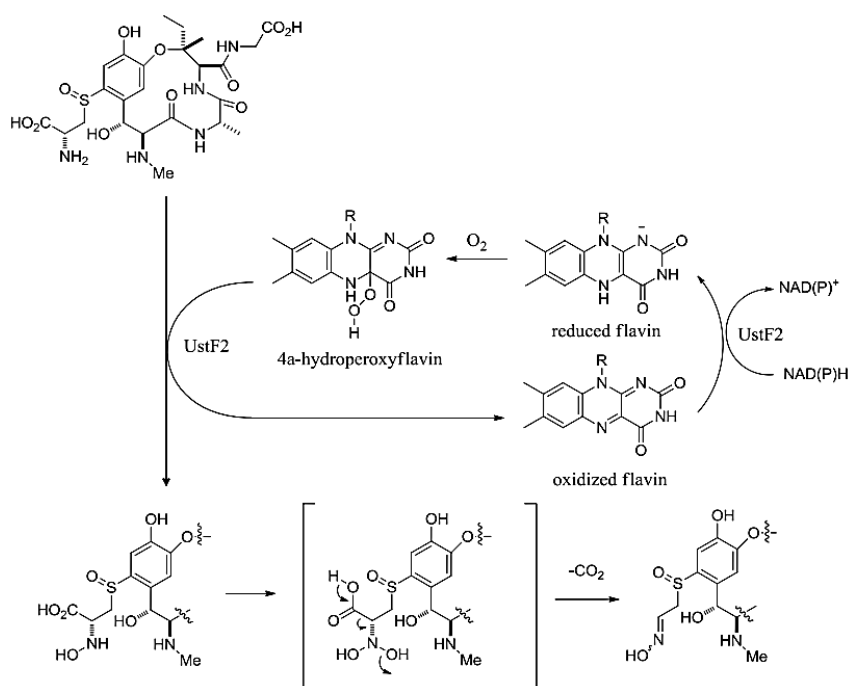


Figure 1-2. 麴菌異種発現系による機能解析例



Scheme 1-6.フラビン依存性モノオキシゲナーゼであるUstF2の触媒機構

以上を踏まえ、本論文では、麴菌異種発現系を利用し、機能解析の困難な生合成経路後期にあたる酸化酵素を中心とした修飾酵素の機能解析に取り組んだ。2章では、アントラキノン系天然物に注目して、生合成経路の解明と構造多様性創出にかかわる鍵酵素の機能解析を目的とした研究の成果をまとめる。3章では、melleolide 類の後期生合成に関与するフラボプロテインの触媒機構解析を中心とした研究成果について記載した。

1-3. References

- 1) L. M. Podust.; D. H. Sherman. Diversity of P450 enzymes in the biosynthesis of natural products. *Nat. Prod. Rep.* **2012**, 29, 1251.
- 2) X. Zhang.; S. Li. Expansion of chemical space for natural products by uncommon P450 reactions. *Nat. Prod. Rep.* **2017**, 34, 1061–1089.
- 3) C. Liu.; K. Tagami.; A. Minami.; T. Matsumoto.; J. C. Frisvad.; H. Suzuki.; J. Ishikawa.; K. Gomi.; H. Oikawa. Reconstitution of Biosynthetic Machinery for the Synthesis of the Highly Elaborated Indole Diterpene Penitrem. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 5748-5752; *Angew. Chem.* **2015**, 127, 5840- 5844.
- 4) A. Tazawa.; Y. Ye.; T. Ozaki.; C. Liu.; Y. Ogasawara.; T. Daiiri.; Y. Higuchi.; N. Kato.; K. Gomi.; A. Minami.; H. Oikawa. Total Biosynthesis of Brassicicenes: Identification of a Key

Enzyme for Skeletal Diversification. *Org. Lett.* **2018**, 20, 6178–6182.

- 5) S. Adak.; B. S. Moore. Cryptic halogenation reactions in natural product biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 38, 1760-1774
- 6) E. Romero.; J. R. Gómez Castellanos.; G. Gadda.; M. W. Fraaije.; A. Mattevi. Same Substrate, Many Reactions: Oxygen Activation in Flavoenzymes. *Chem. Rev.* **2018**, 118, 1742–1769.
- 7) J. Takino.; A. Kotani.; T. Ozaki.; W. Peng J. Yu.; Y. Guo.; S. Mochizuki.; K. Akimitsu.; M. Hashimoto.; T. Ye.; A. Minami.; H. Oikawa. Biochemistry-guided prediction of the absolute configuration of fungal reduced polyketides. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2021**, 60, 43, 23403-23411.
- 8) Ye, Y.; Minami, A.; Igarashi, Y.; Izumikawa, M.; Umemura, M.; Nagano, N.; Machida, M.; Kawahara, T.; Shin-ya, K.; Gomi, K.; Oikawa, H. Unveiling the biosynthetic pathway of the representative ribosomal peptide ustiloxin B in filamentous fungi. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 8072-8075.
- 9) Narita, K.; Chiba, R.; Minami, A.; Kodama, M.; Fujii, I.; Gomi, K.; Oikawa. Unveiling the Biosynthetic Pathway of the Ribosomally Synthesized and Post-translationally Modified Peptide Ustiloxin B in Filamentous Fungi. *H. Org. Lett.* **2016**, 18, 1980-1983.
- 10) Oikawa, H. Heterologous production of fungal natural products: Reconstitution of biosynthetic gene clusters in model host *Aspergillus oryzae*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* **2020**, 96, 420-30.
- 11) Liu, C.; Minami, A.; Ozaki, T.; Wu, J.; Kawagishi, H.; Maruyama, J.; Oikawa, H. Efficient reconstitution of Basidiomycota diterpene erinacine gene cluster in Ascomycota host *Aspergillus oryzae* based on genomic DNA sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 39, 15519-15523.
- 12) Yamane, M.; Minami, A.; Liu, C.; Ozaki, T.; Takeuchi, I.; Tsukagoshi, T.; Tokiwano, T.; Gomi, K.; Oikawa, H. Biosynthetic machinery of diterpene pleuromutilin isolated from basidiomycete fungi. *Chem. Bio. Chem.* **2017**, 18, 2317-2322.

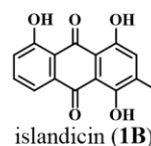
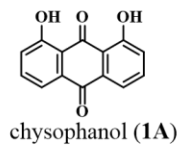
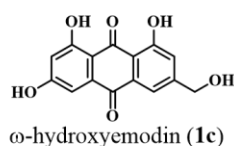
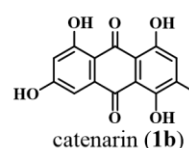
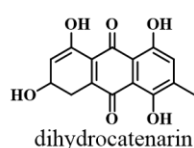
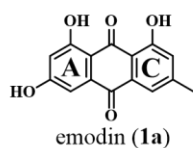
第2章 *Talaromyces islandicus* が生産するアントラキノン系天然物生合成経路の解明：構造多様化に関わる修飾酵素の機能解析

2-1. 序

2-1-1. アントラキノン系天然物の生合成研究に関する現状

アントラキノン (AQ) 系天然物は、emodin (**1a**)に由来する 9,10-anthracenedione 骨格を有するポリケタイド系天然物の総称である¹⁾。AQ は、単純な 3 環性骨格を基本とするにも関わらず、ベンゼン環上の酸化度や酸素官能基の数、修飾様式（配糖化、メチル化など）などが異なることで、その構造多様性が構築されている。また、AQ の酸化的カップリングにより生成する 2 量体（ビスアントラキノン、BQ）を加えると、類縁体の総数は 700 にも及ぶ (**Figure 2-1**)。酸素官能基の位置や数によって吸収スペクトルが変化することから染料として利用されている他、上皮細胞障害による下剤効果（天然物：**1a**）、RNA 転写阻害活性 ((*P*)-(+)-skyrin (**2aa**))、肝機能障害 ((-)-luteoskyrin (**3**), rugulosin (**4**)) などの生物活性を示すことが知られている²⁾。

【Anthraquinones】



【Bisanthraquinones】

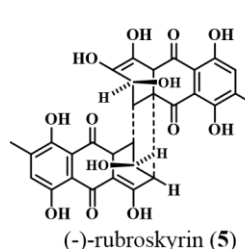
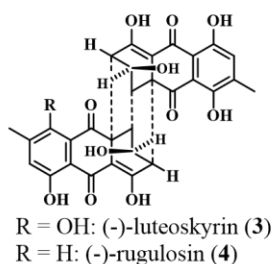
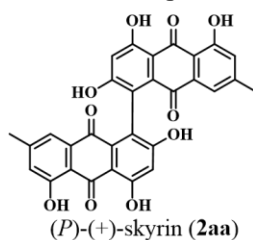


Figure 2-1. アントラキノン系天然物

AQ と同様に **1a** を経由して生合成される天然物である geodin³⁾、monodictyphenone⁴⁾、cladofulvin⁵⁾においては、その生合成遺伝子クラスターが報告されている。これらの化合物は環構造や酸化度が異なるものの、共通中間体である **1a** の構築には、非還元型ポリケタイド合成酵素 (NR-PKS)、チオエステラーゼ、脱炭酸酵素、酸化酵素が関与すると報告されている^{6), 7), 8), 9)}。**1a** に対する酸化的な修飾反応についても、断片的な機能解析が行われてきた。例えば、monodictyphenone の生合成研究では、**1a** から dihydrocatenarin

への還元反応に還元酵素 MdpC¹⁰が関与することが組み換え酵素を用いた *in vitro* 反応から証明された (Figure 2-2)¹⁰。また、**1a** の構造類縁体である norsolorinic acid の生合成研究では、HpyC がキノンの酸化を触媒することが知られている⁹。こうして生成した単量体は、酸化的なカップリング反応を経て、**2aa** のような2量体へと変換される。例えば、cladofulvin や neosartorin の生合成におけるカップリング反応については、遺伝子破壊実験により、チトクローム P450 である ClaM¹¹ および NarP¹²が関与することが示されている。このカップリング反応は、位置特異的かつ立体特異的に進行することで単一のアトロプ異性体を生成物として与えるため、有機化学的にも興味深い酵素である¹³。しかしながら、AQ や BQ の構造多様性構築を理解する上で重要な **1a** に対する酸化的な修飾反応が十分に解明されているとはいえない状況である。

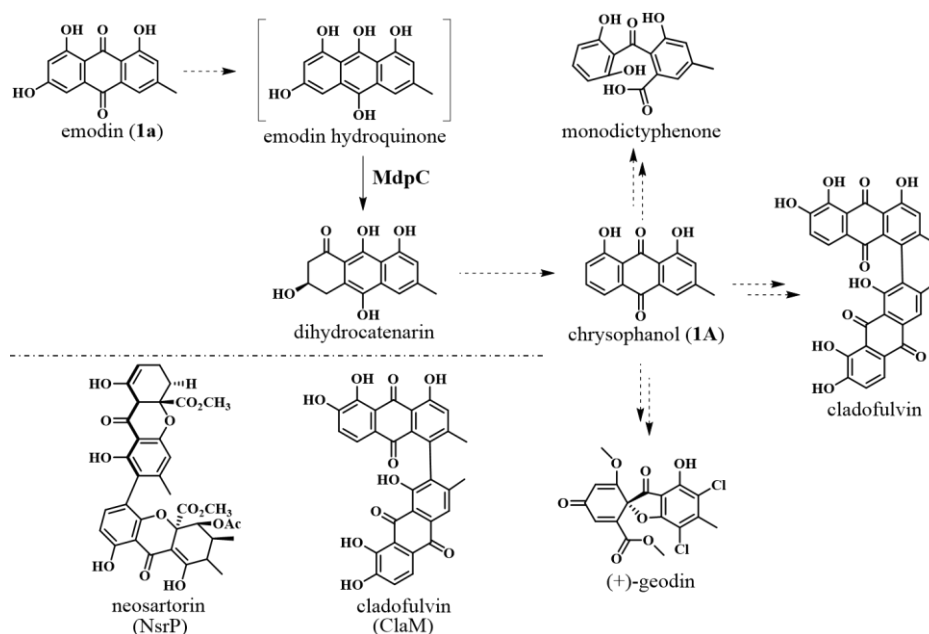


Figure 2-2. アントラキノン系天然物の生合成

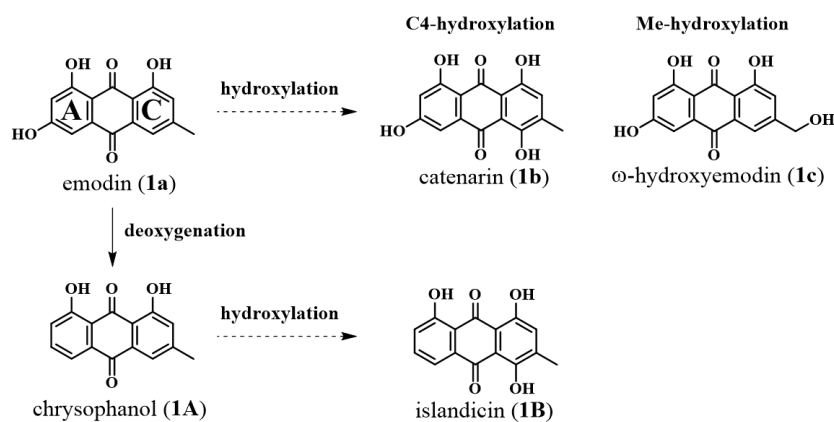
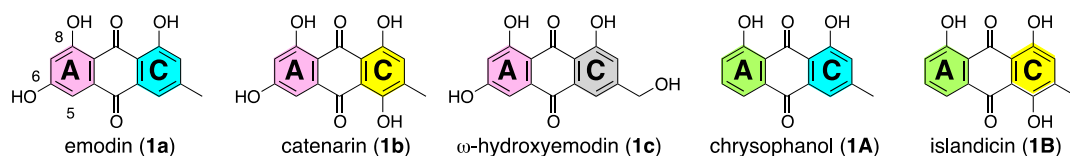


Figure 2-3. AQsの予想生合成

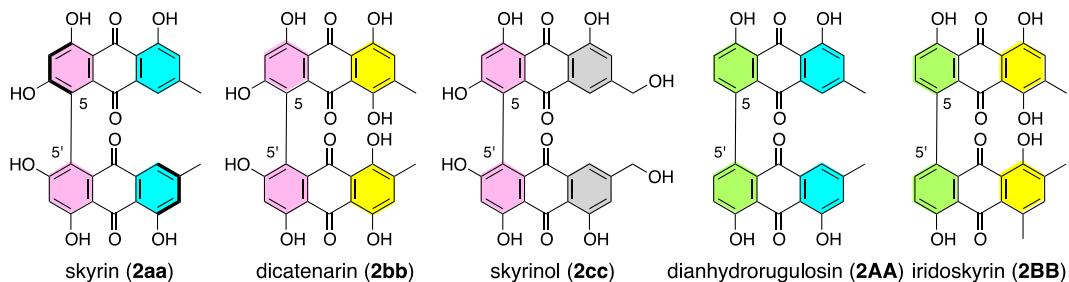
2-1-2. *Talaromyces islandicus* が生産するアントラキノン系天然物

Talaromyces islandicus Sopp (以前の名称 : *Penicillium islandicum* Sopp) は、20 種類以上の AQ、BQ を生産する糸状菌である¹⁴⁾。AQ を A 環と C 環の酸化度に着目して分類すると、C 環に酸素官能基が導入された catenarin (**1b**)、 ω -hydroxyemodin (**1c**)、A 環が脱酸素化された chrysophanol (**1A**)や islandicin (**1B**)に分類できる (Figure 2-4)。これらの AQ が、A 環の C5 位でカップリング反応が進行することで、ホモカップリング体、ヘテロカップリング体を生産する (Figure 2-4)。これに加え、カップリング後にさらなる炭素-炭素結合が形成することで特徴的なかご型構造を有する luteoskyrin (**3**)や rugulosin (**4**)を生産している。以上のことから、本菌がもつ AQ/BQ 生合成に関わる修飾酵素を網羅的に解析すれば、その構造多様性構築機構を一挙に解明できると予想された。

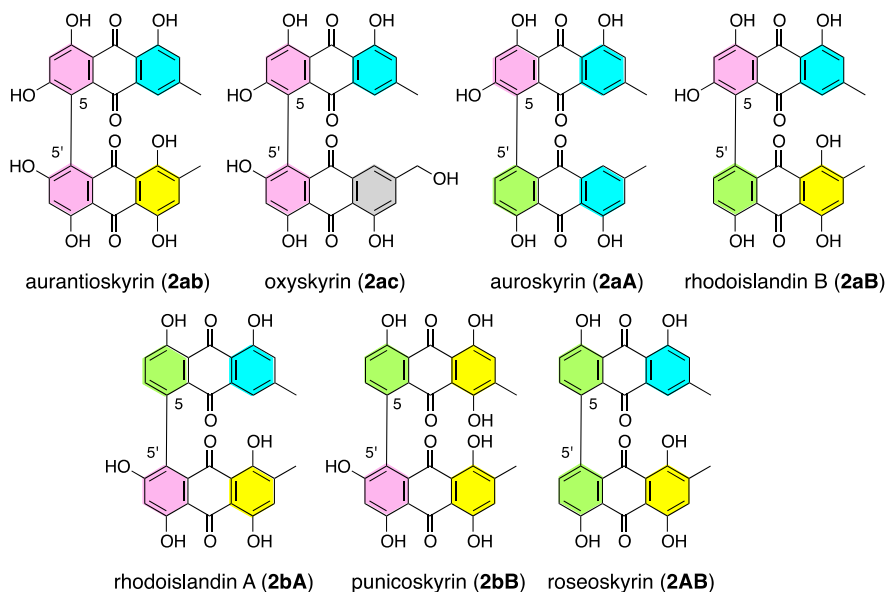
[Monomeric products]



[Homodimeric products]



[Heterodimeric products]



[Modified dimeric products]

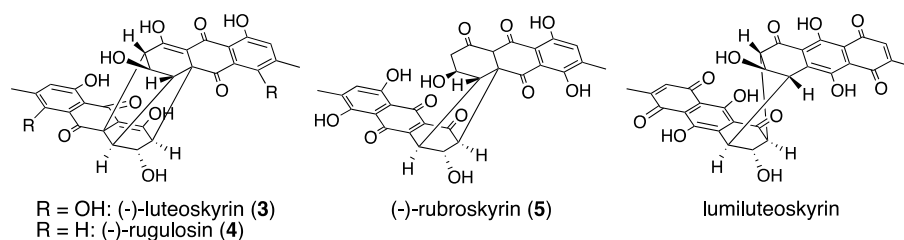


Figure 2-4. *Talaromyces islandicus*が生産するアントラキノン系天然物

第1章でも記載した通り、糸状菌由来天然物の生合成研究において、異種宿主発現は物質生産、経路の解明、酵素機能解析において有効な手法である。これまでに、当研究室では、麴菌を宿主とした異種宿主発現系を確立し、ポリケタイド、テルペノイド、ペプチド、アルカロイドなどに分類される天然物の生合成研究を進めてきた。本手法では、gDNA 配列をそのまま利用できるため、注目する天然物をつくるための遺伝子のセットを見つけることができれば、遺伝子のサイズや関与する遺伝子の数を気にすることなく、その機能解析を行うことができる¹⁵⁾。そこで、本研究では麴菌異種宿主発現系と組み換え酵素を用いた *in vitro* 解析を基盤として、*T. islandicus* Sopp がもつ AQ/BQ 生合成遺伝子クラスターを探索し、**1a** に対する酸化的な修飾反応を担う酵素の同定と機能解析を行うこととした。

2-2. Skyrin の酵素的全合成及び二量化酵素の機能解析

2-2-1. 生合成遺伝子クラスターの探索

T. islandicus が生産するアントラキノン系天然物の生合成遺伝子クラスターを探索するために、**1a** の生合成に関わることが報告されている 3 種の遺伝子 (*claG*, *claF*, *claH*) をクエリーとして Local BLAST 検索を行ったところ、染色体上の異なる位置に、3 種の候補クラスター (cluster 1, 2, 3) が見つかった。その周辺に位置する遺伝子を調べると、異なる種類の修飾酵素遺伝子が存在していた。これは、それぞれの遺伝子によって生産される天然物が異なることを示唆しており、本菌からは 20 種類を超える関連化合物が単離されていることと一致しているように思われた。(Figure 2-5)。

まず、代表的な BQ である **skyrin (2aa)** を生産するための遺伝子を特定すべく、各クラスターに保存されている NR-PKS 遺伝子 (G, G2, G3)、チオエステラーゼ遺伝子 (F, F2, F3)、脱炭酸酵素遺伝子 (H, H2) に注目して、**2aa** の生産が確認された培養条件 (28°C, CYA 培地, 5 日間) で生転写確認を行うと、cluster 1 に位置する 3 つの遺伝子 (*skyG*, *skyF*, *skyH* と命名) の発現が確認された。続いて、cluster 1 に含まれる修飾酵素遺伝子に関して転写活性を調べたところ、チトクローム P450 である *skyM* の発現が確認された (Figure 2-6)。この *skyM* は cladofulvin の生合成において酸化的な 2 量化反応を触媒した *claM* と 37% の相同性を示したことから、本クラスターが **skyrin** の生合成に関与することが示唆された (Figure 2-7)。

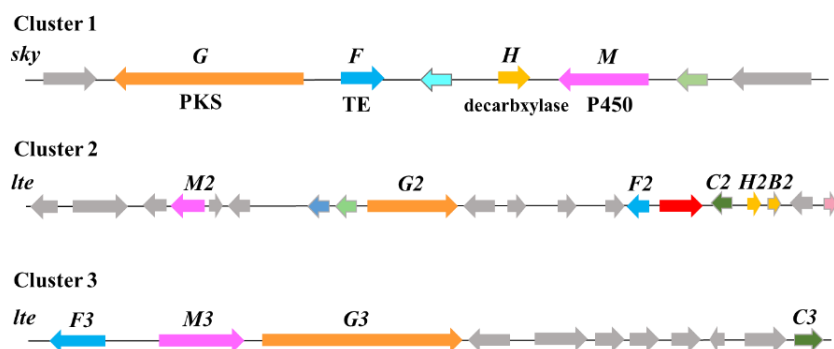


Figure 2-5. 予想生合成遺伝子クラスター

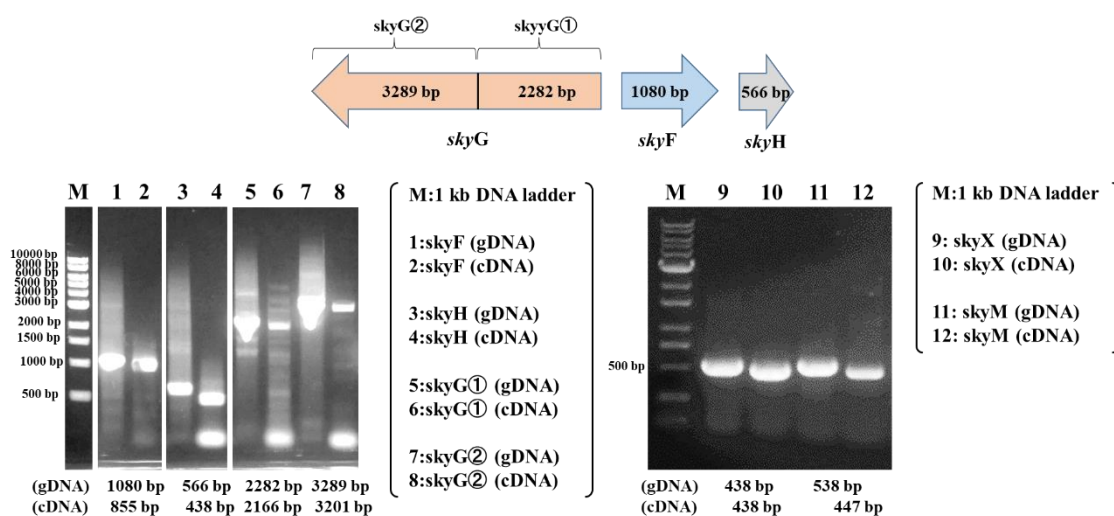


Figure 2-6. 転写確認実験

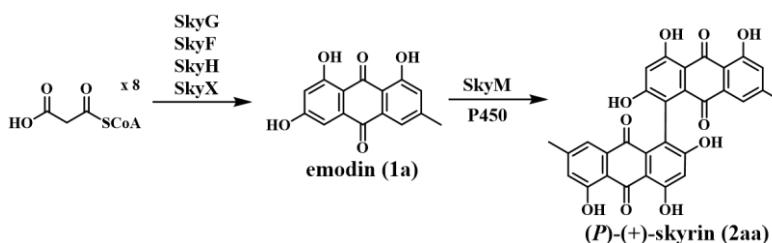


Figure 2-7. (P)-(+)-skyrin 予想生成経路

2-2-2. チトクローム P450 (*skyM*) の機能解析

チトクローム P450 である *SkyM* がアントラキノンの二量化に関与することを確認するため、生産菌における *skyM* 破壊実験を行った。この破壊実験には、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを利用した。本システムでは、ヌクレアーゼ Cas9 とそれを標的的部位に誘導する gRNA が PAM 配列を認識することで、PAM 配列の数塩基上流部で二本鎖が切断される。この状態で、切断された領域と相同的な配列をもつプラスミドが存在すると、切断された箇所に任意の配列を挿入することができるため、標的遺伝子の機能を欠失させることができる (Figure 2-8)。今回は、*Talaromyces islandicus* が neomycin に対して感受性を示したため、neomycin 耐性遺伝子を挿入し、*skyM* 欠損株 (12 株) を取得した。

CRISPR-Cas9

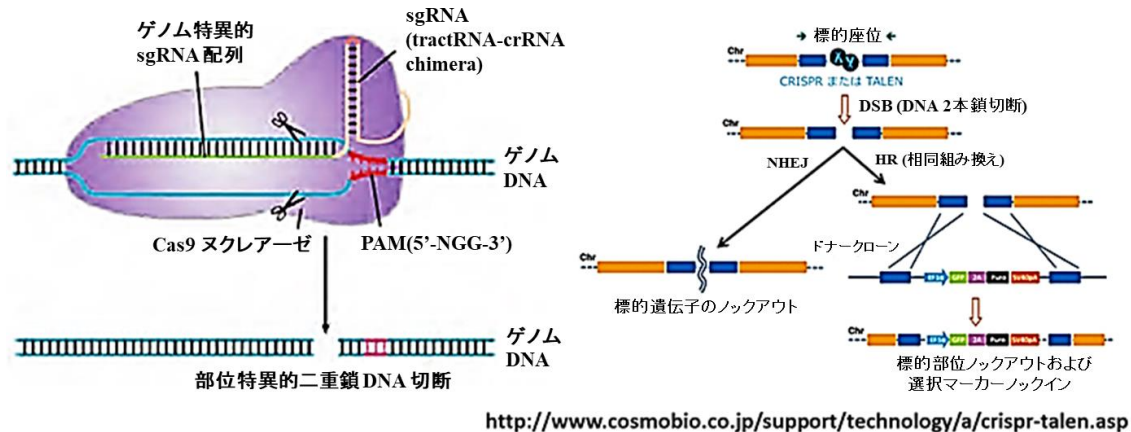


Figure 2-8. CRISPR-Cas9システム

取得した 12 株を CYA 培地に植え継ぎ、その代謝産物を UPLC/MS によって確認した。その結果、12 株中 9 株において、skyrin (**2aa**)の生産が消失した (Figure 2-9)。また、これらの株では、野生株と比較して、単量体である islandicin (**1B**)の生産が増加していた (Figure 2-9)。これは、**2aa** への 2 量化反応が遮断されることで蓄積した emodin が修飾酵素の作用を受けることで **1B** へと変換されたと考えられる(詳細は後述する)。以上の結果をまとめると、SkyM が **1a** の酸化的なカップリング反応を触媒する二量化酵素であることが強く示唆された。

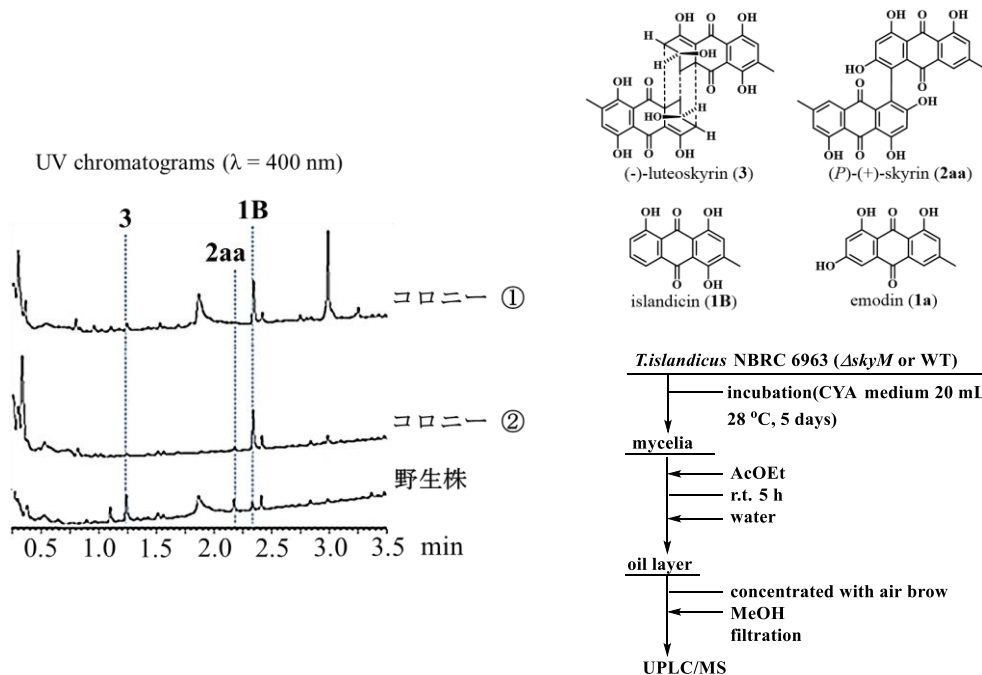


Figure 2-9. 形質転換体の代謝産物UPLC/MS解析結果

2-2-3. 麹菌を用いた emodin 及び skyrin の異種生産

Skyrin (2aa)の生合成に関わる酵素を推定できたことから、次いで、麹菌を宿主とした異種宿主発現を検討した。なお、本実験では、第一世代の遺伝子導入法を用いているため、目的とする遺伝子をもつ形質転換体のスクリーニングが必要である。まず始めに、中間体である **1a** の生産へ向け、*skyG* (NR-PKS)、*skyF* (チオエステラーゼ)、*skyH* (脱炭酸酵素) を麹菌 *A. oryzae* NSAR1 株へと導入することにした。構築したプラスミド (pTAex3-*skyG*、pUSA2-*skyF*、pUSA2-*skyFH*) を Protoplast-PEG 法により、*A. oryzae* NSAR1 野生株へ導入し、2 種の形質転換体 AO-*skyGF* と AO-*skyGFH* を取得した (AO-*skyGF* ; 3 株、AO-*skyGFH* ; 7 株)。取得したコロニーを米 1 g (+Ade)培地で培養すると、AO-*skyGF* においては 2 株 (#2、#3)、AO-*skyGFH* では全ての株において黄色味を帯びており、アントラキノン系天然物の生産が示唆された。その代謝産物を UPLC/MS によって分析した結果、脱炭酸酵素遺伝子を導入していない AO-*skyGF* については上述した 2 株において、先行研究と同様、**emodin (1a)**を含む新たなピークが複数観測された (Figure 2-10)。これらは、endocrocin や atrochrysone、**emodin anthrone** といった経路中間体と予想される (Scheme 1)。また、AO-*skyGFH* については、全ての株において、**1a** を主生成物として観測した (Figure 2-10)。続いて、構築した AO-*skyGFH* に対して、修飾酵素遺伝子 *skyM* と *skyX* を追加導入した (プラスミド : pAdeA2-*skyXM*)。取得した形質転換体 AO-*skyGFHXM* は、プレート上で培養すると、黄色と橙色を示す形質転換体が混在していた。それぞれを 2 株ずつ選択して、その代謝産物を UPLC/MS によって分析した結果、橙色を示す形質転換体は **2aa**、黄色を示す形質転換体は **1a** を生産していた (Figure 2-11)。生成した **2aa** の比旋光度と CD スペクトルは、*P*-(+)-skyrin のものとよく一致した (詳細は後述)。

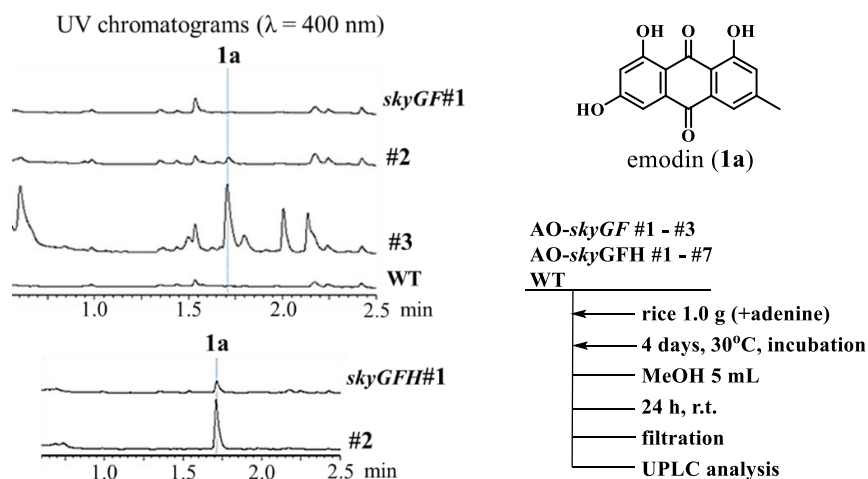
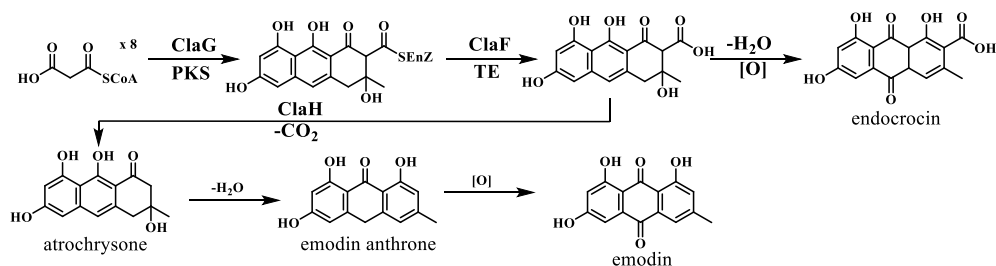


Figure 2-10. AO-*skyGFH*及びAO-*skyGF*の代謝産物UPLC/MS解析結果



Scheme 2-1. 先行研究における emodin 予想生成経路

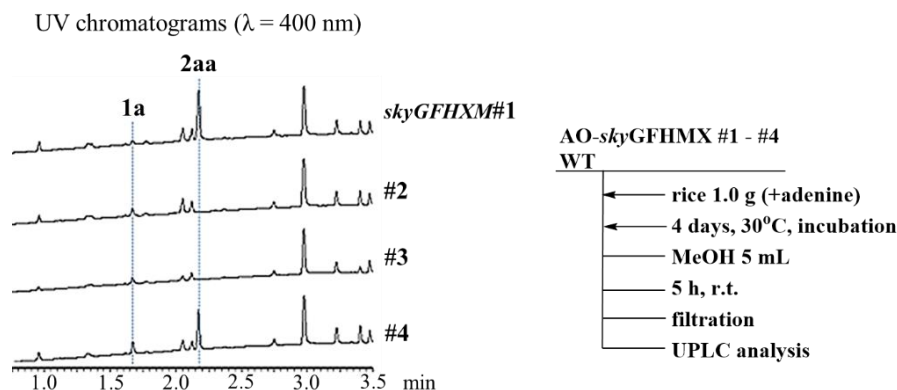
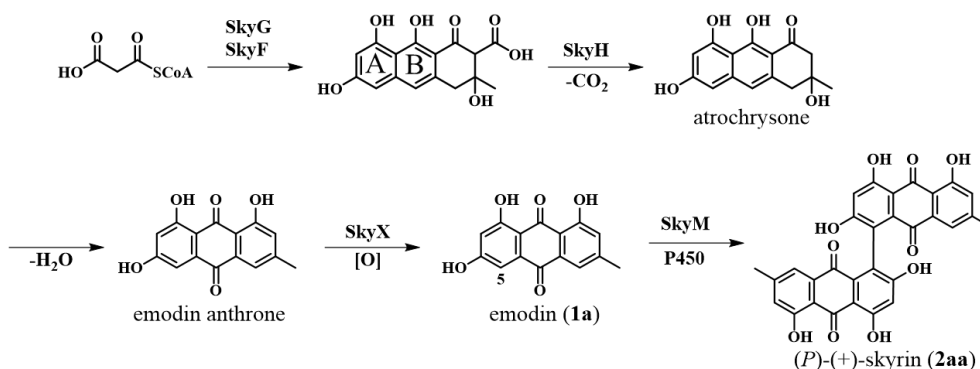
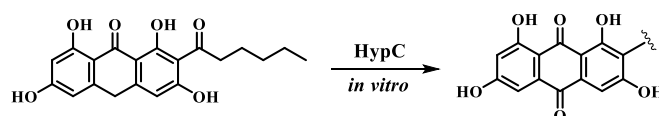


Figure 2-11. AO-skyGFHXMの代謝産物UPLC/MS解析結果

以上の結果から、skyrin の生合成経路を **Scheme 2-2** に示すように推定した。まず、NR-PKS である SkyG がマロニル-CoA を出発物質としてポリケタイド鎖を構築する。続いて、チオエステラーゼである SkyF によるポリケタイド鎖の切り出しと、脱炭酸酵素である SkyH によるカルボン酸部分の脱炭酸反応が段階的に進行して atrochrysone を与える。atrochrysone は、速やかに脱水反応とそれに続く芳香環化を受けることで、emodin anthrone へと変換される。AO-skyGFH から **1a** が単離されたことを考えると、単離の過程で、emodin anthrone が空気酸化をうけて **1a** へと変換されたと考えている (**Scheme 2-2**)。ただし、還元的な環境である生体内においては、キノンへの酸化を触媒する酵素が必要である。この酸化反応には、aflatoxin の生合成においてキノンへの酸化を触媒することが報告されている HypC と相同性を示す SkyX が関与すると予想される (**Scheme 2-3**)。最後に、チトクローム P450 である SkyM が **1a** を基質とした A 環 C5 位での酸化的カップリングを触媒して P-(+)-skyrin を与える。なお、本研究とほぼ時を同じくして、本クラスターに存在する SkyY (アルドケト還元酵素) が SkyM と強調して作用することで rugulosin (**4**)が生産することが報告された¹⁶⁾。以上のことから、同定したクラスターは skyrin/rugulosin の生合成遺伝子クラスターであることがわかった。



Scheme 2-2. Skyrinの推定生成経路



Scheme 2-3. HypCによるキノン酸化反応

2-3. 二量化酵素 SkyM の機能解析

2-3-1. 微生物変換実験による基質特異性の検討

冒頭でも述べたように、*T. islandicus* は 5 種類の単量体からホモカップリング体、ヘテロカップリング体を生産する (Figure 2-4)。その構造に着目すると、いずれの場合においても、A 環の C5 位で炭素-炭素結合が形成されていることがわかる。これより、先に同定した SkyM がこれらのカップリング体の生成に関与していると予想し、*skyM* 単独導入株である AO-*skyM* を用いた微生物変換実験を行うことにした。

skyM 導入株を用いて emodin (1a) を基質とした微生物変換を行ったところ、50%の変換率で skyrin (2aa) への変換が観測された (Figure 2-12)。同様の変換反応を *T. islandicus* から単離されているモノマー (catenarin (1b)、 ω -hydroxyemodin (1c)、chrysophanol (1A)、islandicin (1B)) を基質として行ったところ、1b を用いた場合に対応するホモカップリング体 2bb が生産した。一方、1c、1A、1B においては二量化が進行しなかった (Figure 2-13)。カップリング反応が進行した 1a と 1b は A 環の C6 位に水酸基をもつことに対して、反応が進行しなかった 1A や 1B には水酸基がないことから、この部位が SkyM の基質認識において重要であると考えられた。これを検証するため、1a の A 環 6 位の水酸基をメチル化した phiscion (1d) と chrysazin (1C) を用いて微生物変換を行ったところ、予想通り、二量化体の生成は観測されなかった (Figure 2-14)。A 環の C6 位に水酸基をもつ 1c において反応が進行しなかったのは、C 環のヒドロキシメチル基が SkyM の基質認識において悪影響を与えたためと考えている。さらに、1a と 1b を用いたヘテロカップリングを検討したところ、ホモカップリング体 2aa と 2bb に加えてヘテロカップリング体 2ab の生産を確認した (Figure 2-15)。

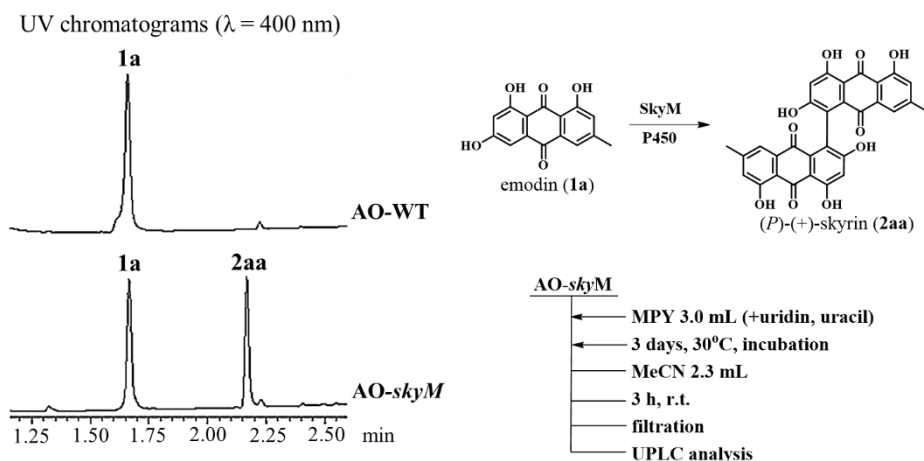


Figure 2-12. *AO-skyM*によるemodin (1a)の微生物変換

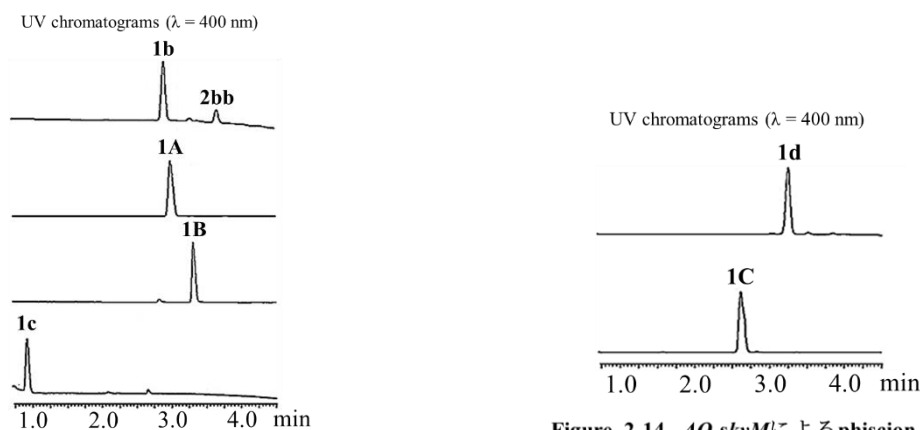


Figure 2-13. *AO-skyM*によるcatenarin (1b)、 ω -hydroxyemodin (1c)、chrysophanol (1A)、islandicin (1B)の微生物変換

Figure 2-14. *AO-skyM*によるphiscion (1d)とchrysazin (1C)の微生物変換

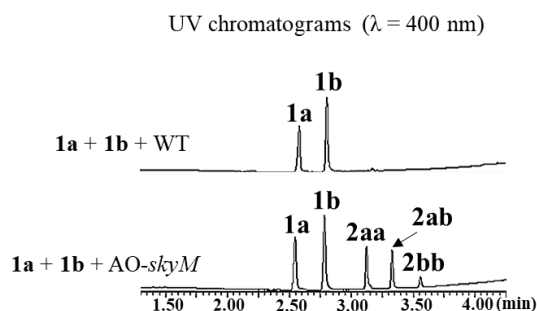


Figure 2-15. *AO-skyM*によるemodin (1a)とcatenarin (1b)の混合基質の微生物変換

続いて、生成した2量体の軸不斉について検討した。一連の天然物の軸不斉は、2つの芳香族発色団間の励起子相互作用によって生じる255 nm付近に観測されるビシグネートなCotton効果(bisignate cotton effect)から判断できると報告されている¹⁷⁾。単離した(P)-(+)-2aaは、最初に強い正のコットン効果を示し、その後、負のコットン効果を示した(Figure 2-16)。2abについても同様のCDスペクトルが観察された(Figure 2-16)。一方、2bbでは真逆のCDスペクトルが観察された(Figure 2-16)。これらの結果から、2abの軸不斉をP、

2bb の軸不斉を *M* と決定した。これらの結果は、単量体の構造上の違いが、SkyM 触媒による二量化反応のエナンチオ選択性に影響を与えることを示唆している。また、*T. islandicus* から単離された BQs は、すべて *P* 体であるが知られている¹⁸⁾。以上の結果から、天然から単離された(*P*)-(+)-**2bb** の合成には、SkyM とは異なる酵素が関与していることが強く示唆された。

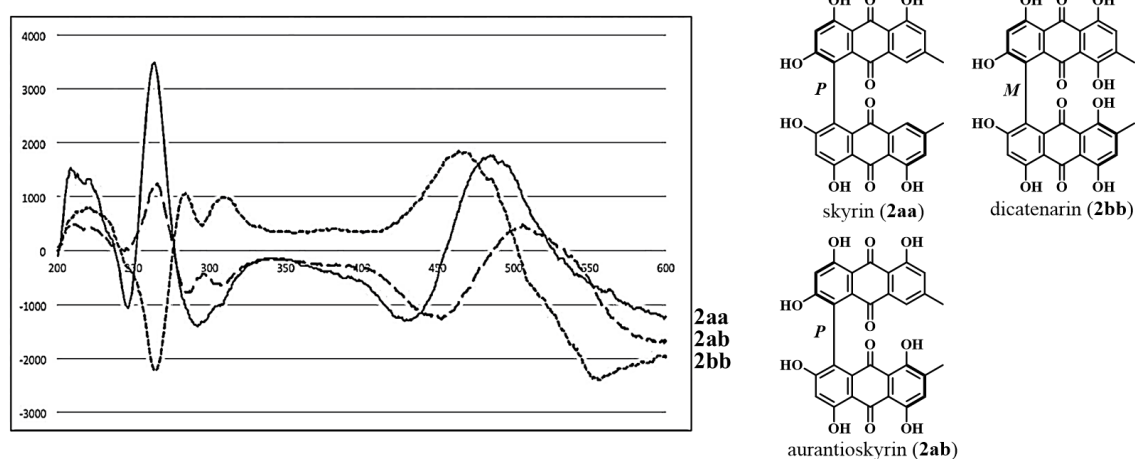
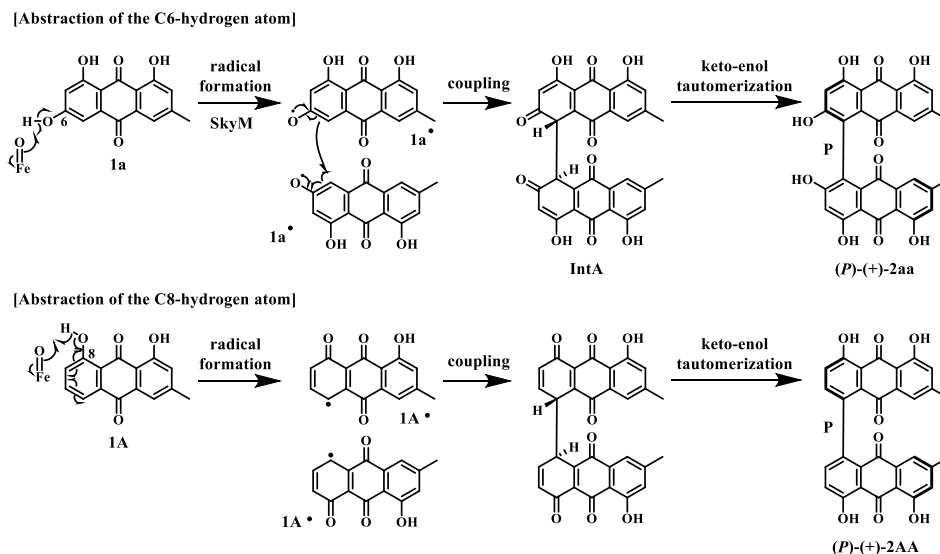


Figure 2-16. SkyM生成物の軸不斉

2-3-2. 推定反応機構

SkyM は、チトクローム P450 に分類される酸化酵素である。本酵素は、強力な酸化活性種であるオキシフェリル ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) ポルフィリン π -カチオンラジカル (Compound I) を発生し、これが基質から水素を引き抜くことで、様々な反応を触媒することが知られている¹⁹⁾。この基本的な反応機構に加えて、A 環 6 位の水酸基が SkyM の触媒するカップリング反応において重要であることを考慮すると、**Scheme 2-4** に示す反応機構が推定される。すなわち、先の活性種が単量体の C6 位水酸基から水素を引き抜いた後、生成したフェノキシラジカル間で炭素-炭素結合の形成が進行すると考えられる (**Scheme 2-4**)。生成した **2aa** は *P* 体であったことから、SkyM の二量化反応は、エナンチオ選択的に進行することが明らかになった。この選択性は、**1a** ラジカル同士がカップリングすることで生じる **IntA** の中心不斉が最終生成物である(*P*)-(+)-**2aa** の軸不斉へと伝播されること生じたと推定している。一方、天然物の中には、C6 位に水酸基をもたない単量体から生成したと考えられる 2 量体も存在する。提唱した反応機構と類似した反応が進行しているならば、C8 位水酸基から水素ラジカルが引き抜かれることでカップリング反応が進行すると考えられる。今後、SkyM や類縁酵素の立体構造解析などが進むことにより、提唱した反応機構の証明やエナンチオ選択性に対する理解が進むと期待される。



Scheme 2-4. SkyMの推定二量化機構

2-4. chrysophanol 生合成経路の解明

2-4-1. 生合成遺伝子の探索

emodin (1a)を共通の中間体として持つ monodictyphenone¹¹⁾と cladofulvin¹²⁾の生合成遺伝子クラスターを比較したところ、機能解析済みの還元酵素 Cに加え、別のタイプの還元酵素遺伝子 Kと、脱水酵素 Bが保存されていた (Figure 2-17)。これら3種の酵素は、共通の中間体である chrysophanol (1A)の生合成に関与することが予想される。そこで、この KCB をクエリーとして *Talaromyces islandicus* でクラスターを探索したところ、上述した cluster 2 には K 遺伝子 (*chrK* と命名) と C 遺伝子 (*chrC* と命名)、cluster 3 には C 遺伝子と B 遺伝子 (*chrB* と命名) が見つかった (Figure 2-18)。

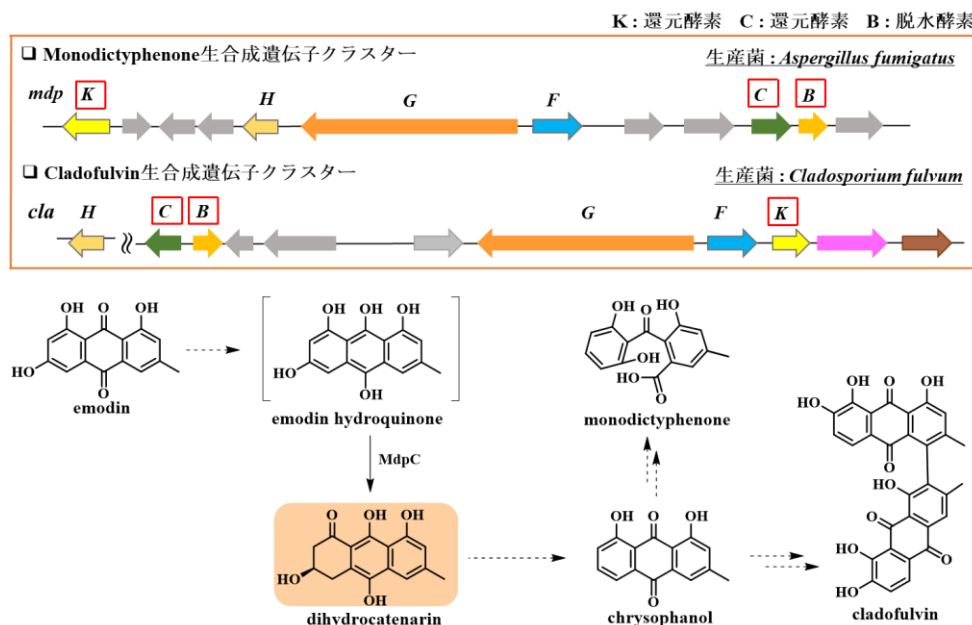
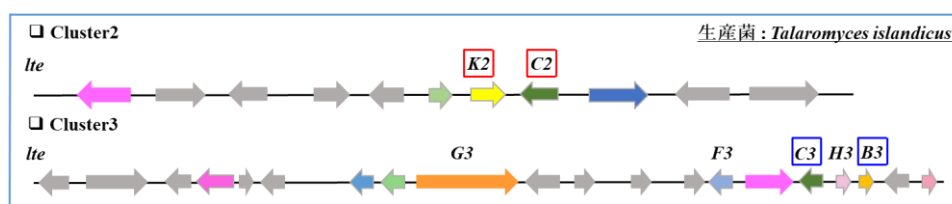


Figure 2-17. 遺伝子クラスターの比較



Chrysophanol 予想生成経路

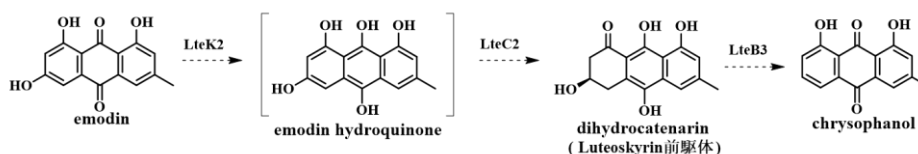


Figure 2-18. Chrysophanol予想生成経路

2-4-2. 生合成酵素の機能解析

各遺伝子の機能を確認するため、emodin (**1a**)を用いた微生物変換実験を行うことにした。構築した2種の形質転換体 (AO-*chrKC*、AO-*chrCB*、AO-*chrKCB*) に対して **1a** を投与したところ、AO-*chrKCB* を用いた場合のみ、chrysophanol (**1A**)の生産を確認できた (Figure 2-19)。これよりこれら3つの酵素 ChrK、ChrC、ChrB が **1a** から **1A** への反応を触媒していることが強く示唆された。続いて、各酵素の機能解析を行うため組み換え酵素を用いた *in vitro* 実験を行った。ChrK、ChrC、ChrB 存在下、**1a** と補酵素 (NADPH、NADH) をインキュベートしたところ、**1A** への変換が観測された。また、**1a** から化学的に調製した emodin hydroquinone を基質とした場合には、ChrC、ChrB だけで **1A** への変換が観測された (Figure 2-20)。これより、ChrK が初発の還元反応に関与しており、emodin hydroquinone を生成物として与えることも明らかになった。

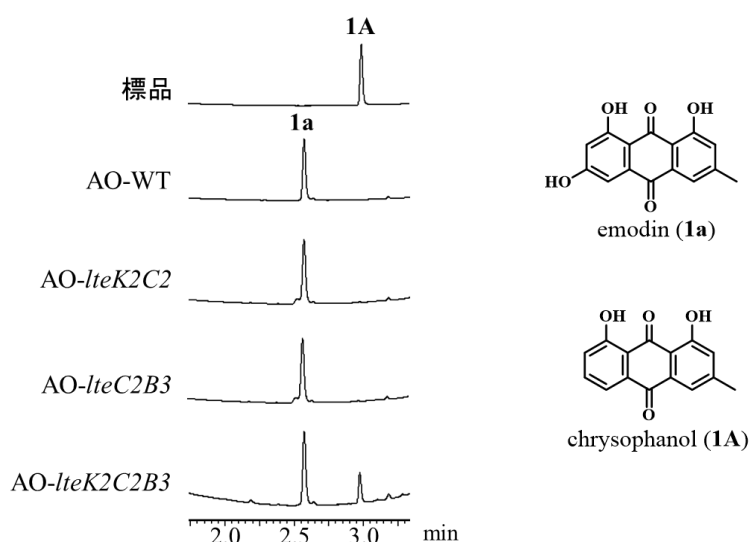


Figure 2-19. AO-*chrK/C/B*を使った微生物変換

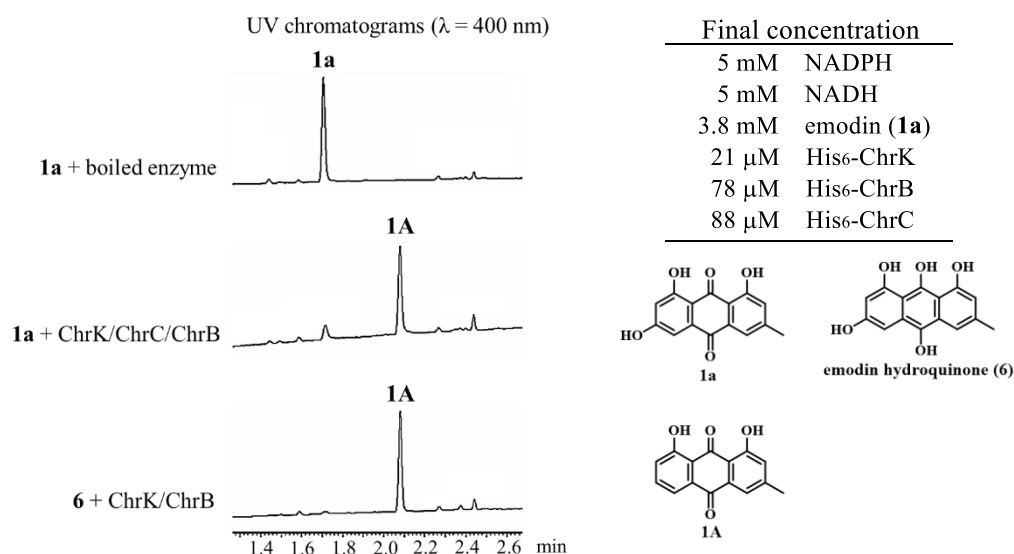
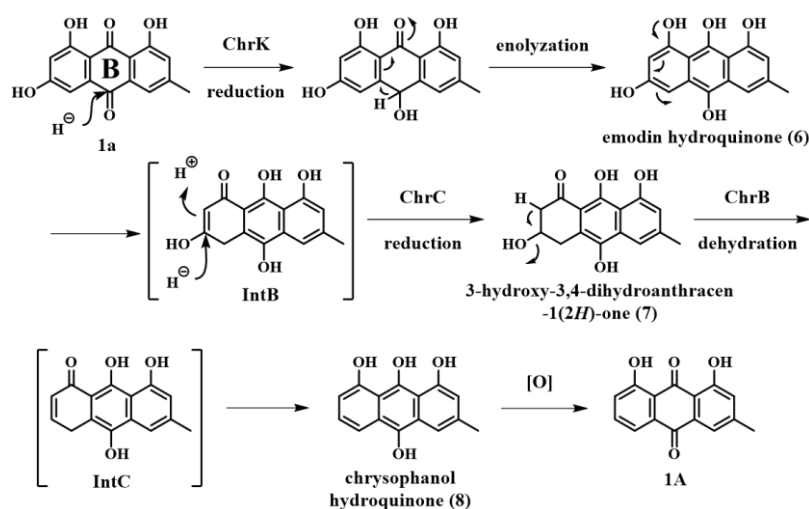


Figure 2-20. ChrK/ChrC/ChrBのin vitro酵素反応

2-4-3. 推定反応機構

本実験結果と先行研究の結果を考慮すると、**1a** から **1A** への推定生合成経路は **Scheme 2-5** のように推定される。まず始めに、**1a** の B 環上のカルボニル基が還元酵素 ChrK の作用により還元され、emodin hydroquinone (**6**) が生成する。次に、**6** の互変異性化により **IntB** が生成し、次いで、還元酵素 ChrC が 1,4-還元反応を触媒することで、3-hydroxy-3,4-dihydroanthracen-1(2H)-one (**7**) が生成する。最後に、脱水酵素 ChrB が脱水反応を触媒して **IntC** を与え、互変異性化によって chrysophanol hydroquinone (**8**) が生成する。最後に空気酸化によってキノンへと酸化されることで **1A** が生じる (**Scheme 2-5**)。なお、**1A** は、二量化酵素遺伝子 *skyM* 破壊実験において蓄積した **1B** の前駆体であると考えられるため、破壊により蓄積した **1a** はこの経路の基質として利用されたと予想される。

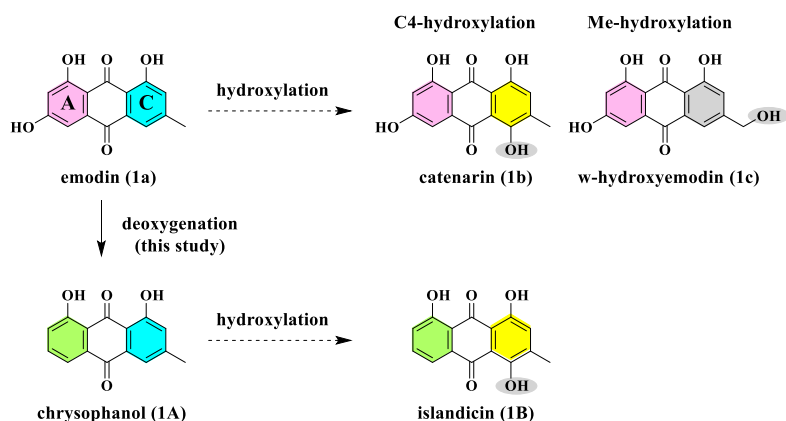


Scheme 2-5. chrysophanol (1A)推定生合成経路

2-5. AQ/BQ の生合成についての考察

emodin (**1a**)は、AQs や BQs を合成するための重要な生合成中間体である。本論文でその酸化的修飾反応について検討した結果、A 環上で脱酸素化が進行した chrysophanol (**1A**)への変換反応とそれに関わる 3 種の酵素の機能解析に成功した。これら 3 種の酵素は、染色体上の別々の領域に存在しており、その周辺には、機能未解明の酸化酵素遺伝子が存在する。こうした機能未解明の酸化酵素は、他単量体 (**1b**、**1c**、**1B**) への変換反応に関与していると考えている (Scheme 2-6)。また、脱酸素化と酸化反応により一連の化合物が生成するというこの生合成仮説は、他糸状菌が生産する構造類縁体の生合成も上手く説明できる仮説である。

こうして生成した単量体は、C5 位での酸化的なカップリング反応により skyrin に代表される 2 量体へと変換される。本反応を触媒する SkyM は、C5 位に水酸基をもつ基質を受容する酵素であるが、*T. islandicus* が生産する 12 種類ものカップリング体の中には、C5 位に水酸基をもたないカップリング体も存在する。そこで、SkyM の類縁酵素を探索したが、*T. islandicus* のゲノム上には類縁酵素がみつからなかった。従って、dinapinone の生合成²⁰⁾でカップリング反応を触媒する multicoppor oxidase のような別の種類の酵素が関与している可能性が示唆された。



Scheme 2-6. AQs推定生合成経路

2-6. まとめ

本章では、麹菌異種宿主発現系、微生物変換実験、組み換え酵素を用いた *in vitro* 解析により、*T. islandicus* が生産するアントラキノン系天然物（単量体：emodin (**1a**)、chrysophanol (**1A**)、2 量体：skyrin (**2aa**)、dicatenarin (**2bb**)、aurantioskyrin (**2ab**)) の生合成に関わる鍵酵素の同定と機能解析に成功した。これにより、脱酸素化-酸化による A/C 環の修飾、その後のカップリング反応による 2 量体の生成という構造多様性構築機構を提唱するに至った。また、これらの酵素の同定により、*T. islandicus* においては、skyrin 生合成に関わる 5 つの酵素遺伝子と chrysophanol 生合成に関わる 3 つの酵素遺伝子が染色体上の別々の locus に存在していることがわかった。一般に、類縁体の生合成に関わる遺伝子のセットは染色体上の特定の locus にまとまって存在していることを考えると、

3箇所の locus にわかれて生合成遺伝子が存在しているのは珍しい例である。これは、*T. islandicus* が 20 種類以上の類縁体を生産することと関連している可能性が高いと考えており、その意義や理由の解明は、天然物の構造変化（＝化学進化）に対する理解につながるのではないかと考えている。

2-7. 実験部 (skyrin)

2-7-1. 培地

LB (agar) medium: 1% Trypton, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl (, 1.5% Agar)

MPY medium : 3% Maltose, 1% Polypeptone, 0.5% Yeast Extract

DPY medium : 2% Dextrin, 1% Polypeptone, 0.5% Yeast Extract

PG medium : 20% Potate, 2% Glucose (, 1.5% Agar)

CD agar medium : 3.5% Czapek-Dox, 4.6% NaCl, 1.5% Agar

Rice medium : 100 g Polished rice, 10 mg Adenine

CYA medium: Czapek-Dox 10 ml, Sucrose 30 g, Trace elements 1 ml, Yeast extract (Carl Roth) 5 g, dH₂O 1000 ml (pH 6.3±0.2)

PG (+ hyg) medium : 20% Potate, 2% Glucose (, 1.5% Agar), 1.2 M sorbitol, 100 µg/mL hygromycin

2-7-2. 機器

- Thermal cycler : S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories), MINIAMP PLUS THERMAL CYCLER A37835 (ライフテクノロジー)

- 遠心機 : X-307 Inverter High Speed Refrigerated Micro Centrifuge (Tomy), Avanti J-E (Beckman Coulter), Centrifuge 5417C (Eppendorf), Centrifuge CT15RE (himac), High Speed Refrigerated Centrifuge CR22N (HITACHI), MDX-310 High Speed Refrigerated Micro Centrifuge (Tomy)

- Autoclave : LSX-700 High Pressure Steam Sterilizer (Tomy)

- UV spectrometer : Lambda 25 (Perkin Elmer)

- pH meter : Docu-pH+ Meter (Sartorius)

- ゲル撮影機 : FAS-301 (TOYOBO)

- 超音波破碎装置 : ULTRASONIC DISRUPTOR UR-200P (TOMY)

- MiliQ 水製造装置 : Simplicity UV (Merck Milipore)

- Incubator : EYELATRON FLI-301, EYELATRON FLI-301N (EYELA), incubator MR-200 (Takasaki), BioShaker M・BR-024 (TAITEC)

- UPLC : PDA D16UPL246A (Waters), SM-FTN G16SD1273G (Waters), QSM H6QSM446A (Waters), CHA G16CHA533G (Waters), PC PCBDVGP (Waters)

- UPLC/MS : PC S4AMAFR (Waters), Maslynx MS5HA01503 (Waters), QSM H15QSM374A (Waters), FTN H15SDI049G (Waters), CH-A G15CHA415G (Waters), QDa KAB1285 (Waters), N₂ 980330915 (Waters), ロータリーポンプ 40065505 (Waters), PDA F16UPL372A (Waters)

- NMR : Bruker DRX 500 (¹H, 500 MHz)

- 分析用薄層クロマトグラフィ TLC : MERCK 25 TLC plates 20 x 20 Silica gel 60F

- シリカゲルクロマトグラフィ : Silica gel 60N (球状 40-50µm, KANTO CHEMICAL)

2-7-4. 使用した培地と試薬の作り方

2-7-4-1. 使用した培地

I) LB (Luria-Bertani) 培地

この培地は大腸菌の培養に用いた。

500 mL三角フラスコにLB broth を7.5 g 加え、300 mLの脱イオン水に溶解させた。10 mLプラスチックチューブに3 mLずつ分注し、アルミホイルで蓋をしてオートクレーブ滅菌した。

II) LB寒天培地

この培地は形質転換後の大腸菌の選択培地に利用した。

500 mL三角フラスコにLB broth を7.5 gと粉末寒天を4.5 g加え、300 mLの脱イオン水に溶解させた。オートクレーブ滅菌し、クリーンベンチ内でampicillin (100 µg/µl)を300 µl加え、攪拌し、丸型シャーレに約25 mLずつ分注した。

III) PG (potate glucose) 培地

この培地は、生産菌の培養に使用した。

じゃがいも500 gを購入し、皮をむいて4-6分の1にカットして重量を測定した。5 Lの三角フラスコにじゃがいもを入れ、じゃがいも200 gあたり脱イオン水を1 L加えてオートクレーブ滅菌した。ガーゼかミラクロスで煮汁を濾しとった。煮汁1 L あたりD-グルコースを20 g加えて溶解させた。500 mL三角フラスコに100 mLずつ分注し、綿栓の上にアルミホイルで蓋をしてオートクレーブ滅菌した。

IV) PGA (potate glucose agar) 培地

この培地は、麴菌の孢子回収及び生産菌の種培養に使用した。

III) で得たグルコース入りの煮汁に、100 mL あたり1.5 gの粉末寒天と10 mg のアデニンを加え、ねじ口瓶でオートクレーブ滅菌した。その後、クリーンベンチ内で角型シャーレに50 mLずつ及び、丸型シャーレに約25 mLずつ分注した。

V) PG (potate glucose) + hygromycin 培地

この培地は、麴菌や生産菌の形質転換体を培養するのに用いた。

III) で得たグルコース入りの煮汁に、100 mL あたり1.5 gの粉末寒天と10 mg のアデニンを加え、ねじ口瓶でオートクレーブ滅菌した。その後、人肌程度の温度まで冷やし、クリーンベンチ内でhygromycin(100 mg/ml)を終濃度100 µg/mlとなるように加え、よく攪拌し、クリーンベンチ内で丸型シャーレに約25 mLずつ分注した。

VI) DPY 培地

この培地は、形質転換する麴菌を培養するのに使用した。

500 mL三角フラスコにデキストリン 2 g、ポリペプトン 1 g、イーストエキストラクト 0.5 g を加え、脱イオン水100 mLに溶解させた。植菌する麴菌の栄養要求性により、以下の分量で栄養素を追加して、pHを 5.5 ± 0.2 に合わせ、オートクレーブ滅菌した。*pyrG* 欠損株：メチオニン 150 mg、硫酸アンモニウム 925 mg、ウリジン 450 mg、ウラシル 200 mg 形質転換体：メチオニン 150 mg、硫酸アンモニウム 925 mg

VII) MPY 培地

この培地は、形質転換を行った麴菌のゲノムDNAの抽出、もしくは代謝産物の抽出の際に使用した。

作り方はDPY培地のデキストリン 2 gの代わりにマルトース 3 gを加えて作製した。

VIII) Czapek-Dox 選択培地

この培地は、形質転換体のスクリーニングに使用した。

500 mL三角フラスコにCzapek-Dox broth 7.0 g、NaCl 9.2 g、粉末寒天を3 gと、作製する形質転換体に対応する栄養素を加え、脱イオン水200 mLで溶解させた。オートクレーブ滅菌の後、クリーンベンチ内で丸型シャーレに約25 mL ずつ分注した。

IX) 米培地

この培地は主に、麴菌形質転換体より代謝産物を得るために使用した。

500 mLの三角フラスコに、予め脱イオン水に一晩浸漬させた米 100 g とウリジン 450 mg、ウラシル 200 mg を加え、脱イオン水を10 mL加えて栄養素が米全体にいきわたるように攪拌した。綿栓とアルミホイルで蓋をしてオートクレーブ滅菌した。(大スケール)

試験管に、予め脱イオン水に一晩浸漬させた米 1 g とアデニンをスパチュラ1匙加え、脱イオン水を500 μ l加えてアデニンが米全体にいきわたるように攪拌した。綿栓とアルミホイルで蓋をしてオートクレーブ滅菌した。(小スケール)

X) CYA培地

この培地は*Talaromyces islandicus* NBRC6963株及びその破壊株を培養するために用いた。

三角フラスコにCzapek stock 10 ml、Sucrose 30 g、Trace elements 1 ml、Yeast extract(Carl Roth) 5 g、dH₂O 1000 mlを加え攪拌し溶解させ、pHを 6.3 ± 0.2 に合わせた。その後、三角フラスコに適当量分注し、アルミホイルで蓋をしてオートクレーブした。

2-7-4-2. 調製した試薬 (%は全てw/v)

I) Buffer R (DNA抽出用バッファー)

ゲノムDNAの抽出に用いた。

0.5 M NaCl, 1% SDS, 20 mM EDTA, 0.4 M Tris-HCl, pH 8.0, オートクレーブで滅菌。

II) sol I

大腸菌のミニプレップで、大腸菌を懸濁させるのに用いた。

10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 50 mM glucose, pH 8.0に調製しオートクレーブで滅菌。

III) sol II

大腸菌のミニプレップで、菌体を塩基で溶解させるのに用いた。

4 g NaOH, 5 g SDS, up to 500 mL (オートクレーブ不要)

IV) sol III

大腸菌のミニプレップで、solIIの中和に用いた。

147.3 g potassium acetate, 60 mL acetate, up to 500 mL (オートクレーブ不要)

V) PEG solution

大腸菌のミニプレップで、プラスミドを沈殿させるのに用いた。

20% PEG6000, 2.5 M NaCl, オートクレーブで滅菌。

VI) solution 0

麹菌の形質転換で、細胞壁消化酵素Yatalase溶液を調製するのに用いた。

0.8 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, pH 6.0, オートクレーブで滅菌。

VII) solution 2

麹菌の形質転換で、プロトプラストを懸濁させるのに用いた。

0.8 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, オートクレーブで滅菌。

VIII) solution 3

麹菌の形質転換で、プラスミドを麹菌に導入する時に用いた。

40% PEG4000, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, フィルター滅菌。(Sartorius stedim bioteth, Minisart®, 0.20 μm, 青色)

IX) 孢子懸濁液

麹菌の孢子を保存するために用いた。

0.1 Tween80, 0.8% NaCl, フィルター滅菌。(Sartorius stedim bioteth, Minisart®, 0.20 μ m, 青色)

X) Trace elements stock solution

CYA培地の作製で用いた。

CuSO₄ · 5H₂O 0.5 g, ZnSO₄ · 7H₂O 1 g, dH₂O 100 mlを三角フラスコに入れ攪拌。(store at 4-10°C)

XI) osmotic buffer

生産菌の形質転換で用いた。

1.2 M MgSO₄, 10 mM KH₂PO₄の溶液を適当量調製し、pHを5.8に調製し、オートクレーブで滅菌。

XII) STC buffer

生産菌の形質転換で用いた。

1.2 M sorbitol, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HClの溶液を適当量調製し、pHを7.5に調製し、オートクレーブで滅菌。

XIII) separation buffer

生産菌の形質転換で用いた。

0.6 M sorbitol, 100 mM Tris-HClの溶液を適当量調製し、pHを7.0に調製し、オートクレーブで滅菌。

2-7-4-3. 使用した市販試薬

DNase: DNase I (RNase free) (Nippon gene)

RNase: Ribonuclease A (Biochemical grade, nacalai tesque)

In-Fusion試薬: In-Fusion® HD Cloning Kit (TaKaRa)

Gibson Assembly試薬: Gibson Assembly® Cloning Kit (New England Biolabs)

逆転写酵素: PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa)

RNA抽出試薬: TRIzol® reagent (Thermo fischer scientific)

DNA増幅 (プラスミド構築用): KOD-Plus-Neo (TOYOBO)

DNA増幅 (発現・インテグレーション確認用): KOD FX Neo (TOYOBO)

糸状菌細胞壁溶解酵素: Yatalase (TaKaRa)

Gap-Repair cloningキット: GeneArt® High-Order Genetic Assembly System (invitrogen)

高形質転換効率大腸菌: *E. coli* HST08 Premium Electro-Cells (TaKaRa)

タンパク質定量: Quick Start™ Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories)

2-7-5. ゲノムDNAの抽出

菌体を0.5 g 程度取り、水分をキムワイプで除去した。2 mLセーフロックチューブに菌体とクラッシャーを入れ、菌体がクラッシャーにつかないように注意しつつ、液体窒素でエッペンごと凍結させた。凍結させたエッペンチューブを手動簡易破碎器具SK-ミルにセットし、1分間激しく振った。エッペンチューブを取り出し、エッペンチューブの側面をピンセットなどで軽くはたき、クラッシャーに張り付いている菌体をエッペンチューブの底に落とした。クラッシャーを取り出し、DNA抽出用バッファーを500 μ L加えた。続いて当量のクロロパンを加えてボルテックスで激しく攪拌した。65 $^{\circ}$ Cの湯浴で1時間振盪し、遠心分離 (13,000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を別の1.5 mLエッペンチューブに移した。この上清にRNase (20 mg/mL) を3 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで1時間30分静置した。RNaseを失活させるために、上清と等量のクロロパンを加え、ボルテックスで激しく攪拌した後に遠心分離 (13,000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) し、上清を別のエッペンチューブに移した。この操作をもう一度繰り返した。得られた上清に等量のクロロホルムを加えてボルテックスで激しく攪拌し、遠心分離 (13,000 rpm, 5 min, 4 $^{\circ}$ C) して上清を別のエッペンチューブに移した。得られた上清に10分の1量の3 M酢酸ナトリウム水溶液を加え、等量の冷イソプロパノールを加えてボルテックスで激しく攪拌して遠心分離(13,000 rpm, 15 min, 4 $^{\circ}$ C)し、ゲノムDNAを沈殿させた。脱塩のため、70% 冷エタノールでリンスし、乾燥させた。得られた白色固体をTEに溶解させ、65 $^{\circ}$ Cの湯浴で30 分間振盪し、ゲノムDNA溶液とした。

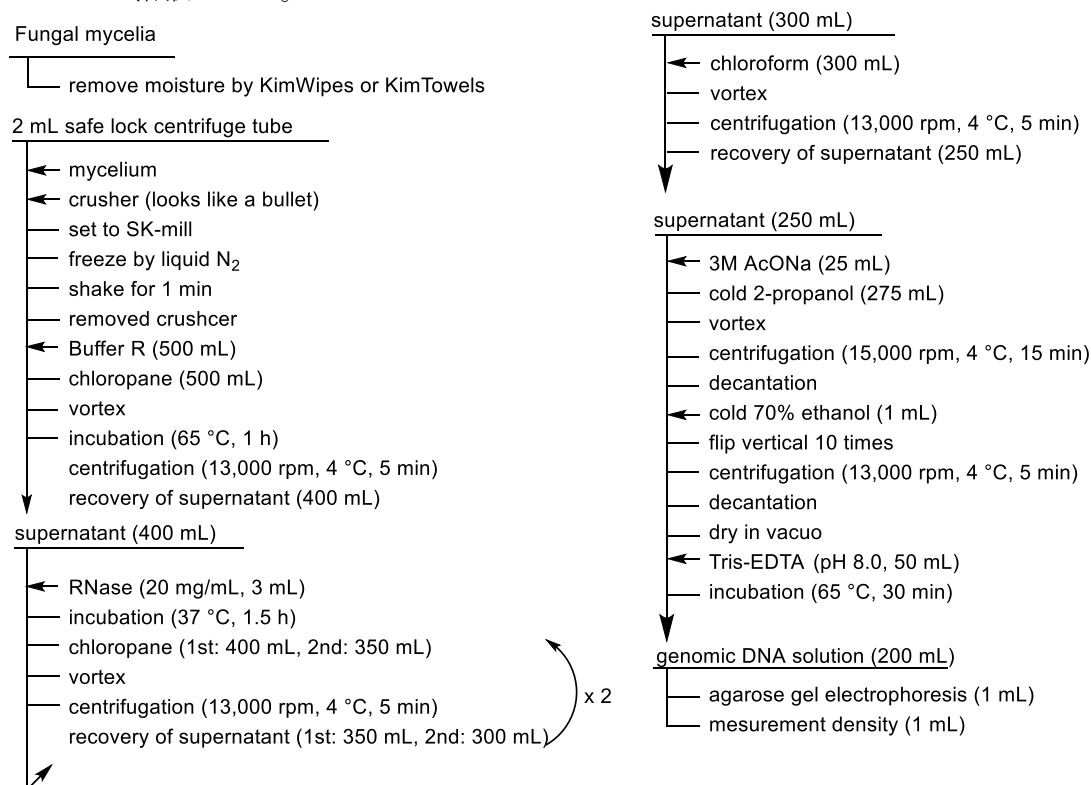


Figure 2-21. ゲノムDNA抽出スキーム

2-7-6. total RNAの抽出

菌体を0.5 g 程度取り、水分をキムワイプで除去した。2 mLセーフロックチューブに菌体とクラッシャーを入れ、菌体がクラッシャーにつかないように注意しつつ、液体窒素でエッペンごと凍結させた。凍結させたエッペンチューブを手動簡易破碎器具SK-ミルにセットし、1分間激しく振った。エッペンチューブを取り出し、エッペンチューブの側面をピンセットなどで軽くはたき、クラッシャーに張り付いている菌体をエッペンチューブの底に落とした。クラッシャーを取り出し、TRIzol試薬を1 mL加えた。タッピングで菌体を十分に懸濁させた後、室温で5 分間静置した。続いて遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) により菌体残渣を沈殿させ上清を回収し、当量のクロロホルムを加えてボルテックスで激しく攪拌した。室温で3 分間静置した後に遠心分離 (15,000 rpm, 15 min, 4 °C) し上清を450 μ L (このとき中間層にDNAが存在しているため、遠心分離後はエッペンチューブに対する過度な振動を避け、上清を吸い過ぎないように注意する) 回収した。これに対し等量のクロロパンによる抽出を2 回繰り返す、得られた上清300 μ L からtotal RNAをイソプロパノールにより沈殿させた。冷70%エタノールでリンスした後に、乾燥させた。得られた白色ペレットをsp waterに溶解させ、total RNAを0.50 μ g/ μ L及び、0.10 μ g/ μ L得た。

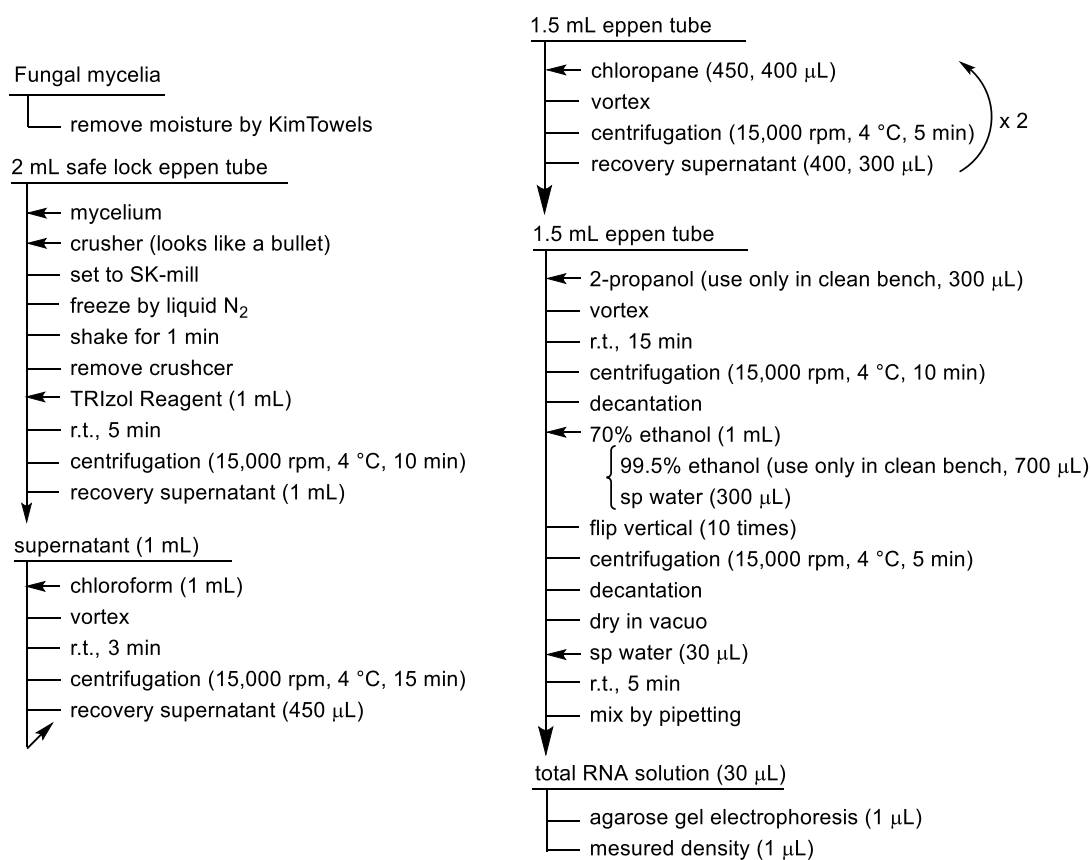


Figure 2-22. Total RNA抽出スキーム

また、得られたtotal RNAをテンプレートとして以下のように逆転写しcDNAを得た。
逆転写試薬はPrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) を用いた。

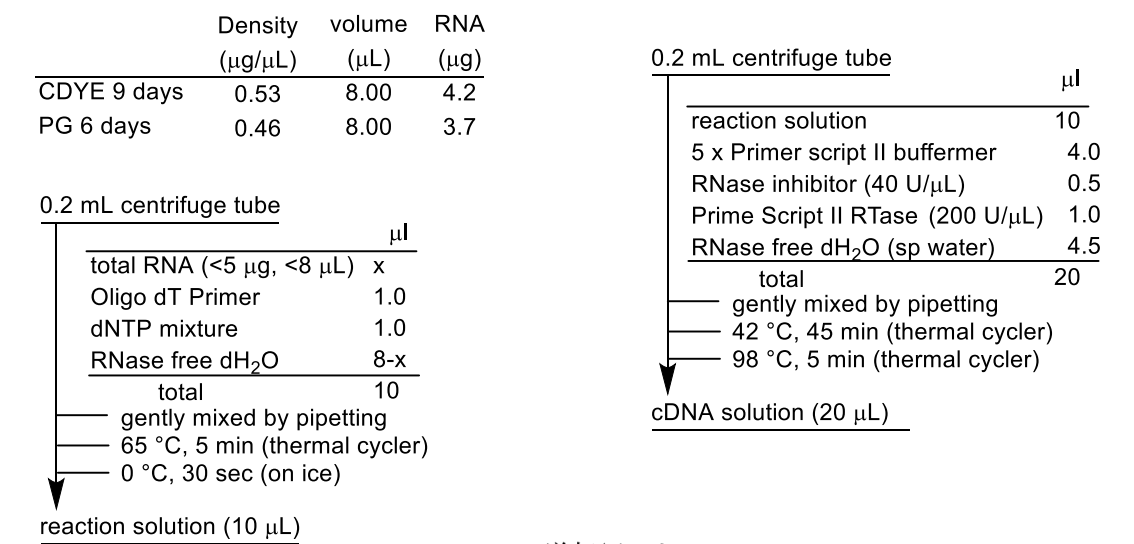
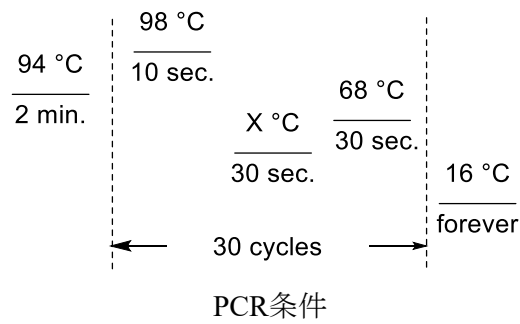


Figure 2-23. 逆転写スキーム

2-7-7. *Talaromyces islandicus* NBRC6963株の染色体上に存在するPKS及びチオエステラーゼ,脱炭酸酵素の発現確認

発現確認は*Talaromyces islandicus* NBRC6963株のcDNAをテンプレートとしてRT-PCRにより行った。酵素はKOD FX Neo (TOYOBO) を使用した。

	volume (μL)
2 x PCR Buffer for KOD FX Neo	6.5
2.0 mM dNTP mixture	2.5
template DNA (<i>Talaromyces islandicus</i> NBRC6963 株 cDNA, CYA medium, 5 days; RNA 50 ng/□L)	1
Primer Forward (10 □M)	0.25
Primer Reverse (10 □M)	0.25
KOD FX Neo DNA polymerase	0.25
sp water	2.25
total	13



gene	Sequence 5'-3'	Size (bp)	
		gDN A	cDN A
<i>skyG</i> -Fr1 100% match	F:ATGCCCATCTATACCCCTACCACAAGCTCA	2282	2166
	R:CTGCATCTCCTCATGGTCTCCGGCCTGCGTGC		
<i>skyG</i> Fr1	F:CGGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATGCCCATCTATACCCCTAC	2282	2166
	R:CTGCATCTCCTCATGGTCTCCGGCCTGCGTGC		
<i>skyG</i> Fr2	F:GCACGCAGGCCGAGACCATGAGGAGATGCAG	3289	3201
	R:ACCCTTCACGAGCTACTACAGATCCCCGGGTAACTATAATATTCATCC		
<i>skyF</i> 100% match	F:ATGGGGGACGACAAAAGAGGCTATCGACAG	1080	855
	R:TCATGTAGGAATTTTCGTGAACATGCACATT		
<i>skyF</i>	F:TAGCGGCCGCACTAGTATGGGGGACGACAAAAGAGG	1080	855
	R:ACTACAGATCCCCGGGTACCTTATGATTGCAAGCCTTGAAG		
<i>skyH</i> 100% match	F:ATGGCCATCGTCGACAAGCCCCAGGACACT	566	438
	R:TTATGATTGCAAGCCTTGAAGCCGTCCAC		
<i>skyH</i>	F:CGGAATTCGAGCTCGGTACCATGGCCATCGTCGACAAGCC	566	438
	R:ACTACAGATCCCCGGGTACCTTATGATTGCAAGCCTTGAAG		

2-7-8. Cluster2及びCluster3の修飾酵素遺伝子の発現確認

発現確認は*Talaromyces islandicus* NBRC6963株のcDNAをテンプレートとして6-8と同様の条件でRT-PCRにより行った。

・ Cluster2のプライマーリスト

gene	Sequence 5'-3'	Size (bp)	
		gDNA	cDNA
skyM2	F: AAAAGTGGTGTGGTACAGCACTCAGATTTG	798	642
	R: TGAACCTAGACGAGGGCGACAATGTCATTG		
skyA2	F: AACACTACATCATTCTCGTCTTCCGTTTC	541	461
	R: AGTGACGCAGTGAGCACAATTGGAGAGAAC		
skyE2	F: CAGCCTTTCGGTGCAGTCTTGGGATCCTCG	551	407
	R: ATGAAGTTCACCTTTAATTTTCGTAGGACTC		
skyJ2	F: GCTGGTCGTCGCACACCTAGTCCTCACAAG	548	450
	R: CTAAAACCTCCTTGTATTTGCCTTGAACAAA		
skyI2	F: TCATCGCTGCCGGAGTTCTCTGATAATACC	735	735
	R: ATGCCATCAATCGACAGCCATTCGATCTC		
skyR2	F: ATGGCTCTCGCAGAAGTTCAAGCAGAAACC	512	447
	R: TTATGCGTTGGTGGTCCCACCTGCCATCAA		
skyK2	F: ATGCCGATACCACGAAGATATGCCATTCTC	810	810
	R: TTATTTTGGGCCAGTGCCGACAGGAAGATA		
skyC2	F: TTAAGCCGCACCACCATCAAGAGTAAGTGT	798	798
	R: ATGGCTATCCAAGAGTACATTCTGGTTCGC		
skyD2	F: AGCTGACGGCCTGCGGACTACGTCCGGGAC	551	429
	R: GGGGAGGTCCACTGTTTCATGAGGATCCCGG		
skyL2	F: AAGTGTGTGGAACATGATGACCATCGTGCC	550	492
	R: ATGTCTAACTCTGAAGAAGTCGAAAAAGATG		
skyO2	F: CGAAGCCAAAGGTAGTCTATGAAGGACTGC	617	440
	R: GAGGGGTCAATCTGATTTGTGAAGATGTGC		

・ Cluster3のプライマーリスト

gene	Sequence 5'-3'	Size (bp)	
		gDNA	cDNA
skyA3	F: TCAATTCTGGTCAAAAATGGTCTTCATCTC	1038	1038

	R: ATGCACAACGCGCGCTGGTGGCTGTACGTC		
<i>skyE3</i>	F: ATGTCTGGTATCAGACGTGCCCTGTCCAGG	2889	2889
	R: CTAGTCCTCGAAAAAGTTCATAATGGCACG		
<i>skyS3</i>	F: AAATACTCTGACCAACGGTAAAAGCCTTCG	1381	773
	R: CCTAGACCACTTCGTCAAAGAGGCCCTTCG		
<i>sky3</i>	F: ATGGAGAGTTTTACTTTGCAGCAGCTCGCT	337	282
	R: TTAGTTTCTGTAGCTGGTAGGGGGCAAGTA		
<i>sky3</i>	F: GCCTCAGGTGAGCGTTCAACAAGGTTCTTA	500	445
	R: ATGAAGGTCCTTGCTCTCCACGGAGTCGGC		
<i>sky3</i>	F: TCAAAAAACCGCCCTGCGCGCCAATGCGGT	1344	1344
	R: ATGTCGCCTCCGCCCAAGCCTATAAGCATA		
<i>lteP3</i>	F: CTGGCGCGCCCGCGAGTACGACCAGTCTAG	528	460
	R: TGGCGAGACGCTGTTCAATCCCGACCCGCC		
<i>sky3</i>	F: GCAATGGAAGGCGTCTATCTTGTCATGTTC	520	401
	R: GAGGTTTTGTCTGAAGCGCTAATGAATACC		
<i>lteL3</i>	F: CTA CTGGGCCAGCTTCTCCCTCATGTCATT	1541	1424
	R: TCGGAAGCCTGACGATCATTCCGGAAGTTG		
<i>sky3</i>	F: ATGACTTGTGAGGCCTGTAATACCATTCCC	1138	747
	R: TCATAGACGCTTTCCAAAGTACGCAGCTAC		
<i>sky3</i>	F: ATGGAGACCGTACTAGTCGTCGGTGCAACA	821	717
	R: TTAATACGTTATTTTCTTCTTGTACTTCAA		
<i>sky3</i>	F: GGGCTGGACAACACTTGTAATCCGGTCTG	442	382
	R: ATGCCCTCCGCTCTAGCGAAGGTAGATTTG		
<i>sky3</i>	F: GACTCGATCCCGGGTCCGCCGCTTTACGTC	818	643
	R: CTGTGGAGGCCTGGCAGCCAAACCACAATC		
<i>sky3</i>	F: TCAAGCCGCGCCCCCATCGAGTGTGATGAC	910	798
	R: ATGGCCGACTCACCTACATCCCTGGCCGC		
<i>sky3</i>	F: ATGGTCGATACGTCAGACCCCCCGCCACCT	505	444
	R: TCACTCCTTAACGACCTCACCATCGATGAT		
<i>sky3</i>	F: ATGACCAACCAAAATCCCAACCAGGTCAAT	652	498
	R: CTAGTTATCCTCTTGGAAGACCTTTCCATA		
<i>sky3</i>	F: CTAAGGATGAATAACACCCATCCACATTGG	1083	1083
	R: ATGTTGGCTATTCGAGCACATGCAGATTCA		
<i>sky3</i>	F: ATGGATACCACGACGACCCCTTCACCCC	399	399
	R: TCAAGCCGTGCAGACATTACTAACGGCAAT		

2-7-9. PCRによる目的遺伝子の増幅

抽出したゲノムDNAをテンプレートとして用い、PCR反応で目的遺伝子を増幅した。
反応に用いる

DNA Polimerase は2種類用い、それぞれ使い分けた。KOD-Plus-Neo は2 kbp/min という速度でDNA複製を行うため、反応が短時間で出来る。さらに校正機能が備わっているため変異が入る確率が低く、プラスミドに組み込む遺伝子を増幅する際に用いた。反応条件を以下に示した。

	volume (μL)	
10 x PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	5	
2.0 mM dNTP mixture	5	
25 mM MgSO ₄	3	94 °C 2 min.
DMSO	0 to 9	
template DNA	1	
Primer Forward (10 μM)	1	
Primer Reverse (10 μM)	1	
KOD-Plus-Neo DNA polymerase	1	
sp water	up to 50	

98 °C
10 sec.

X °C
30 sec.

68 °C
Y sec.

16 °C
forever

30-35 cycles

PCRの条件

Xはアニール温度を示しており、後述するプライマーのTm値を元に算出した。Yの値は伸長時間で、増幅したい遺伝子の長さによって決定した。

Insert	Restriction site	Sequence 5'-3'	Size (bp)
			Vector
skyG3 Fr1	KpnI	F:CCGGAATTCGAGCTCGGTACATGAGTTCTTCGTCGACTTC	2750
		R:CACCTAGAGTAGCATCCTCATTTCATTC	pDP801c
skyG3 Fr2	KpnI	F:TGAGGATGCTACTCTAGGTGATTTGTCTTATAC	2761
		R:ATCGGGTACGACCCGGGTACCTACCTATTCTCTTCAAGC	pDP801c
skyF3	SmaI	F:AAGCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACATGCCCTCCGCTCTAGCG	1053
		R:GGGTACGACCCGGTCATTCAATGTGCTGCTGCC	pDP201c
skyF3H 3 linker	SmaI	F:CACATTGAATGACCGGGTCGTACCCGATGATG	849
		R:CGTATCGACCATGCCCGGGTTTGACGAGCT	pDP201c

skyH3	SmaI	F:GTCAAACCCGGGCATGGTCGATACGTCAGAC	505
		R:TGTGGGTCTAGGCTATCCTGTTACCTCACTCCTT AACGACCTC	pDP201 c
skyM	KpnI	F:TCGAGCTCGGTACCCATGGAAACTGTTTCCAATC TT	1736
		R:CTACTACAGATCCCCTTAGGCCTTCTCTCTGGG	pDP801 c
skyK2	SmaI	F:GCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCATGCCGATA CCACGAAGATATG	810
		R:TCGGGTACGACCCTTATTTTGGGCCAGTGCC	pDP801 c
skyK2C 2 linker	SmaI	F:TGGCCCCAAAATAAGGGTCGTACCCGATGATG	849
		R:CTTGGATAGCCATGGGTTTGACGAGCTGCGG	pDP801 c
skyC2	SmaI	F:GCTCGTCAAACCCATGGCTATCCAAGAGTACATT C	798
		R:CCTTCACGAGCTACTACAGATCCCCTTAAGCCGC ACCACCATC	pDP801 c
skyB3	KpnI	F:CGGAATTCGAGCTCGATGACCAACCAAAATCCC AA	652
		R:TCGGGTACGACCCGGGTACCCTAGTTATCCTCTT G	pDP201 c
skyM2	SmaI	F:GCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCATGGCTTCT GCTCCTATG	1797
		R:TCGGGTACGACCCTCAAACATTCCTGTACGG	pDP201 c
lteM2D2 linker	SmaI	F:AGGAATGTTTTGAGGGTCGTACCCGATGATG	848
		R:TGCCTGGTGCCATGGGTTTGACGAGCTGCGG	pDP201 c
skyD2	SmaI	F:GCTCGTCAAACCCATGGCACCAGGCATCATATAT C	1712
		R:CCTTCACGAGCTACTACAGATCCCCTTAAGACCA ATCACCATCCTG	pDP201 c
skyK2	BamHI	F:TACCCTCGAGGGATCCATGCCGATACCACGAAG ATA	810

		R:GCTTGAATTCGGATCCTTATTTGGGCCAGTGCC GA	pCold I
skyC2	BamHI	F:TACCCTCGAGGGATCCATGGCTATCCAAGAGTAC AT	798
		R:GCTTGAATTCGGATCCTTAAGCCGCACCACCATC AA	pCold I
skyB3	BamHI	F:TACCCTCGAGGGATCCATGACCAACCAAAATCCC AA	498
		R:GCTTGAATTCGGATCCCTAGTTATCCTCTTGGA GA	pCold I

2-7-10. In-Fusion®法によって構築したプラスミド

PCRで増幅したDNA断片は、ウェルの広い (60 L) アガロースゲルを用いて精製し、ベクターとの連結に用いた。ベクターとの連結をする際にIn-Fusion®法を用いた。この手法はインサートをPCRで増幅する際、プライマーにベクターとの相同配列を15 bp以上組み込むことで、簡便にプラスミドの構築ができるものである。

ベクターを適当な制限酵素で処理した後、アガロースゲルを用いて精製した。ベクターとインサートのモル比を見積もるため、同一のゲルにベクターとインサートを2 Lずつチャージした電気泳動を行って輝度を確認した。インサートとベクターのモル比が2:1 に、総液量が7 L になるように0.2 mL エッペンチューブで混合した。sp水を1 LとIn-Fusion®酵素溶液を2 L加え、50 °C で15 分インキュベートした。なお、この反応溶液はスケールダウンが可能である。

また、2つの断片を連結させる方法として、Fusion PCR を行った。これは、連結させたいフラグメントの増幅に用いるプライマーに予め相同配列が出来るように設計した後、増幅した遺伝子をアガロースゲルで精製してテンプレートとして用い、PCR反応を行うことで連結するものである。

< In-Fusion®法によって以下のプラスミドを構築した>

pDP801::skyM (KpnI site), pDP201::chrB3 (KpnI site), pCold::chrK2 (BamHI site), pCold::chrC2 (BamHI site), pCold::chrB3 (BamHI site)

	μL
Insert	x
Vector	x-7
5 x In-Fusion premix	2.0
sp water	1.0
total	10

↓ mixing by pipetting
50 °C , 15 min.

↓ In-Fusion 反応液 (10 μl)

図 5-15. In-Fusion スキーム

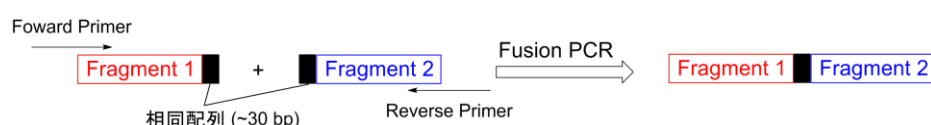


Figure 2-24. Fusion PCR の概念図

2-7-11. Gibson assembly法によって構築したプラスミド

長鎖のインサートをベクターとの連結をする際、本研究では**Gibson assembly**法を用いた。ベクターを適当な制限酵素で処理した後、インサートとベクターのモル比を次の式で計算し規定の値に揃え、総液量が10 L になるように0.2 mL エッペンチューブで混合した。そこにGibson Assembly Master Mix を10 L加え、50 °C で15 分 (総断片数が4以上の場合は60分以上) インキュベートし、20 Lの反応液を得た。

$$\text{pmols} = (\text{weight in ng}) \times 1,000 / (\text{base pair} \times 650)$$

(特に、濃度既知な-HindIII digestの6,557 bpのバンドと比較してインサートやベクターの濃度を計算した。)

< Gibson assembly法によって以下のプラスミドを構築した>

pDP801::chrG3 (KpnI site), pDP201::chrF3/H3 (SmaI site), pDP801::chrK2/C2, pDP201::chrM2/D2

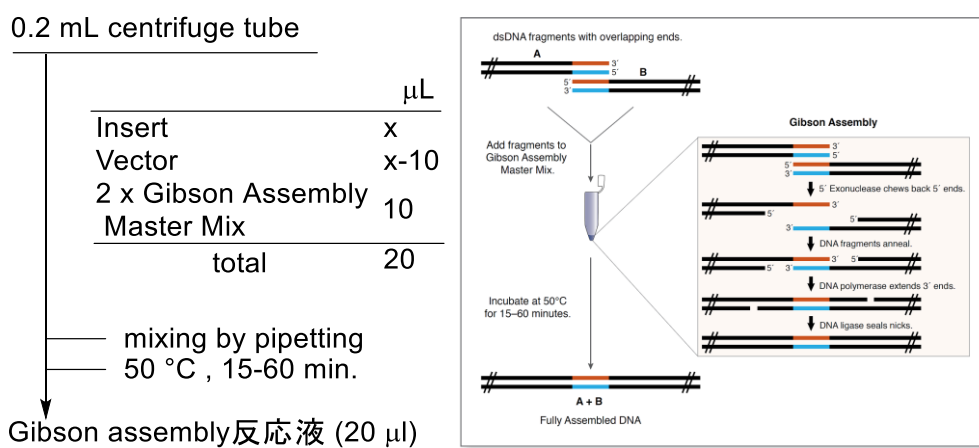


Figure 2-25. Gibson assemblyスキーム

2-7-12. Escherichia coli へのプラスミドの導入

In-FusionやGibson assemblyで構築した反応液を用いて大腸菌を形質転換した。

In-Fusion (もしくは Gibson assembly) 反応溶液を氷上で十分に冷やした。長鎖 DNA のクローニングに適した *E. coli* HST08 (もしくは市販の *E. coli* 5-alpha) のコンピテントセルを、-80 °C から氷上に移して解凍した。解凍したコンピテントセルを 1.5 mL エッペンチューブに移し、氷上で冷やしていた In-Fusion 反応溶液を 2.5 L (もしくは Gibson assembly 反応液を 2 L) 加え、氷上で 5 分静置した。その後 40 °C で 1 分間熱し、速やかに氷上に移して 3 分間静置した。LB 培地を 900 L 加えて 37 °C、30 分間の回復培養を行い、集菌後、予めアンピシリンを塗布した LB 寒天培地に塗り拡げ、37 °C で 13-14 時間培養した。

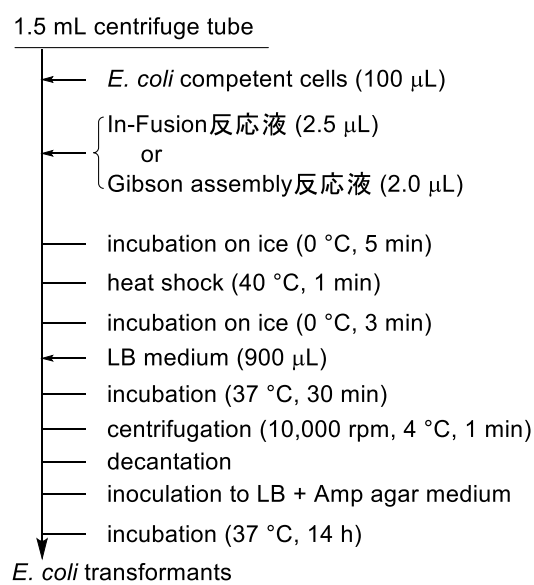


Figure 2-26. 塩化カルシウム法形質転換スキーム

2-7-13. 大腸菌からのプラスミド回収

プラスミドを導入することで生育した大腸菌のコロニーを2-4個ほど爪楊枝でつつき、予め終濃度が0.1 %となるようアンピシリンを加えた3 mL のLB培地に爪楊枝ごと入れて植菌した。37 °Cで13-16 時間培養し、クリーンベンチ内で500 L を1.5 mL エッペンチューブに移し、そのエッペンチューブに250 Lの80% グリセロール溶液を加えてグリセロールストックを作成し、-80 °C で保存した。残りの培養液に対してミニプレップを行い、プラスミドを回収した。

ミニプレップの操作方法としては、1.5 mLのエッペンチューブに培養液を加え、遠心分離 (13,000 rpm, 1 min, 4 °C)して集菌した。上清を捨て、sol Iを200 L加えてピペッティングし、ペレット状の菌体を溶解させた。その後、塩基性のsol IIを400 L加えて10回上下反転し、細胞を溶解させて溶液の色が透き通ったのを確認した。上下反転後、ただちに酸性のsol III を300 L加えて溶液を中和し、激しく振って白い沈殿が生成した。さらにクロロホルムを30 L加えて、その後の操作を簡便にした。遠心分離 (13,000 rpm, 5 min, 4 °C) した後に、上清750 Lを別の1.5 mLのエッペンチューブに移し、等量の冷イソプロパノールを加えた。前の操作でクロロホルムを入れていないと、沈殿が浮遊して上清750 Lを移す作業が比較的困難になる。ボルテックスで激しく攪拌した後に遠心分離 (13,000 rpm, 15 min, 4 °C) し、上清をピペットマンで捨てた。沈殿物に70%冷エタノール1 mL を加えて上下反転することで洗浄し、遠心分離 (13,000 rpm, 2 min, 4 °C)して上清を捨てた。その後15 分間減圧乾燥させ、得られた白色固体に100 LのTEを加えた。サンプル中のRNAを除くため、20 mg/mLのRNaseを1 L 加え、37 °Cで1時間静置した。この溶液に30 Lの1 mM MgCl₂ 水溶液を加え、氷上で15 分間静置した。その後遠心分離 (13,000 rpm, 15 min, 4 °C)し、別の1.5 mLエッペンチューブに上清110 Lを移し、等量の

20%PEG溶液と混合し、氷上で1 時間静置した。その後遠心分離 (13,000 rpm, 20 min, 4 °C)し上清をピペットマンで捨て、沈殿物に70%冷エタノール1 mL を加えて上下反転することで洗浄し、遠心分離(13,000 rpm, 2 min, 4 °C)して上清をピペットマンで捨てた。得られた沈殿物を15 分間減圧乾燥させ、得られた白色固体に20-40 Lの滅菌水を加えてプラスミド溶液とした。また、全ての構築したプラスミドについてインサートの確認を行い、ファスマック株式会社に依頼して、シーケンスの確認を行いエラーが入っていないことを確認した。

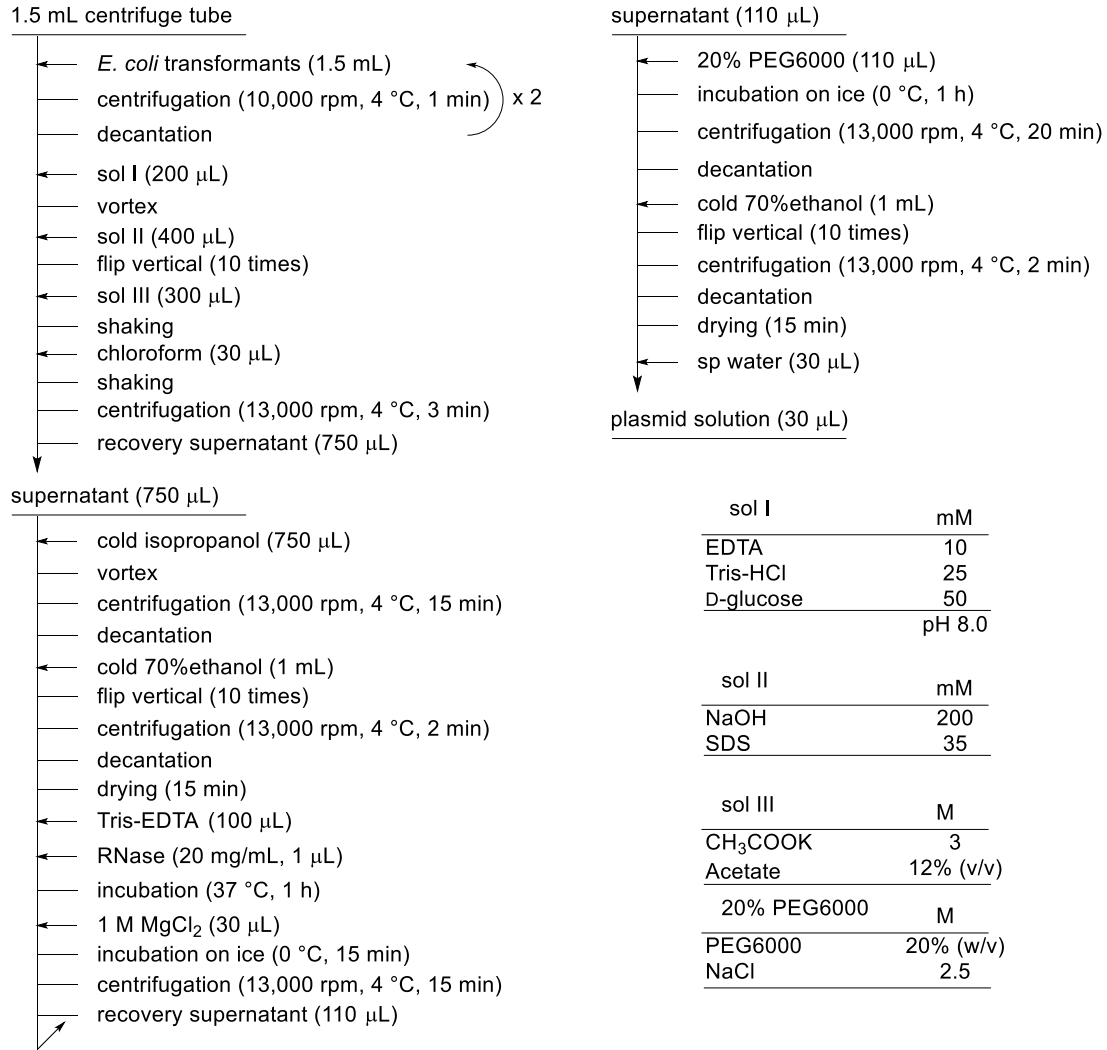


Figure 2-27.大腸菌からのプラスミドの取得

2-7-14. 異種発現用ベクターを用いた麹菌の形質転換

2-7-14-1. 使用宿主 : AO-NSPID1 (*ligD* 欠損株)

麹菌への遺伝子導入は非相同末端修復系 (NHEJ) を介しているため、相同組換えが優勢になることが期待される。実際に、2008 年に東京大学の北本らは *A. oryzae* の *ligD* 欠損株を用いて、相同組換えによる耐性マーカーの挿入 (*argB*, *adeA*, *pyrG*) をすることで

4 種類の遺伝子破壊 (*ligD*, *pyrG*, *tppA*, *pepE*) に成功した。この結果、*ligD* は 38%、*pyrG* は 92%、*tppA* は 89%、*pepE* は 90% という高い効率で、それぞれの遺伝子に対する変異導入に成功している。また、当研究室の尾関は、*ligD* 欠損株を用いた *pyrG* マーカーによる遺伝子挿入に成功している。

2-7-14-2. 形質転換方法

形質転換に用いる *A. oryzae* NSPID1 株の孢子懸濁液 (1.0×10^8 cell) を、適切な栄養を加えた DPY 培地 (100 ml) の入った 500 mL 三角フラスコに植菌し、30 °C、200 rpm で 2~3 日間培養した (菌体の状態によって培養日数を調節)。菌体をオートクレーブで滅菌したガラスフィルターで集菌した後、流水が透明になるまで滅菌水で菌体を洗浄した。オートクレーブで滅菌した薬さじを用いて菌体をガラスフィルターの壁に押し付け、よく水を除いた。0.5% 細胞壁消化酵素 (Yatalase) 溶液を 50 mL のファルコンチューブにフィルター滅菌 (Sartorius stedim bioteth, Minisart®, 0.45 μ m, 黄色) して 10 mL ずつ分注し、菌体を液量の 20-40% 程度 (チューブを軽く振って、溶液がさらさらと回るぐらい) になるように加えた。30 °C、200 rpm で 1~2 時間振盪し、オートクレーブで滅菌したミラクロースを用いてろ液を回収した。遠心分離 (3,000 rpm, 5 min, 4 °C) し上清を除き、得られたプロトプラストの沈殿物を、オートクレーブで滅菌した 0.8 M NaCl 水溶液 10 mL で極めて丁寧に懸濁させた。懸濁液を 1000 倍希釈させ、血球計算板と顕微鏡を用いてプロトプラスト濃度を計算した。プロトプラスト懸濁液を遠心分離 (3,000 rpm, 5 min, 4 °C) して上清を捨て、沈殿を 2.0×10^8 cell/mL になるよう 80% solution 2 と 20% solution 3 を加え、優しくピペッティングすることで懸濁させた。その後氷上で任意の時間だけ静置した。プロトプラスト溶液 200 L あたり、12 g (<15 L) のプラスミド溶液を加え、チューブを回すことで丁寧に混合した後に氷上で 20 分静置した。(今後に記す溶液量は、すべてプロトプラスト溶液 200 L あたりの値である)。その後、1 mL の solution 3 を 1 秒間に 2 滴落とす程度の速さで加え、チューブを回すことで丁寧に混合した後に室温で 20 分間静置した。この溶液に 10 mL の solution 2 を加え、プロトプラスト溶液を希釈させた。遠心分離 (3,000 rpm, 5 min, 4 °C) し、菌体が剥がれ落ちないように上清を捨て、2,000 L の solution 2 で懸濁させた。懸濁液を選択培地の端に滴下し、オートクレーブで滅菌した 0.6 % CD 寒天培地を 2-4 ml 重層した。栄養要求性マーカーに対する選択培地には、対応する栄養素 (*pyrG* 欠損株 : ウリジン 450 mg、ウラシル 200 mg) を含めないことで選択をかけた。

< 形質転換によって以下の形質転換体を得た >

AO-skyG-skyF-skyH, AO-skyM, AO-*chrK2C2B3*, AO-*chrK2C2M2D2*

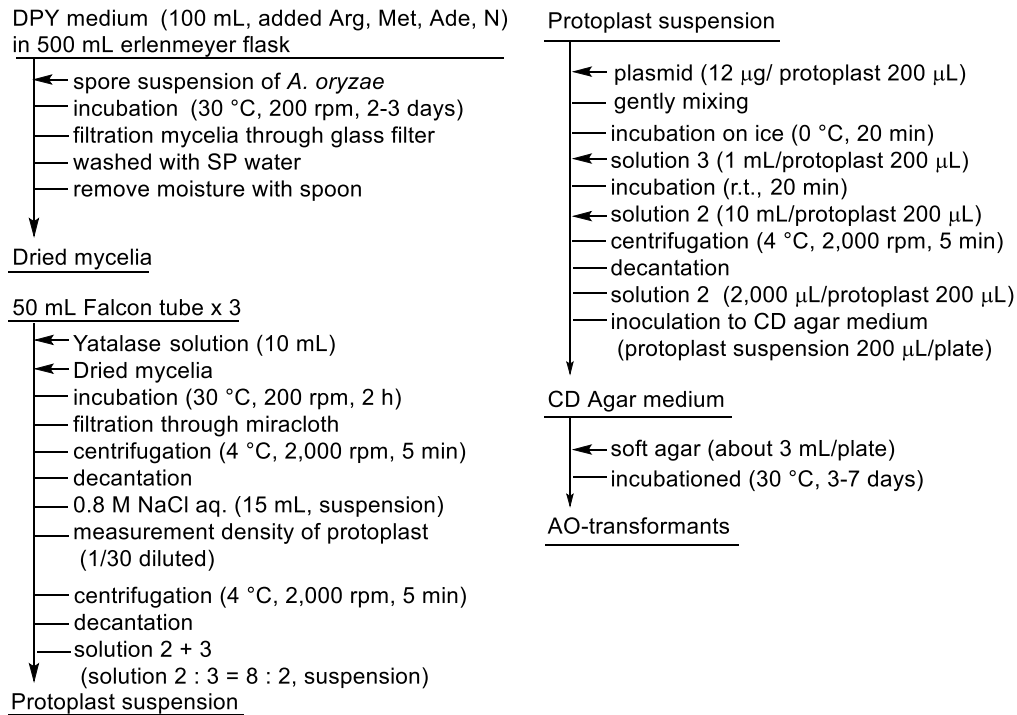


Figure 2-28. 麹菌の形質転換

2-7-15. 麹菌の長期保存

PGA (potate glucose agar) 培地にアデニンを加えたものに麹菌を植菌し、30 °Cで一週間静置培養した。プレート全体に菌体が広がったら、孢子懸濁液 (tween80: 0.1%, NaCl:0.8%、フィルター滅菌済み)で孢子を収穫した。血球計算板を用いて孢子を数え、 1.0×10^8 cell/mL になるよう調製した。その後、1.5 mLエッペンチューブに1 mLずつ分注し、4 °Cで保存した。しかし、この保存方法だと三か月程度しか保存できず、また保存期間が長くなればなるほど孢子が死滅していく。そのため、長期保存する場合は500 Lの孢子懸濁液と40%グリセロール溶液を混合し、グリセロールの終濃度が20% となるように調製し、-80 °Cで保存した。

2-7-16. Protoplast-PEG法を用いた *T. islandicus* の形質転換

500 mL 三角フラスコに PG 培地 (pH 5.6, 100 ml)を作製し、この培地に孢子懸濁液 (1.0×10^8 cell, 1 mL)を加え、振盪培養 (200 rpm, 1 days, 30 °C)した。得られた培養液を 50 ml プラスチックチューブに 50 mL ずつ分注し、遠心分離 (3,500 g, 5 min, 4 °C)し、ペレット状の菌体を回収した。得られた菌体を osmotic medium (20 mL)で 2 回洗浄し、フィルター滅菌した Yatalase 溶液 (yatalase 5 mg/mL, lyzing enzyme 5 mg/mL, osmotic medium 20 mL)に加え、振盪培養 (200 rpm, 40 min, 30 °C)した。振盪後、溶液を 50 mL のプラスチックチューブにミラクロースでろ過した。これに separation buffer を 10 mL 加え、遠心分離 (1,100 g, 10 min, 4 °C)し中間層を 10 mL 回収した。回収した中間層に

STC buffer を 10 mL 加え、遠心分離 (1,100 g, 10 min, 4 °C) し、上澄みを除去した。
STC buffer 10 mL に懸濁させ、この内、1 µL をとり STC buffer 29 µL で希釈し顕微鏡で
プロトプラストの数を計測した。先ほど懸濁させたプロトプラスト溶液を遠心分離
(1,200g, 5 min, 4 °C) し上清を除去してプロトプラストを得た。2.0 x 10⁸ cell/mL となるよ
うに STC buffer を加えた。
調製したプロトプラスト溶液 (2.0 x 10⁸ cell/mL, 200 µL) に目的のプラスミド 5 µg、sol3 40
µL を加えた。氷上で15分間インキュベートした後、sol3 (1 mL) をゆっくり加え、室温で
10分間インキュベートした。その後STC buffer 5 mL を加え懸濁させ、遠心分離 (1,800 g,
5 min, 4 °C) し上清を除去した。直ちにSTC buffer 1 mL を加え優しく懸濁させた。懸濁液
をPG+S+hyg寒天培地に滴下し、あらかじめ滅菌しておいた軟寒天 (約3 mL) を重層させ
た。その後、30 °C で1週間程度培養した。

2-7-17. *Talaromyces islandicus* NBRC6963株の代謝産物抽出

糸状菌 *Talaromyces islandicus* NBRC6963株をPGAプレートで培養し、CYA培地20 mLに
植え継ぎ、7日間培養した。得られた培養物を菌体と培養液に分け、菌体をアセトンに一晩
浸した。菌体を濾紙でろ過し、ろ液をエバポレーターで濃縮した。得られた粗抽出物をク
ロロホルム100 mL及びdH₂O 100 mLによって分液し、有機相を得て、エバポレーターによ
って濃縮し、粗抽出物を得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し(ヘ
キサン:酢酸エチル=10:1→2:1)、UPLC/MS分析及びNMRを測定した。

2-7-18. emodin及びskyrinの麹菌異種生産、代謝産物の解析

形質転換体 (AO-skyGFH 及び AO-skyGFHXM) を試験管で、米 1 g とアデニン少量を
含む培地で 30 °C, 9 日間静置培養した。酢酸エチル 3 mL (1 本あたり) を加えて、葉さじで
混合して室温で静置した。有機層を回収し、等量の水でボルテックスすることで分液し
た。得られた有機層を圧縮空気濃縮した。残渣を UPLC/MS で分析した。

Method A : UPLC analysis

UPLC & UPLC/MS conditions
Ionization mode : ES ⁻
カラム : ACQUITY UPLC BEH C18
1.7 µm, 2.1 x 50 mm
流速 : 0.7 mL / min
溶媒 A : H ₂ O
溶媒 B : CH ₃ CN
Gradient : 0 ~ 3 min : B 30%
3 ~ 6 min : B 100%
6 ~ 7 min : B 30%
7 ~ 10 min : B 30%

2-7-19. AO-*skyM* を用いた微生物変換・抽出

形質転換体 (AO-*skyM*) を 1 mL の MPY 培地の入った試験管内に植菌した。そこに基質 (emodin 50 µg, DMSO 溶液 5 µl) を投与し, 30 °C, 200 rpm で 3 日間培養した。そこに終濃度が 75% となるようにアセトニトリルを加え, 12 時間程度室温で静置した。得られた有機層を回収し, Method A で分析した。(他の基質に関しても 50 µg 投与し、同様の操作で抽出・分析を行った)

2-7-20. AO-*chrK2C2B3* を用いた微生物変換・抽出

形質転換体 (AO-*chrK2C2B3*) を 1 mL の MPY 培地の入った試験管内に植菌した。そこに基質 (emodin 50 µg, DMSO 溶液 5 µL) を投与し, 30 °C, 200 rpm で 3 日間培養した。そこに終濃度が 75% となるようにアセトニトリルを加え, 12 時間程度室温で静置した。得られた有機層を回収し, Method A で分析した。

2-7-21. 還元酵素 ChrK2、ChrC2 及び脱水酵素 ChrB3 の酵素反応

2-7-21-1. 還元酵素 ChrK2、ChrC2 及び脱水酵素 ChrB3 の発現・精製

構築した pCold::*chrK2*、pCold::*chrC2*、pCold::*chrB3* を *E. coli* BL21(DE3)Gold コンピテントセルへ塩化カルシウム法で導入した。LB (amp+) 培地 (3 mL) に形質転換体 (*E. coli* BL21(DE3)Gold / pCold::*chrK2*、pCold::*chrC2*、pCold::*chrB3*) を植菌し、前培養 (200 rpm, overnight, 37 °C) した。LB (amp+) 培地 (200 mL) に前培養液 (2 mL) を加え、振蕩培養 (200 rpm, 2.5 h, 37 °C) した。培養液の波長 600 nm における吸光度が 0.5-0.8 程度であることを確認し、氷上で 15 分間冷却した。1 M IPTG (20 µL) を加え、振蕩培養 (200 rpm, overnight, 16 °C) した。得られた培養液を遠心分離 (8,000 rpm, 5 min, 4 °C) して集菌し、上清を除いた。菌体破碎用バッファーに懸濁させ、2 分間の超音波破碎を 5 度行った。遠心分離 (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) して不溶性画分を除去し、可溶性画分をアミロースカラムクロマトグラフィー (ニッケル resin, 10 mM イミダゾールで溶出) で精製した。限外ろ過を行い、BSA をスタンダードとした Bradford 法により ChrK2, ChrC2 及び ChrB3 の濃度を推定した (15 µM, 1 mL)。

・バッファーの組成

菌体破碎用バッファー：50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl

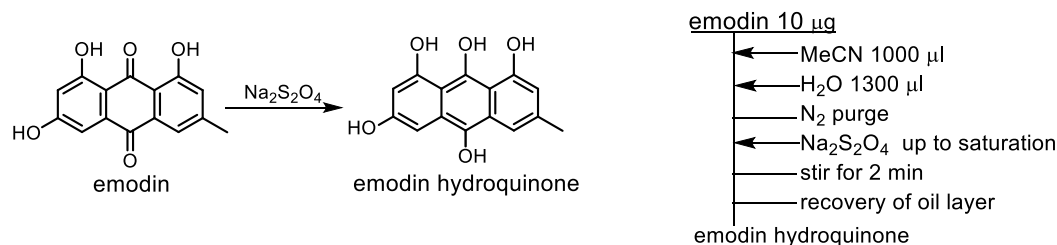
溶出用バッファー：50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 200 mM NaCl, 10 mM イミダゾール

2-7-21-2. 還元酵素 ChrK2、ChrC2 及び脱水酵素 ChrB3 の酵素反応

調製した酵素 ChrK2, ChrC2, ChrB3 を用いて酵素反応を行った。基質として emodin を用いて酵素反応液 (21 µM LteK2, 88 µM LteC2, 78 µM LteB3, 5 mM NADPH, 5 mM NADH, 50 µg emodin) を 50 µL になるように調整し、30 °C で 3 h インキュベートした。反応溶液に 100 µL のアセトニトリルを加えクエンチし、氷上で 30 分静置したのち、遠心分離

し除タンパクを行った。溶液を UPLC-MS 測定した。

2-7-21-3. Na₂S₂O₄ を用いた emodin の還元反応



2-8. References

- 1) Hüttel W.; Müller, M. Regio- and stereoselective intermolecular phenol coupling enzymes in secondary metabolite biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 38, 1011-43.
- 2) Fouillaud, M.; Venkatachalam, M.; Girard-Valenciennes, E.; Caro, Y.; Dufosse', L. Contemporary Strategies for the Synthesis of Tetrahydropyran Derivatives: Application to Total Synthesis of Neopeltolide, a Marine Macrolide Natural Product. *Mar. Drugs.* **2016**, 14, 1-64.
- 3) T, Boruta.; M, Bizukojc. Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biotechnology.* **2014**, 175, 53-62.
- 4) Michal A. Schatzle.; Syed Masood Husain.; Sascha Ferlino.; Michael Müller. Tautomers of Anthrahydroquinones: Enzymatic Reduction and Implications for Chrysophanol, Monodictyphenone, and Related Xanthone Biosyntheses. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 14742–14745.
- 5) S, Griffiths.; C, H. Mesarich.; B, Saccomanno.; A, Vaisberg.; P, J. G. M. De Wit.; R, Cox.; J, Collemare. Elucidation of cladofulvin biosynthesis reveals a cytochrome P450 monooxygenase required for anthraquinone dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2016**, 113, 6851-6856.
- 6) Couch RD.; Gaucher GM. Rational elimination of *Aspergillus terreus* sulochrin production. *J. Biotechnol.* **2004**, 108, 171-8.

- 7) Awakawa T.; Yokota K.; Funa N.; Doi F.; Mori N.; Watanabe H.; Horinouchi S. Physically discrete β -lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochrysone synthesis by iterative type I polyketide synthase. *Chem. Biol.* **2009**, 16, 613-23.
- 8) Chiang YM.; Szewczyk E.; Davidson AD.; Entwistle R.; P Keller N.; C C Wang C.; R Oakley B. Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 2067-74.
- 9) Ehrlich KC.; Li P.; Scharfenstein L.; Chang P K. HypC, the anthrone oxidase involved in aflatoxin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, 76, 3374-7.
- 10) Guang-Xiong, Z.; Shun-Yan, M.; Hui-Xiao, H.; Jian-Gong, S.; Wen-Cai, Y.; Zhong, L.; Ren-Wang, J. Molecular structure and tautomerization of the 1:1 complex of luteoskyrin and rugulosin. *J. Mol. Struct.* **2010**, 979, 86-91.
- 11) J. D. Bu'Lock.; J. R. Smith. Modified anthraquinones from *Penicillium islandicum*. *J. Chem. Soc.* **1968**, 1941-1943.
- 12) N, Takeda.; S, Seo.; Y, Ogiwara.; U, Sankawa.; I, Iitaka.; I, Kitagawa.; S, Shibata. Studies on fungal metabolites—XXXI: Anthraquinonoid colouring matters of *Penicillium islandicum* sopp and some other fungi (–)luteoskyrin, (–)rubroskyrin, (+)rugulosin and their related compounds. *Tetrahedron. Letters.* **1973**, 29, 3703-3719.
- 13) H, Wolfgang.; M, Michael. Regio- and stereoselective intermolecular phenol coupling enzymes in secondary metabolite biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2021**, 38, 1011-1043.
- 14) N, Takeda.; S, Seo.; Y, Ogiwara.; U, Sankawa.; I, Iitaka.; I, Kitagawa.; S, Shibata. *Tetrahedron.* **1973**, 29, 3703-3719.
- 15) A, Minami.; C, Liu.; H, Oikawa. Total Biosynthesis of Fungal Indole Diterpenes Using Cell Factories. *Heterocycles.* **2016**, 92, 397-421.
- 16) Y, Bin han.; W, Bai.; C, Xia Ding.; J, Liang.; S, Wu.; R X, Tan. Intertwined Biosynthesis of Skyrin and Rugulosin A Underlies the Formation of Cage-Structured Bisanthraquinones. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, 143, 35, 14218–14226.

- 17) Y, Ishihara.; Y, Kiyota.; G, Goto. Synthesis of isoindolo[2,1-a]quinoline derivatives and their effects on N₂-induced hypoxia. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, 38, 2259-2261.
- 18) N, Takeda.; S, Seo.; Y, Ogiwara.; U, Sankawa.; I, Itaka.; I, Kitagawa.; S, Shibata. Studies on fungal metabolites—XXXI: Anthraquinonoid colouring matters of *Penicillium islandicum* sopp and some other fungi (–)luteoskyrin, (–)rubroskyrin, (+)rugulosin and their related compounds. *Tetrahedron.* **1973**, 29, 3703-3719.
- 19) M, Sono.; M P, Roach.; E D, Coulter.; J H, Dawson. Heme-Containing Oxygenases. *Chem. Rev.* **1996**, 96, 2841-2887.
- 20) M, Kawaguchi.; T, Ohshiro.; M, Toyoda.; S, Ohte.; J, Inokoshi.; I, Fujii.; H, Tomoda. Discovery of a Fungal Multicopper Oxidase That Catalyzes the Regioselective Coupling of a Tricyclic Naphthopyranone To Produce Atropisomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 5115-5119.
- 21) W. Wakulinski.; P. Kachlicki.; P. Sobiczewski.; M. Schollenberger.; Cz. Zamorski.; B. Lotocka.; J. Sarova. Screening for catenarin production by *Pyrenophora tritici-repentis* isolates. *J. Phytopathology.* **2003**, 151, 74-79.
- 22) Mytre Koul.; Samdarshi Meena.; Ashok KumarParduman.; Raj Sharma.; Venugopal Singamaneni.; Syed Riyaz-Ul-Hassan.; Abid Hamid.; Asha Chaubey.; Anil Prabhakar.; Prasoon Gupta.; Shashank Singh. Secondary Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium pinophilum* Induce ROS-Mediated Apoptosis through Mitochondrial Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Planta. Med.* **2016**, 82, 344-355.
- 23) Loren K. Gibbons.; Edwin F. Koldenhoven.; Arthur A. Nethery.; Ronald E. Montgomery.; William P. Purcell. *J. Agric. Food Chem.* **1976**, 24, 2, 203-206.
- 24) Mytre Koul.; Samdarshi Meena.; Ashok Kumar.; Parduman Raj Sharma.; Venugopal Singamaneni.; Syed Riyaz-Ul-Hassan.; Abid Hamid.; Asha Chaubey.; Anil Prabhakar.; Prasoon Gupta.; Shashank Singh. Secondary Metabolites from Endophytic Fungus *Penicillium pinophilum* Induce ROS-Mediated Apoptosis through Mitochondrial

Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *Planta. Med.* **2016**, 82, 344-355.

- 25) Yudai Matsuda.; Charlotte H. Gotfredsen.; Thomas O. Larsen. Genetic Characterization of Neosartorin Biosynthesis Provides Insight into Heterodimeric Natural Product Generation. *Org. Lett.* **2018**, 20, 7197-7200.
- 26) Christian Gil Girol.; Katja M. Fisch.; Thorsten Heinekamp.; Stefan Gunther.; Wolfgang Huttel.; Jörn Piel.; Axel A. Brakhage.; Michael Müller. Regio- and Stereoselective Oxidative Phenol Coupling in *Aspergillus niger*. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, 51, 9788-9791.
- 27) Kawaguchi M.; Ohshiro T.; Toyoda M.; Ohte S.; Inokoshi J.; Fujii I.; Tomoda H. Discovery of a Fungal Multicopper Oxidase That Catalyzes the Regioselective Coupling of a Tricyclic Naphthopyranone To Produce Atropisomers. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2018**, 57, 5115-5119.
- 28) N. Takeda.; S. Seo.; Y. Ogiwara.; U. Sankawa.; I. Iitaka.; I. Kitagawa.; S. Shibata. Studies on fungal metabolites—XXXI: Anthraquinonoid colouring matters of *Penicillium islandicum* sopp and some other fungi (–)luteoskyrin, (–)rubroskyrin, (+)rugulosin and their related compounds. *Tetrahedron.* **1973**, 29, 3703-3719.

第3章 メレオライド生合成経路の解明：二機能性酸化酵素 Mld7 の反応機構解析

3-1. 序

3-1-1. 担子菌由来天然物の生合成研究に関する現状

担子菌は、子囊菌と同じ糸状菌に分類される菌類の一種である。地球上には 30,000 種類以上が存在すると考えられており、その多くが子実体（いわゆるキノコ）を形成する。古くから人類が食してきたということもあり、キノコに関する研究の歴史は古く、*muscarine*²⁾や *amanitin*³⁾といった毒素に加えて、抗菌物質である *melleolide*⁴⁾、抗腫瘍物質である *illudin S*⁵⁾、抗ウイルス剤である *ganoderic acid*⁶⁾などの天然物が単離されてきた（**Figure 3-1**）。しかしながら、担子菌においては子実体（キノコ）などの特定の生活環において生産される天然物があることなどから、他の微生物で一般的な培養法による天然物の取得が困難であることが多い。そのため、後述するように、天然物の生合成遺伝子クラスターの数取得された天然物の数を大きく上回っていることなどから新規天然物の存在が指摘されたとしても、実際に対応する天然物を取得することは難しい。こうしたことなどから、放線菌や子囊菌と比較すると、天然物に関連した研究が遅れているのが現状である。

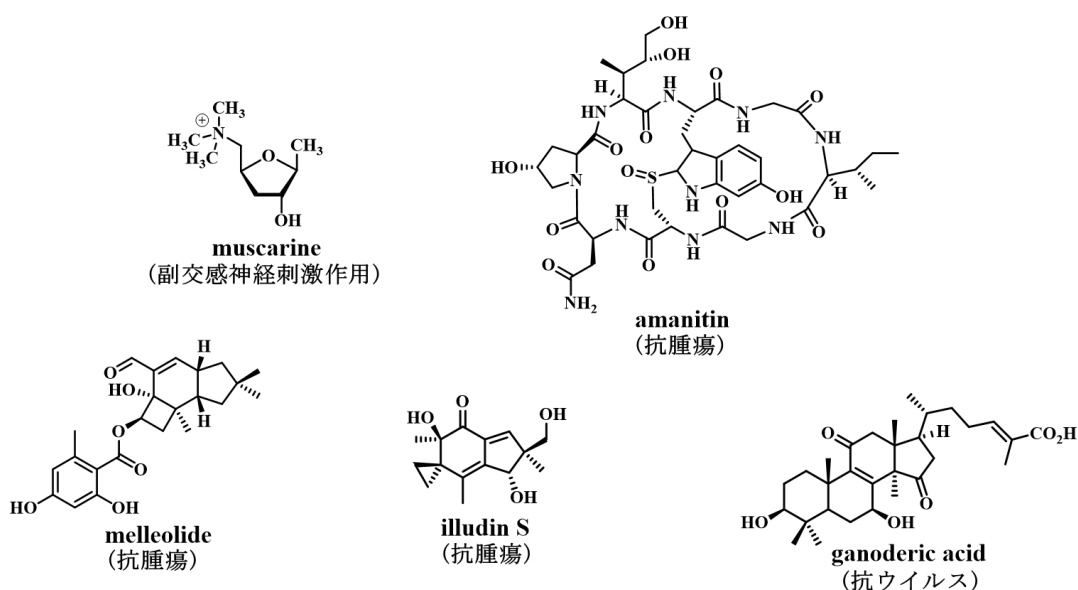


Figure 3-1. 担子菌由来の天然物

近年のゲノム解析の結果、担子菌類もまた、代表的な天然物であるポリケタイド、ペプチド、テルペノイドを生産するための生合成遺伝子を数多く保有していることが明らかになりつつある。特に、テルペノイドについては、1 菌株あたり 12 種ものテルペン環化酵素を保有していることが報告されている⁹⁾。この有用な遺伝子資源を物質生産へと応用するためには、各遺伝子の機能を解析する必要があるものの、その手法は限定的である。例えば、異種宿主発現を例にすると、主に大腸菌や酵母が宿主として用いられ

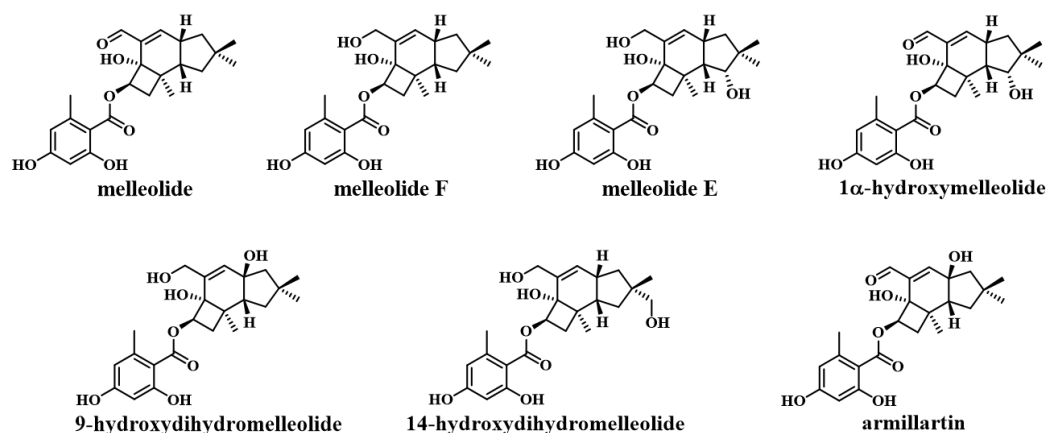
てきたが、イントロン領域が除去されたエキソン配列が必須であることから、担子菌内で転写されている遺伝子のみが機能解析の対象であった。イントロン領域を予測するツールの開発も精力的に進められているものの、予測精度に改善の余地があり、現時点では、予測配列を用いて機能解析を行える状況にはない。さらに、こうした単純な異種宿主発現では、生合成に関与する遺伝子の一挙導入による類縁体の網羅的生産や遺伝子改変による新規天然物の創製を実現することも難しい。また、担子菌においては、麴菌のように遺伝子操作が自在にできる担子菌の汎用宿主が開発されておらず、汎用的な形質転換法も確立されていない。そのため、酵素機能解析における常法とも言える遺伝子破壊実験（＝標的遺伝子の機能を欠損させ、代謝産物の変化から標的遺伝子の機能を推定する実験のこと）については、1) 非相同末端修復酵素遺伝子を破壊した株を作成した上で標的遺伝子を破壊する¹⁰⁾、2) CRISPER-Cas9 システムを利用した標的遺伝子の破壊など¹¹⁾、限定的な成功例が報告されているのみである。以上のことから、担子菌由来天然物に利用できる汎用的な異種宿主法の開発が強く望まれている。

こうした状況を打開するための一つの方法論として、当研究室では、麴菌を宿主とした異種発現系に注目して研究を進めてきた。第2章に記載したアントラキノ系天然物の生合成解析など、主に、子囊菌由来天然物の生合成酵素の解析に適用されてきたが¹²⁾、最近では担子菌由来の天然物生合成に関わる遺伝子の解析にも利用できることがわかってきた。特筆すべきは、1) 担子菌由来の gDNA 配列を導入しても、麴菌内で転写とスプライシングが進行すること、2) 一部のイントロンが除去されないケースがあるものの、除去されないイントロンの数は少なく（1~2 箇所／遺伝子）、PCR 法により人工的に除去できることから、担子菌内での転写の有無に関わらず、全ての生合成遺伝子が解析できる手法である点が挙げられる。当研究室では、本手法を用いることで、セスキテルペン環化酵素の網羅的な解析¹³⁾、erinacine の異種宿主生産¹⁴⁾などに成功してきた。この結果を受けて、担子菌が生産する主要な天然物の一つである protoilludane/illudane 型セスキテルペノイドである melleolide に着目し、異種宿主発現による物質生産と酵素機能解析を行った。

3-1-2. Melleolide 類の生合成研究について

Melleolide 類は、担子菌の一種である *Armillaria mellea* が生産する二次代謝産物であり、5-6-4 員環が縮環した protoilludane 型セスキテルペンにオルセリン酸が縮合した天然物の総称である。本化合物群は、抗腫瘍活性、抗菌・抗真菌活性、植物・細胞毒性などの多様な生物活性を示すことが知られている¹⁵⁾。これまでに 70 種類以上の関連化合物が単離されているが、その構造的な特徴は、二重結合の位置が異なる 2 種類の protoilludane 骨格（ Δ^6 -protoilludane、 Δ^7 -protoilludane）に対する酸化様式の違いとオルセリン酸の修飾様式の違いに集約できる（Figure 3-2）。

Δ^7 -protoilludane Type



Δ^6 -protoilludane Type

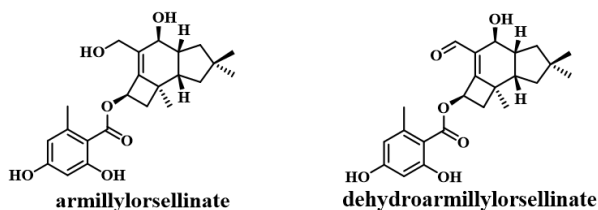


Figure 3-2. melleolide類縁体

本化合物の生合成研究に着目すると (Figure 3-3)、2011 年に、FPP (farnesyl diphosphate) から Δ^6 -protoilludene への環化反応を触媒する環化酵素 Mld5 が同定された¹⁶⁾。この知見を基に、2016 年には、メレオライドの推定生合成遺伝子クラスターが報告されている^{17), 18)} (Figure 3-3)。これと並行して、修飾酵素の機能解析についても報告されてきた。一般に、酸素官能基の導入を触媒するチトクローム P450 である *mld2* および *mld3* に関しては、酵母内で環化酵素と共発現することにより、P450-3 (本論文での名称: Mld3) が 8 位、P450-2 (Mld2) が 13 位の酸化に関わることが指摘されている¹⁹⁾。また、melleolide 類縁体に共通するオルセリン酸骨格の構築に関しては、ポリケタイド合成酵素 ArmB (Mld15) によって合成されることが *in vitro* 実験から明らかにされた²⁰⁾。さらに、アナログ体を用いた *in vitro* 実験により、本酵素がオルセリン酸とセスキテルペンの縮合反応も担うことが示唆された²⁰⁾。オルセリン酸部に対する修飾反応の一つである塩素化については、上述したクラスターから離れた位置に存在する 5 つのハロゲン化酵素 ArmH1-ArmH5 が関与することが明らかにされている²¹⁾。

以上の結果を踏まえ、当研究室では、麹菌異種宿主発現系を用いた melleolide 生合成遺伝子の機能解析を進めてきた。melleolide 生合成遺伝子と推定された 13 遺伝子をゲノム編集技術によって一挙に麹菌に導入することで、天然物 1 α -hydroxymelleolide の異種生産に成功した (Figure 3-3) (当研究室の長嶺の実験結果より)。さらに、セスキテルペン部分の生合成研究を進めることで、1) 3 箇所の酸素官能基の導入を 2 種の P450

(Mld3、Mld6) が触媒すること、2) short-chain dehydrogenase/reductase (SDR) ファミリーに分類される Mld4、Mld13 による酸化還元反応により C5 位の立体反転が進行していることを明らかにした(当研究室の尾関の実験結果より)。さらに、セスキテルペン部の生合成に関わる 5 遺伝子 (Mld5、Mld3、Mld6、Mld4、Mld13、) とチトクローム P450 還元酵素 (CPR)、そして PKS (Mld15) を共発現することで、armillyl orsellinate が生産することも確認されている。

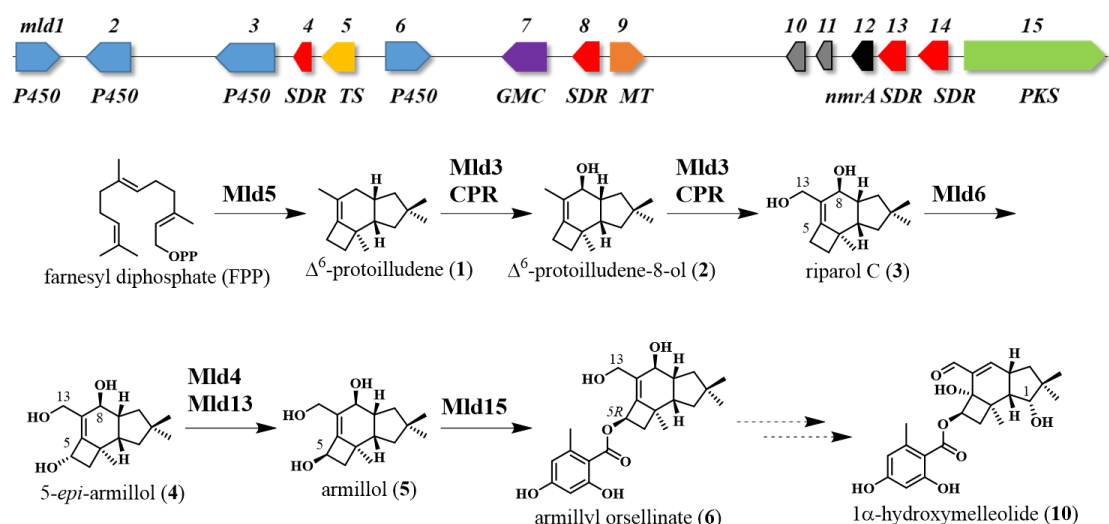


Figure 3-3. melleolide 生合成遺伝子クラスター

上述したように、melleolide 生合成中間体である armillyl orsellinate に至る生合成経路は明らかにされている一方、それ以降の 1 α -hydroxymelleolide に至る生合成後期の遺伝子の機能解析は未だ達成されていない。本生合成遺伝子クラスターには、天然物として報告されている 9 位や 14 位の酸化生成物を与えるための酵素遺伝子が含まれている可能性もあるものの、本章では、1 α -hydroxymelleolide への生合成経路に注目し、異種宿主発現、微生物変換実験、in vitro 反応を用いて、反応に関与する生合成酵素の特定と機能解析を行った。特に、メレオライドを含む protoilludane 型セスキテルペンに共通する特徴でもある Δ^6 -protoilludane から Δ^7 -protoilludane への二重結合の移動に関与する酵素の同定とその機能解析に注目して研究を進めた。

3-2. 麹菌異種発現系を用いた Mld1、Mld7 の機能解析

当研究室による先行研究によって、1 α -hydroxymelleolide (10) の経路中間体である armillyl orsellinate (6) までの生合成遺伝子の機能解析は達成された。6 から 10 への変換には、1) C1 位への水酸基の導入、2) C13 位アルコールの酸化、3) C8 位水酸基の脱水、4) 二重結合の移動、5) C6 位への水酸基の導入が関与すると考えられた。この反応には、生合成遺伝子クラスターに存在する遺伝子の内、機能解析されていない 6 つの遺伝子 (mld1、mld2、mld7、mld8、mld12、mld14) が関与するはずである。アミノ酸

配列から予測された各酵素の機能を以下にまとめる。

- ・ チトクローム P450 : *mld1*、*mld2* : 1 位への水酸基の導入に関与？
- ・ GMC oxidoreductase : *mld7* : 水酸基の酸化に関与？
- ・ SDR : *mld8*、*mld14* : 酸化還元？
- ・ *nmrA* : *mld12* : 酸化還元？

各反応に関与する生合成遺伝子を特定するため、6 生産株である AO-*mld5/3/6/CPR/4/13/15* (以降、AO/(AON)と記載) に対して、候補となる遺伝子の追加導入を行った。変換に関わる反応の種類が多ことから、当初は、残された生合成遺伝子の多くが反応に関与するものと予想して実験を行ったが、複数の遺伝子を同時に導入した場合には、基質が消費されるものの生成物の明確なピークが観測されないなど、予期せぬ現象が観測された。そこで、代謝産物のプロファイルが変化した形質転換体と導入した遺伝子を注意深く比較した上で、導入する遺伝子数を減らして、解析を継続した。その結果、6 生産株へ *mld1* および *mld7* を追加導入したところ、*mld1* と *mld7* の両方を導入した株において、最終生成物 10 の生産が確認された (Figure 3-4)。また、*mld1* のみを追加導入した株では、新たな化合物 9 が観測された (Figure 3-4)。9 は、オルセリン酸に由来する特徴的な吸収極大を示し、その分子量は 6 と比較して 16 m.u. 増加していたことから、単純な酸化生成物と予想された (Figure 3-5)。本化合物を単離したところ、C1 位に水酸基が導入された 1 α -hydroxyarmillyl orsellinate (9) であった²²⁾。また、*mld7* のみを追加導入した株では、2 つの化合物 7、8 が観測された。単離・構造決定の結果、それぞれ、既知天然物である armillarivin (7)、melleolide (8) であることがわかった (Figure 3-4)²³⁾。7 と 8 は、いずれも Δ^7 -protoilludene 骨格であり、7 では C6 位に水素、8 では C6 位に水酸基が置換していた。このことから、単一の酵素 Mld7 が、1) C13 位水酸基の酸化、2) C8 位水酸基の脱水、3) 二重結合の移動、4) C6 位への水素もしくは水酸基の導入を触媒するという、意外な結果が示唆された。さらに、各酵素の機能を明らかにするため、微生物変換実験を行った。AO-*mld1/CPR* に対して 6 を投与した場合、6 から 9 への変換を観測した (Figure 3-6)。生成した 9 を AO-*mld7* に対して投与すると、10 への変換が観測された (Figure 3-6)。一方、AO-*mld7* に対して 6 を投与した場合、6 から 7、8 への変換反応が観測された (Figure 3-6)。以上の結果から、Mld7 は 2 つの異なる基質 (6、9) を受容し、特に、6 を基質とした場合には 2 種類の生成物 (7、8) を与えることを明確にすることができた。

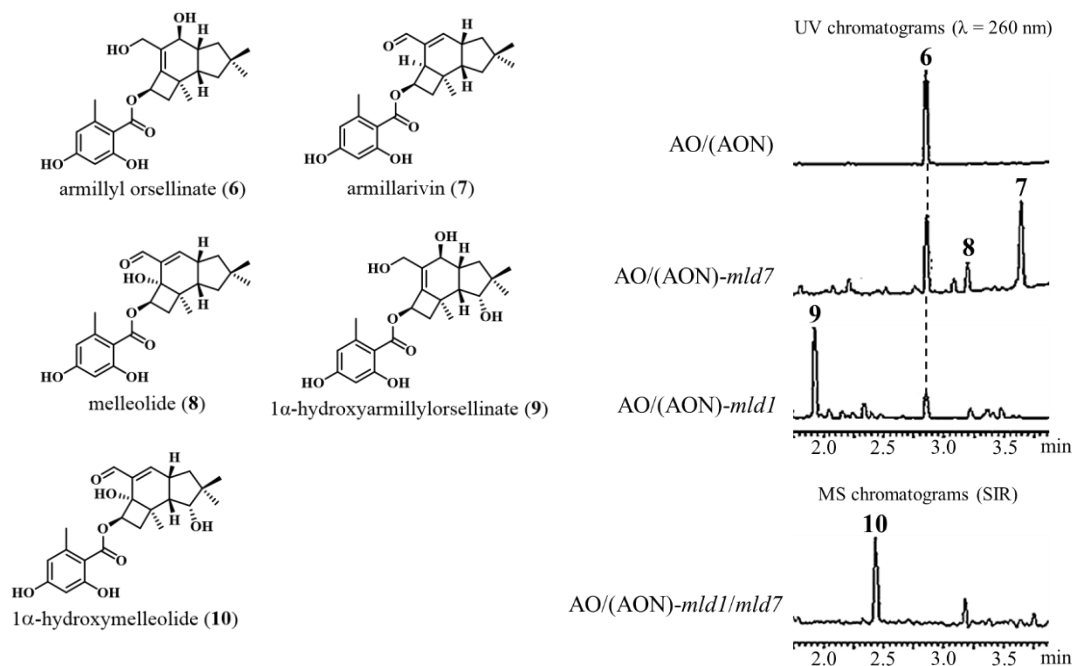


Figure 3-4. AO/(AON)-*mld1/mld7*, AO/(AON)-*mld1*, AO/(AON)-*mld7*の代謝産物解析

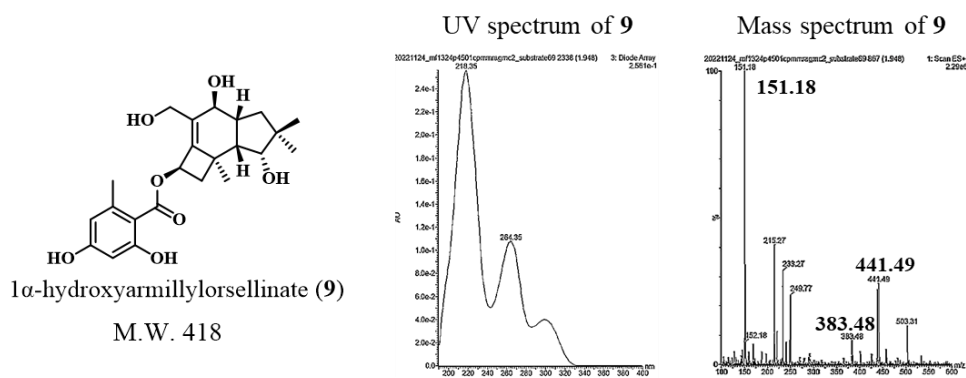


Figure 3-5. 化合物9のMS、UVスペクトル

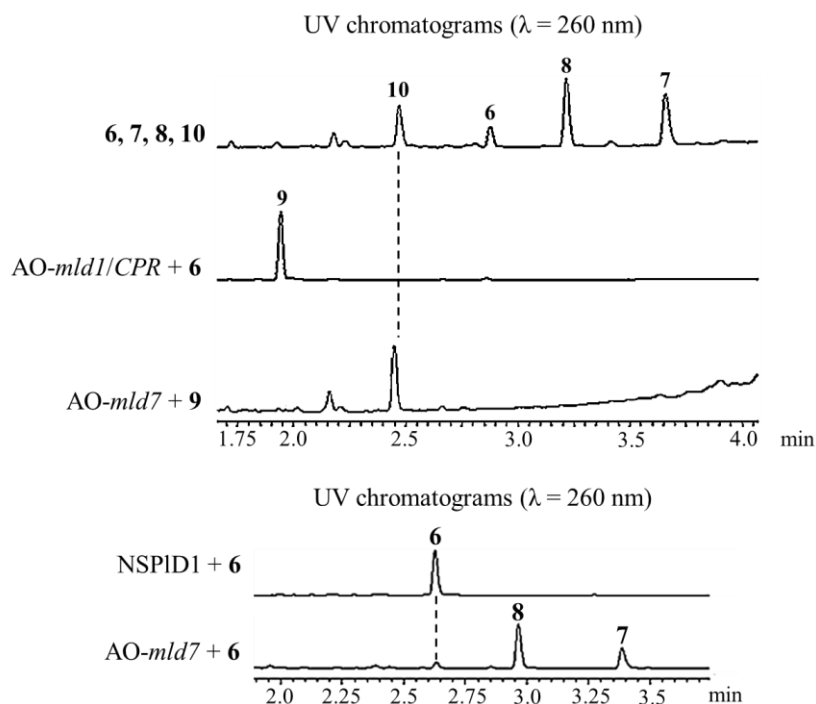
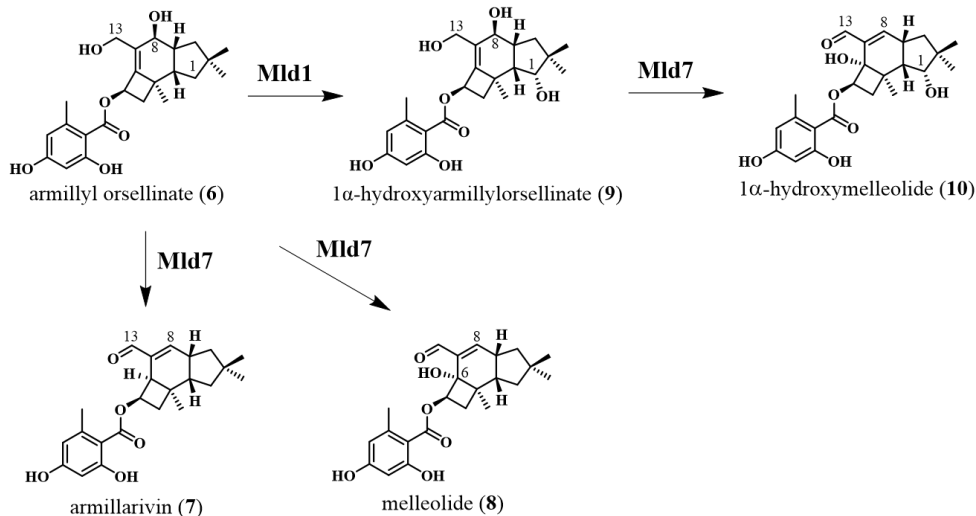


Figure 3-6. AO-*mld1*/CPR、AO-*mld7*へ6を投与したときの変換反応および AO-*mld7*へ9を投与したときの変換反応

以上の実験結果より、オルセリン酸が縮合した後の **6** から **10** への生合成経路を次のように推定した (**Scheme 3-1**)。まず、Mld1 が **6** から **9** への酸化を触媒した後、Mld7 が **9** に対する C13 位の 1 級アルコールの酸化、続く C8 位水酸基の脱水に伴う二重結合の移動、C6 位への水酸基の導入という多段階反応を触媒して **10** を生成物として与える。また、Mld7 は生合成中間体である **6** も受容でき、同様の反応で **8** を与えると同時に、ヒドリドを C6 位に導入することで **7** を生成物として与えることが示唆された。注目していた二重結合の移動を含む多段階反応を単一の酵素 Mld7 が触媒するという意外な結果が得られたことから、本酵素の詳細な反応機構解析を行うことにした。



Scheme 3-1. 1α-hydroxymelleolide 生合成経路

3-3. Mld7 の機能解析

3-3-1. 大腸菌発現系を用いた Mld7 の機能解析

Mld7 は、glucose-methanol-choline (GMC) oxidase に分類されるフラビン依存性の酸化酵素である。このファミリーに分類される酵素は、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* での機能解析例が豊富であったことから²⁴⁾、大腸菌を宿主とした組み換え酵素の調製を試みた。N 末領域に His-tag および MBP-tag を連結するための発現用ベクター (pColdI、pMalc4E) に形質転換体から取得したエクソン配列を持つ *mld7* を連結して、発現用プラスミドを構築した。構築したプラスミドをタンパク質過剰発現用の宿主である *E.coli* BL21 (DE3) Gold 株へ導入し、IPTG による誘導を行うことで、目的タンパク質を過剰発現した。調製した粗酵素溶液を SDS-PAGE によって確認したところ、His-tagged Mld7 は可溶化せず、MBP-tagged Mld7 は一部可溶化が確認された (Figure 3-7)。可溶化した MBP-tagged Mld7 は、アミロースカラムによって精製した後、1 α -hydroxyarmillylorsellinate (9) を用いて酵素反応を行ったが、10 への変換は確認できなかった。

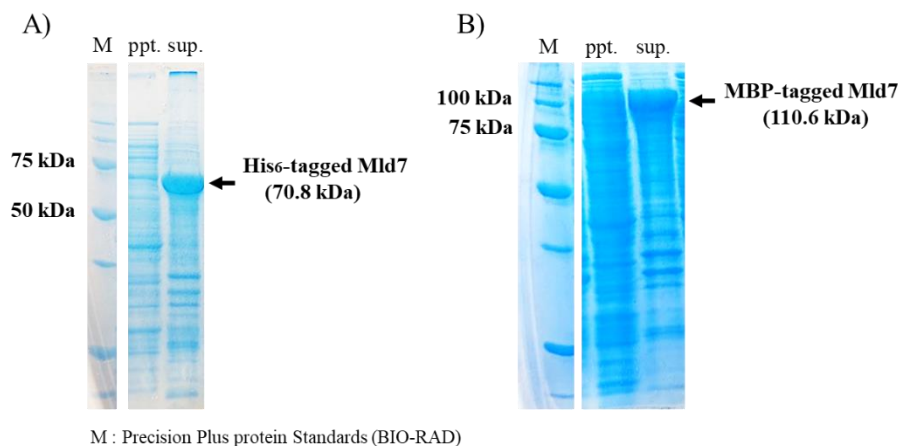


Figure 3-7. Mld7タンパク質のSDS-PAGE

3-3-2. 麹菌異種発現系を用いた Mld7 *in vitro* 酵素反応

上述した組み換え酵素に酵素活性がみられなかったことから、次いで、Mld7 を発現した麹菌形質転換体 AO-*mld7* から Mld7 を調製することにした。この粗酵素の調製には、液体窒素による凍結破砕法を用いた。MPY 培地で培養した AO-*mld7* を液体窒素によって凍結し、粉末状になるまで破砕し、Tris-HCl buffer (pH 7.4)によって酵素を抽出した。抽出した酵素溶液を濃縮し、酵素反応に用いた。この時、調製した粗酵素溶液を『CF (cell free extracts)』とする。ここで調製した CF を用いて、9 を基質とした酵素反応を行った (30℃)。反応生成物を LC/MS で分析したところ、10 が単一の生成物として観測された。これより、Mld7 が 9 から 10 への多段階反応を触媒していることを確かめられた (Figure 3-8)。

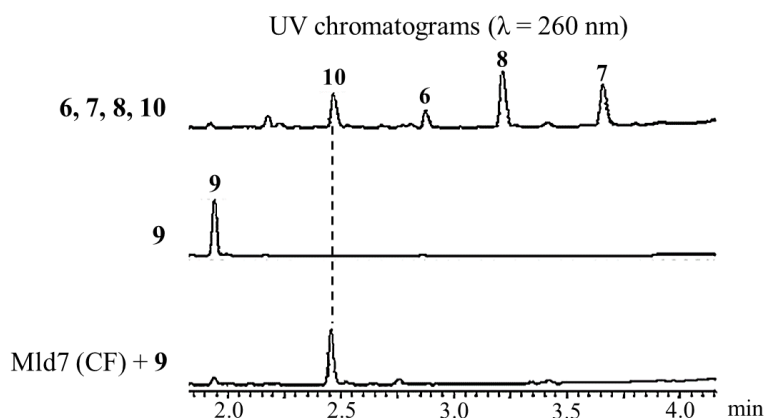


Figure 3-8. Mld7による9の変換反応

3-3-3. Mld7 が触媒する特異な多段階反応のメカニズム解明

上述したように、Mld7 は GMC oxidase に分類されるフラビン依存性の酸化酵素である。本酵素群は、一般に、アルコールをアルデヒドやケトンに酸化する酵素である²⁵⁾。これに対して、Mld7 が触媒する 6 から 7 および 8 が生成する反応は複雑であり、他の GMC oxidase ファミリー酵素の反応とは一線を画する点で興味深い。さらに、7 および 8 は、生産菌より単離されている天然物であることから、その反応機構解明は、「生産菌がどのようにしてこれら産物を創出しているのか？」という本質的な疑問の解明にもつながると考えられる。なお、特別に記載しない限り、Mld7 の反応は全て上述した CF 溶液を用いている。

まず、生合成中間体である 6 を基質として、先ほどと同様に 30℃で酵素反応を行ったところ、8に加えて、新たな生成物 11を確認した (Figure 3-9)。11の分子量は、6と比較して2 m.u.増加していたことから、アルデヒドであると予想された。そこで6から化学合成したアルデヒド 11と比較したところ、その保持時間が一致した。なお、11は、dehydroarmillyl orsellinateとして単離されている天然物である²⁶⁾。上述したように、9を用いた場合には対応するアルデヒドが観測されていないことを考慮すると、6から11への酸化反応は、9のデオキシ体である6を用いた場合に進行したシャント生成物と考えている。ただし、GMC oxidase が触媒する典型的な酸化反応が進行したことから、Mld7の触媒する反応は、C13位の水素がヒドリドとしてFADへと受け渡されることから開始されると推定できた。また、11をTris-HCl buffer (pH 7.4)中でインキュベートすると、非酵素的に8へと変換された (Figure 3-10)。この11から8への変換反応は、酵素存在下でも促進されなかったことから、11はMld7の基質にはならないと考えられる。非酵素的な反応であるにも関わらず、ジアステレオマーは生成していなかったことから、1) C13位の酸化により二重結合の移動が促進されること、2) C6位への水酸基の立体選択性の制御には隣接するC5位のアシル基が関与することが示唆された。

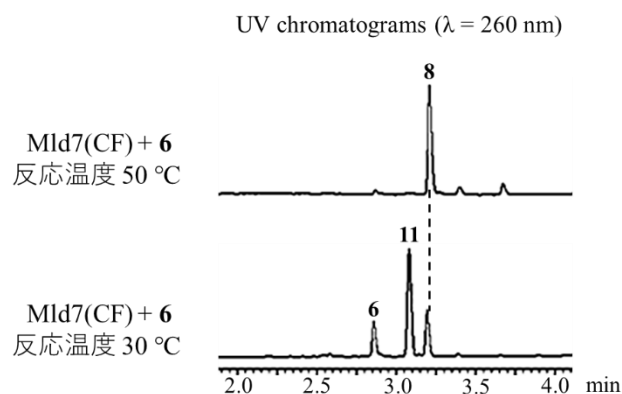


Figure 3-9. 温度の違いによるMld7を用いた6を基質とした酵素反応

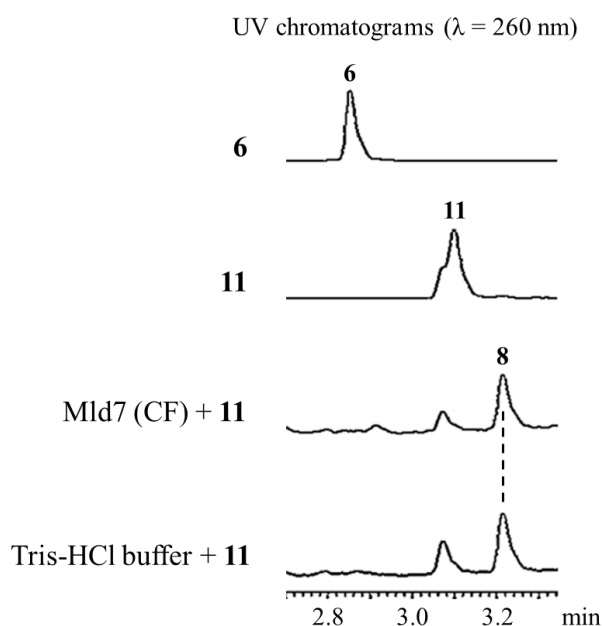


Figure 3-10. IntXの非酵素的な変換反応

続いて、反応温度を 50°Cに変更して 6 を用いた酵素反応を行うと、8 を主生成物として観測した (**Figure 3-9**)。30°Cでの反応と同様、異種生産や微生物変換で観測されていた 7 は、極少量しか観測されなかった。そのため、7 の生産には特別な制御機構が関与することが示唆された (後述)。次いで、8 の生成における C6 位酸素原子の由来を明らかにするため、重酸素水を使ったラベル化実験を行った。50%の $^{18}\text{OH}_2$ 存在下と $^{16}\text{OH}_2$ で生成した 8 の分子量を比較すると、 $^{18}\text{OH}_2$ 存在下で生成した 8 の分子量が 2 m.u. 増加していた。これより、C6 位の水酸基の由来は水分子であることが明らかになった (**Figure 3-11**)。

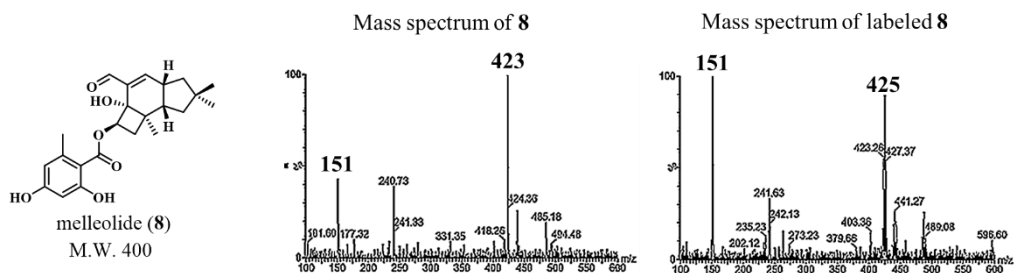
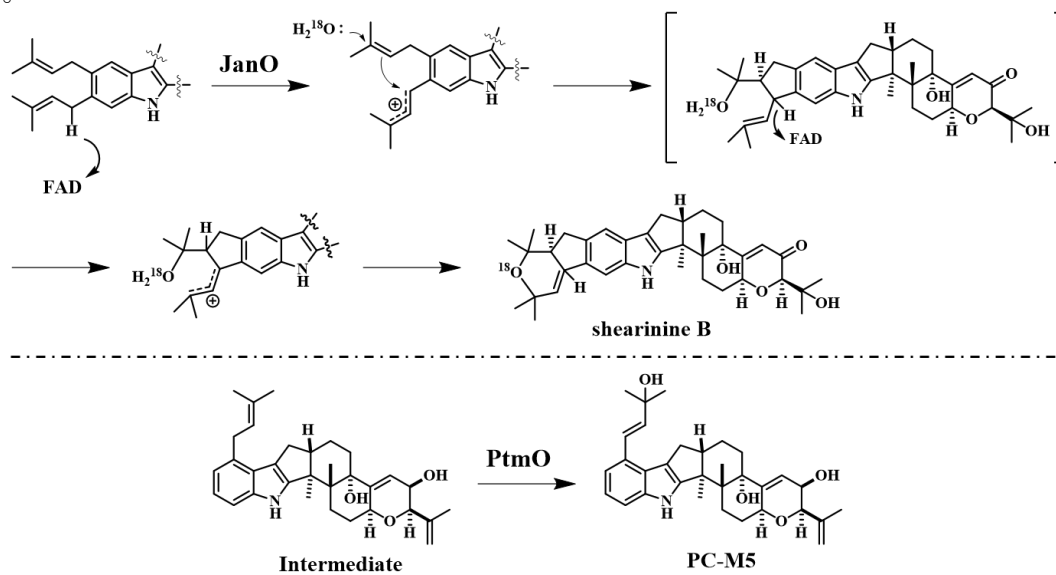


Figure 3-11. 18Oラベル化実験

Mld7 と同様に、フラビン依存性酸化酵素による酸化反応の過程で水分子による求核攻撃が進行する例としては、ペニトレム生合成における酸化酵素 PtmO によるアリルアルコールの生成やシアリニン生合成における酸化酵素 JanO による 2 環性骨格の構築が挙げられる (Scheme 3-2) ²⁷⁾。これらの酵素においては、酸化反応と共役して生成した還元型フラビンは、分子状酸素により再酸化される。この反応が進行すると、過酸化水素が発生する。Mld7 でも同様の反応が進行していると考え、AmplexTM Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit を用いて、H₂O₂ の発生を確認した (Figure 3-12)。その結果、6 を基質として用いた場合にのみ、酸化生成物である resorufin に由来する 570 nm における吸収の増加がみられたことから、反応に伴い、H₂O₂ が発生していることを確認できた。



Scheme 3-2. PtmO, JanO oxidation

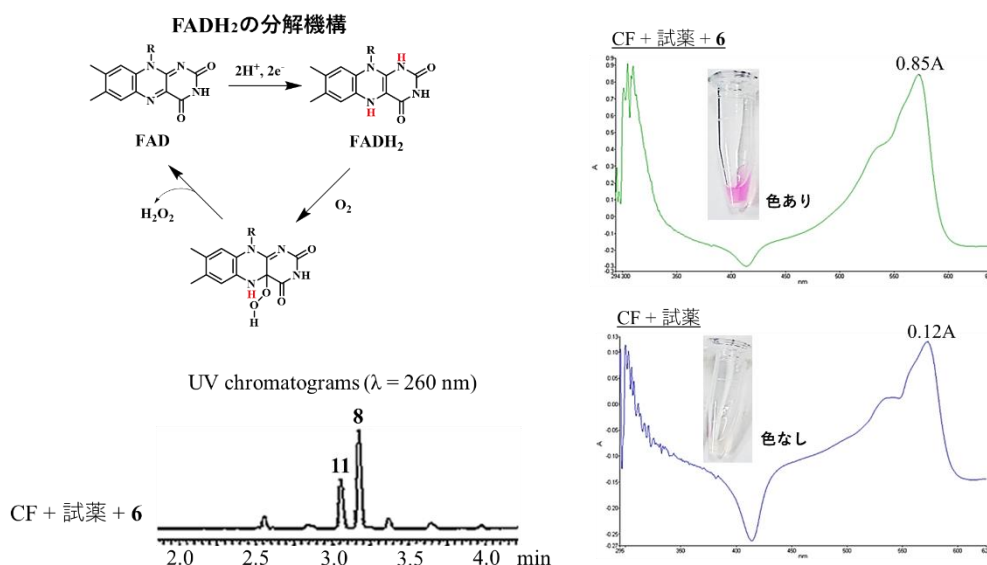


Figure 3-12. H₂O₂発生確認実験

Mld7 反応機構の提唱①

Mld7 が分類される GMC oxidase ファミリーの酸化酵素は、FAD を補酵素としてアルコールの酸化反応を触媒する。この際、酵素間で高く保存されているヒスチジン残基が塩基としてアルコールからのプロトンの引き抜きを触媒すると報告されている²⁵⁾。Mld7 の反応においてアルデヒド **11** の生産を確認したことと、反応に関与するヒスチジン残基が Mld7 においても保存されていたことから (Figure 3-13)、Mld7 においても同様の反応が進行していると考えられる。Mld7 の触媒する反応が他 GMC oxidase と大きく異なる点は、単純酸化生成物 **11** は副生成物であり、真の生成物は **8** である点にある。その推定反応機構を Scheme 3-3 にまとめる。まず、**6** の C13 位水酸基がアルデヒドへと酸化されて **11** が生成する。**11** が Mld7 の基質にならなかったことを考えると、生成した **11** は酵素の活性部位からリリースされることなく、再度プロトン化を受けることで **IntB** が生成すると考えられる。**IntB** は、脱水反応とそれに続くオルセリン酸部分との隣接基関与により環状中間体 **IntD** へと変換され、これが水分子によって求核攻撃を受けることで **8** が生成したと考えられる。この反応機構に関しては、東京大学の内山真伸教授に依頼して、計算化学的な検証を行って頂いた。その結果、脱水⇒隣接基関与を経由する **pathway 1** では、C8 位の 水酸基の脱水反応 ($\Delta G^\ddagger = +16.6$ kcal/mol) に続き、アシル基の隣接基関与 ($\Delta G^\ddagger = 0$ kcal/mol) によって、**IntC** を経て **IntD** が生成する (Scheme 3-3)。最も高い活性化障壁が +16.6 kcal/mol であることから、**IntC** から **IntD** への変換反応は室温でもスムーズに進行する。隣接基関与が先に進行する **pathway 2** では、脱水反応における活性化障壁が $\Delta G^\ddagger = +27.8$ kcal/mol と高かったことから、**pathway 1** により反応が進行していることが支持された (Scheme 3-3)。一度、**IntD** が生成すると、 α 面から水分子が求核攻撃することで **8** が生成する。反応の過程で生じた還元型フラビンは、分子状酸素による再酸化を受けることで酸化型フラビンへと変換されるため、再び、基質の酸化反応に利用される。

PNO -----MADGVRMTRAKVEHAPNCDIVIVGGGSAGSLLA
 CO -----MHIDNIENLSDREFDYIVVGGGSAGAAVA
 GO ---MQTLLVSSLVSVSLAAALPHYIRSNIEASLLTDPKDVSGRTVDYIIAGGGLTGLTTA
 MId7 MPALTYLLLLAAIGASSVHSLPS-----KQSCDAAVTPSSFSTSLDVVIVGGGTAGLVLA

N-terminal hydrophobic disordered region

PNO ARLSEDPDSRVLLIEAGEEP--TDPDIWNPA-----AWPALQ-GRSYDWDYRTEAQAGT
 CO ARLSEDPASVALVEAGPDDR-GVPEVLQLD-----RWMELL-ESGYDWDYPIEPQENG
 GO ARLTENPNISVLVIESGSYESDRGPIIEDLN-----AYGDI FGSSV-DHAYETVEL-AT
 MId7 SRLSESKKLQVGVIIEGG-YDRINDPLIDVPNAANALGYQALFGNSTYDWEYTSVPQRL
 :*:*. * :*:.* * : * *

PNO AGRAHHWARGRLIGSSCLHAMGYMRGHP SDFQAWVDASGDR-RWGWEDELLPVFQAIEDH
 CO NSFMRHARAKVMGGCSSHNSCIAFWAPREDLDEWEAKYGAT-GWNAEAAWPLYKRLETN
 GO NNQTALIRSGNGLGGSTLVNGGTWTRPHKAQVDSWETVFGNE-GWNWDNVAAYSLSQAERA
 MId7 DGRVLSYPSGKVLGGSSAINGITIQRSREDYDAWGNAFNGPEWTFDALLPYFKRYERW
 . .. :*:.* :. : : * * * : *

PNO PLGGDG-----IHGKGGPLPIHLPA----DEVSPARAFIEAGASLGLPRLEGHN
 CO EDAGPD-----APHHGDSGPVHLMNV---PPKDPTGVALLDACEQAGIPRAKFNT
 GO RAPNAKQIAAGHY-FNASCHGVNGTVHAGPRDTGDDYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFG
 MId7 HAPTLSATGDLDSDELSAVHGT DGRIAV-----SYNNFLTGVDPVPLTQAGIA----LG
 :* : *:

PNO SG-----EMIGVTPNSLNI-----RDGRRVTAADAWLTKAVRGRKNLTILTGSRVRL
 CO GT-----T-VVNGANFFQIN--RRADGTRSSSSVSY-IHPIVEQENFTLLTGLRARQL
 GO CG-----DPHGVSMPNTLHEDQVR-----SDAA-REWLLPNYQRPNLQVLTGQYVGKV
 MId7 LGPTQNPDGGDDSLFPNFGASHGLDPATGNRSYAANGYYGQTERCRSNLHLLTGAVVTRI
 * : : :*: :*** . :

```

PNO KLEGNQVR-SLEVVG-----RQGSAEVFADQIVLCAGALESPALLMRSGIGPHDVLDA
CO  VFDADRRCTGVDI VDSAF---GHTHRLTARNEVVLSTGAIDTPKLLMLSGIGPAHLAE
GO  LLSQNGTTP--RAVGVEFGTHKGNTHN VYAKHEVLLAAGSAVSPTILEYSGIGMKSILEP
MId7 VWDK-KNAA--KAVGVEYAAGN-STFTVKASKEVILSAGSLRSPQILELSGVGNKTLLOS
      .          * .          . : : * . : * : * : * : *

PNO AGVGCLIDMPDIGRNLQDHLLGAGNLYAARKPVPPSRLQHSE-----
CO  HGIEVLVDSPGVGEHLQDHPEGVVQFEAK-QPMVAES-----
GO  LGIDTVVDLPV-GLNLQDQTTATVRS---RITSAGAGQGQAAWFATFNETFGDYSEKA-
MId7 LNISVVVDLPQVGENLQEQFIAATDYLVRDGVITLDALGNNATFLSEQQONLYRTNKTGAF
      . :   : : * * * : * : :   . .

PNO -----SMAYMRA---DSFT---AAGQPEIVVGCGV-----
CO  -----TQWWEI---GIFTPTEDGLDRPDLMHYS-----
GO  HELLNKLE-----QWAEAEAVARGGFHN-----TTALLIQYENYRDWIVNHNVA
MId7 TYLLNTNAPTPIRSLVPEDQYTTMRAALDTFLASE--TLTPLQIVQYNHTIQLLDAGEVA
      :          . *          : :

PNO ---APIVSES--FPAPAAGSAY-SLLFGITHPTSRGSVRISGPELGDRL-IIDPAYLQTG
CO  ---VPFDMNTRLRHGYPTTENGFLSTPNVTHARSRGTVRLRSRDFRDKP-MVDPRYFTDP
GO  YSELF LDT-A-----GVASFDVWDL LPFTRGYVHILDKDPYLHHFAYDPQYFLNE
MId7 TSSLLVVPSSGGLVSTPAAGQGYISVVSPPGHFPSRGNVHINTTNPLAYPL-IDSAFLTNP
      .          . * .          : * * : :   :          * : :

PNO R--DRERFRRALEASRTIGHRDELAGWRERELLPGTPNS----AAEMDDFIARSVITHHH
CO  EGHDMRVMVAGIRKAREIAAQPAMAEWGTRELSPGVEAQ---TDEELQDYIRKTHNTVYH
GO  L--DLLGQAAATQLARNISNSGAMQTYFAGETIPGDNLAYDADLSAWTEYIPYHFRPNYH
MId7 W--DVQATINVMKFVRRWVATSD--VIVSPGTPPQEA--DSWTDDQWTAYVQSVLGTAAH
      *          . *          *          : :          : *

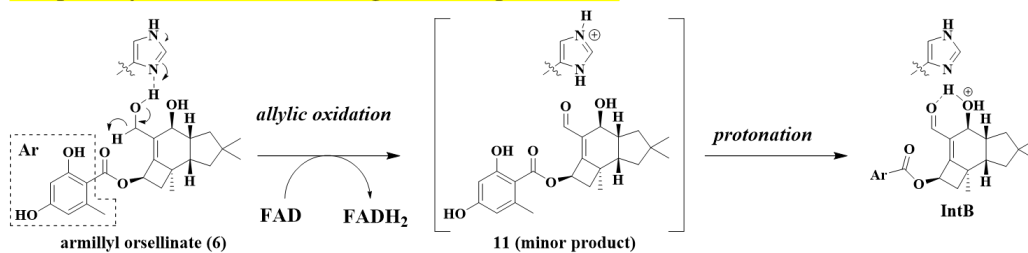
PNO PCGTCTRMGKDPDA--VVDANLRLKALDNLFVVDASIMPNLTAGPIHAAVLIAAETFARQY
CO  PVGTVMRGAVEDEMSPLDPEL RVKVTGLRVADASVMPEHVTVNPNTVMMIGERCADLI
GO  GVGTCSMMPKEM-GGVVDNAARVYGVQGLRVIDGSIPPTQMSSHVMTVFYAMALKISDAI
MId7 PVGTAAMASQKL-GGVVDPRFKVYGLQNV RVVDASVFPMHIGVAPLSTTYMLAEKAADSI
      ** *          : *   : : . : * * . : *          .   : .   :

PNO -----520
CO  RSARAGETTTADAELSAALA546
GO  LEDYASMQ-----605
MId7 KQDLNAY-----636

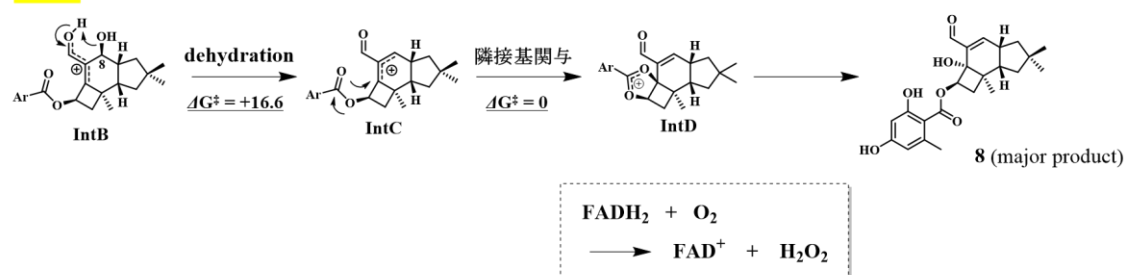
```

Figure 3-13. MId7のアミノ酸配列のアライメント

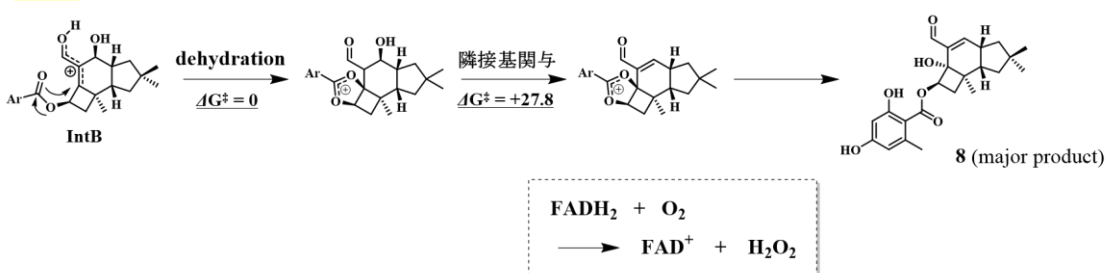
Simple allylic oxidation leading to minor product 11



Path 1

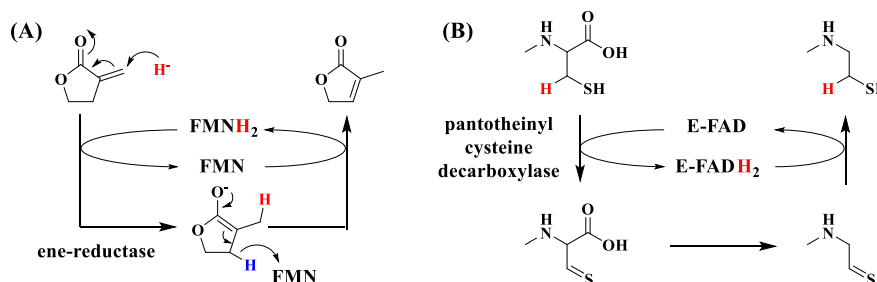


Path 2



Scheme 3-3. Biosynthetic pathway of 8

次に、6 から 7 への変換反応を検討した。上述した反応機構、および、7 と 8 の構造の違いを考慮すると、生じたカチオン性中間体 IntD に対して、水分子の代わりに FADH₂ のヒドリドが C6 位に対して求核攻撃を行えば 7 が生成すると推定された。この仮説であれば、先の酵素反応条件下では、還元型フラビンが分子状酸素によって酸化されていたために 7 が生産しなかったことを上手く説明できる。また、単一の酵素が触媒する類似の水素移動反応も報告されている²⁸⁾ (Scheme 3-4)。そこで、FADH₂ の分解を抑制するため、還元的な条件下で in vitro の酵素反応を行ったが、上手く反応は進行しなかった。



Scheme 3-4. 水素転位反応を触媒する酸化還元酵素の報告例

還元条件下では反応が進行しなかったことから、続いて、*in vitro* で行っている反応を *in vivo* の条件へと近づけるために、凍結破砕法の過程で除去した沈殿物 (debris) を添加した酵素反応を行った。Mld7 酵素溶液に対して、遺伝子を導入していない *Aspergillus oryzae* から調製した debris を添加して反応 (30℃) を行ったところ、意外なことに、**8** や **11** の生成が抑制され、**7** が主生成物として得られた (**Figure 3-14**)。この debris には、細胞壁、細胞膜などの多数の成分が含まれている。この中から、反応制御に関わる要素を絞り込むために、麹菌から調製したプロトプラスト (細胞膜)、および、酵母 (細胞壁、細胞膜) と大腸菌 (細胞膜) から調製した debris を添加して反応を行ったところ、いずれの場合においても **7** の生成を観測できた (**Figure 3-14**)。この時点で、細胞膜そのもの、もしくは、細胞膜に含まれている受容体や酵素、担体、チャネルが反応制御に関わることが強く示唆された。

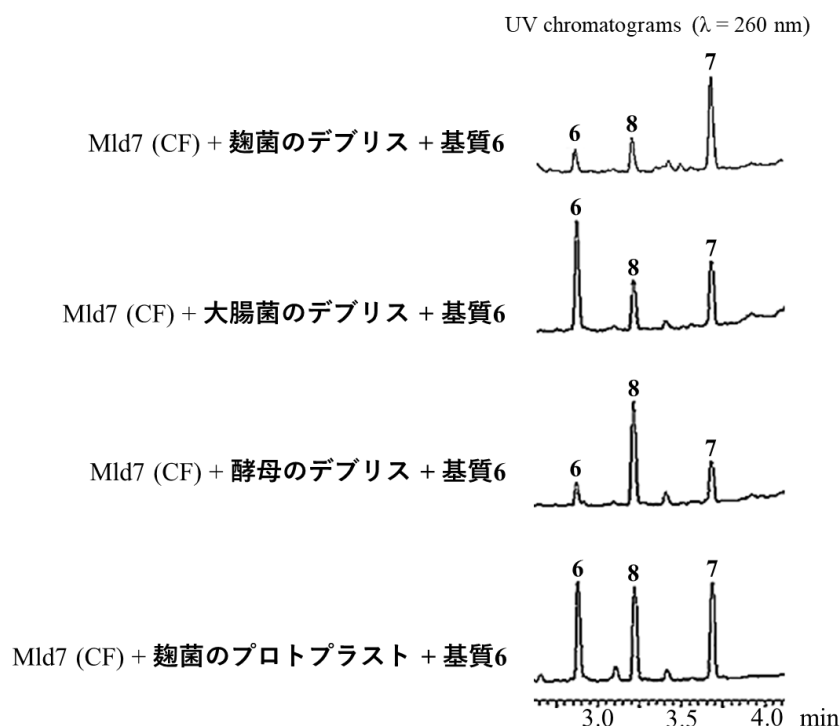


Figure 3-14. Mld7酵素反応への細胞膜成分の影響

細胞膜は、受容体などを構成するタンパク質が埋め込まれた脂質二重膜により構成される。その主な構成成分は、リン脂質二重膜である。そこで、このリン脂質二重膜に注目して、1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DHPC) を用いた酵素反応を行うことにした。DHPC は炭素数 6 のアルキル鎖をもつリン脂質であり、15 mM 以上の濃度においてミセルを形成することが知られている²⁹⁾。この DHPC (終濃度: 20 mM) を debris の代わりに添加したところ (30℃)、期待通り、**7** と **8** の生成が観測された。一方、DHPC の親水性部分にあたる L- α -グリセロホスホリルコリンのみを用いて酵素反応を行ったが、**8** と **11** の生成のみ観測された (**Figure 3-15**)。以上の実験結果から、ミセルの添加によって Mld7 の機能がスイッチングすることが明らかになった。DHPC は、鎖長の異

なる 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC)と共存した場合、アルキル鎖の長いリン脂質と短いリン脂質から形成されるディスク上の脂質会合体であるバイセルを形成することが知られている。このバイセルは、長鎖のリン脂質が形成する平面部分が二重膜構造を持つことから、最小の脂質二重膜構造モデルとしてよく用いられる。DMPC と DHPC の濃度によりサイズの異なるバイセルをつくりわけることができるため、[DMPC]/[DHPC]=0、0.25、0.50、0.75、1.00 の割合両者を混合して反応を行ったところ、バイセルのサイズが大きくなるにつれて **7** の生成比が減少することがわかった (Figure 3-16)。

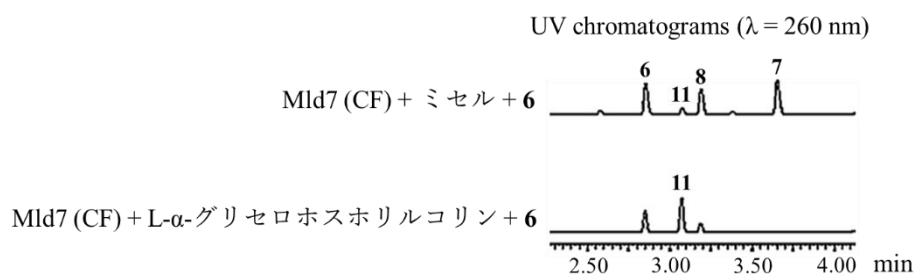


Figure 3-15. Mld7酵素反応へのDHPCの影響

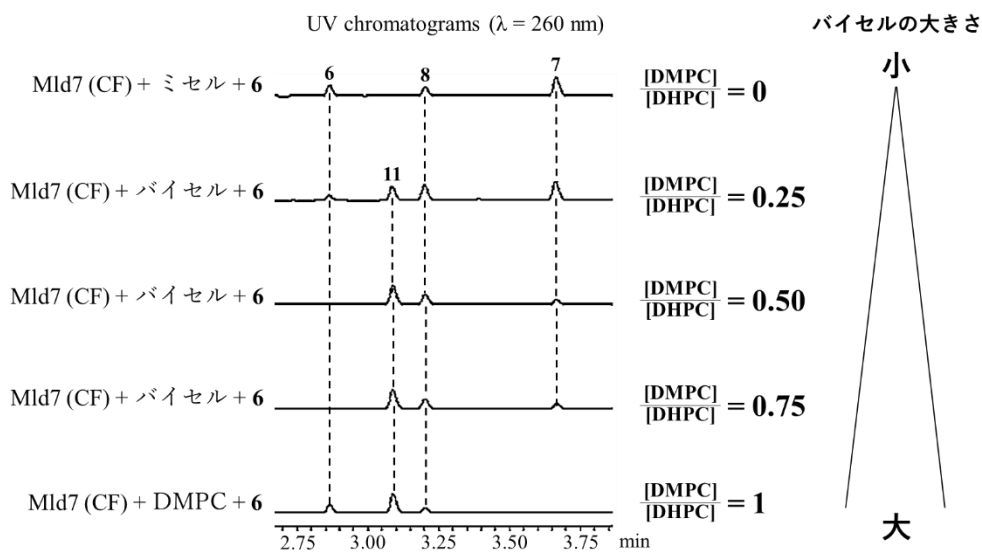


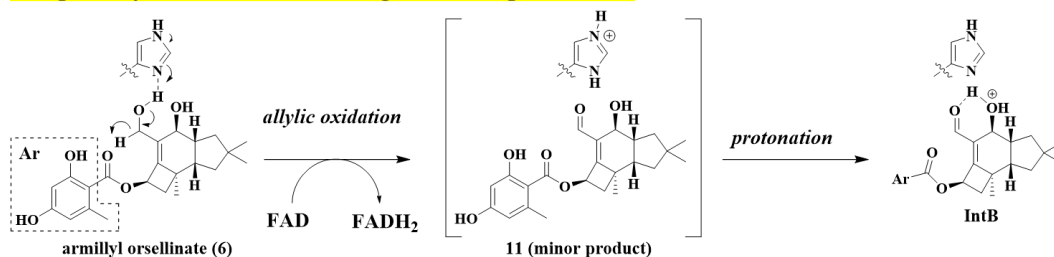
Figure 3-16. Mld7酵素反応へのバイセルの大きさの影響

Mld7 反応機構の提唱②

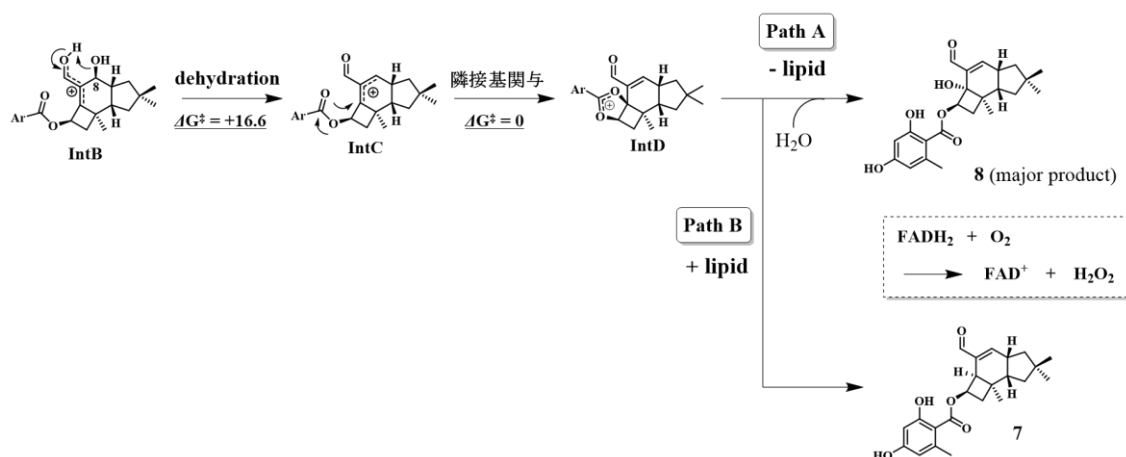
以上の結果から、Mld7 の反応は膜の存在の有無によって、その機能の一部が制御されることがわかった。**7** と **8** の構造の違いを考慮すると、上述したように、反応の分岐点は **IntD** になると考えられる。すなわち、膜が存在しない場合は、**IntD** に対する水分子による求核攻撃によって **8** が生成する (Path A)。一方、膜の存在下では、FADH₂ による還元反応が進行し、**7** が生成する (Path B) (Scheme 3-5)。**7** を基質としたときに **8** の生成が確認されなかったことから、Path A と Path B は互いに独立していることがわかった (Figure 3-17)。また、細胞膜存在下で **9** を基質とした反応を検討したが、**7** に相当す

る生成物は観測されず、**10** を単一の生成物として与えた。このことから、Mld7 の触媒する反応は、膜の有無に加えて、基質の構造のわずかな違いによっても厳密に制御されていることがわかった。私の知る限りにおいて、これほど複雑な反応制御機構を備えている GMC oxidase は報告されておらず、Mld7 が触媒する反応の特異性を示していると考えている。

Simple allylic oxidation leading to minor product 11



Multistep reactions to synthesize 7 and 8



Scheme 3-5. Biosynthetic pathway of 7 & 8

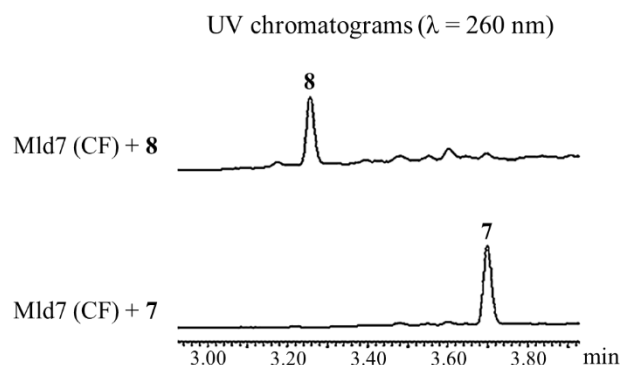


Figure 3-17. 7と8を基質としたときのMld7酵素反応

3-4. 考察

・ Mld7 の機能について

GMC oxidase はフラビン依存性の代表的な酸化酵素である²⁵⁾。上述したように、アミノ酸配列から、Mld7 はこのグループに分類されると予想された。本酵素群は、通常、アルコールからアルデヒドへの単純な酸化反応を触媒するが、Mld7 は、酸化、脱水を伴う二重結合の移動、求核付加反応を触媒する点で、通常の GMC oxidase とは異なる機能をもつ。また、膜の有無により求核剤が変化する点も興味深く、GMC oxidase の新しい機能の発見という意味において、学術的にも重要であると考えている。また、melleolide 生合成において、本酵素は、**11** (Δ^6 -protoilludene 骨格+C8-OH)、**8** (Δ^7 -protoilludene 骨格+C6-OH)、**7** (Δ^7 -protoilludene 骨格+C6-H) という代表的な天然物をつくるための鍵酵素である。そのため、本酵素は、70 種類以上にも及ぶ melleolide 類の構造多様性の構築に寄与する鍵酵素であると位置づけられる。本酵素の発見により、多様な melleolide 類を酵素の機能を活用して合成することが可能になると期待している。

・ 膜との相互作用部位について

Mld7 は、膜と相互作用することで機能のスイッチングが起こることが強く示唆された。生産菌/麹菌内では、細胞内に存在するリソソームや小胞体器官と相互作用していると推定している。その相互作用部位を推定するべく、Mld7 タンパク質の 3 次元構造を AlphaFold2 によって構造を予測した。その結果、N 末端領域に疎水性の特徴的な領域があることが明らかになった (**Figure 3-18**)。この構造的な特徴は、膜結合領域をもつチトクローム P450 の構造的な特徴と類似している³⁰⁾。従って、現時点においては、この部位が細胞膜 (in vivo/in vitro) やミセル (in vitro) と相互作用すると考えている。この N 末端の疎水性部位が膜と相互作用すると、Mld7 のタンパク質の立体構造が変わることで、FADH₂ からヒドリドを **IntD** に供与しやすい構造をとることにより **7** を与えたと予想される。一方で、膜が存在しない場合は、Mld7 の構造が変化し、**IntD** に H₂O が求核攻撃することによって、**8** が生成して放出されたと推定される。

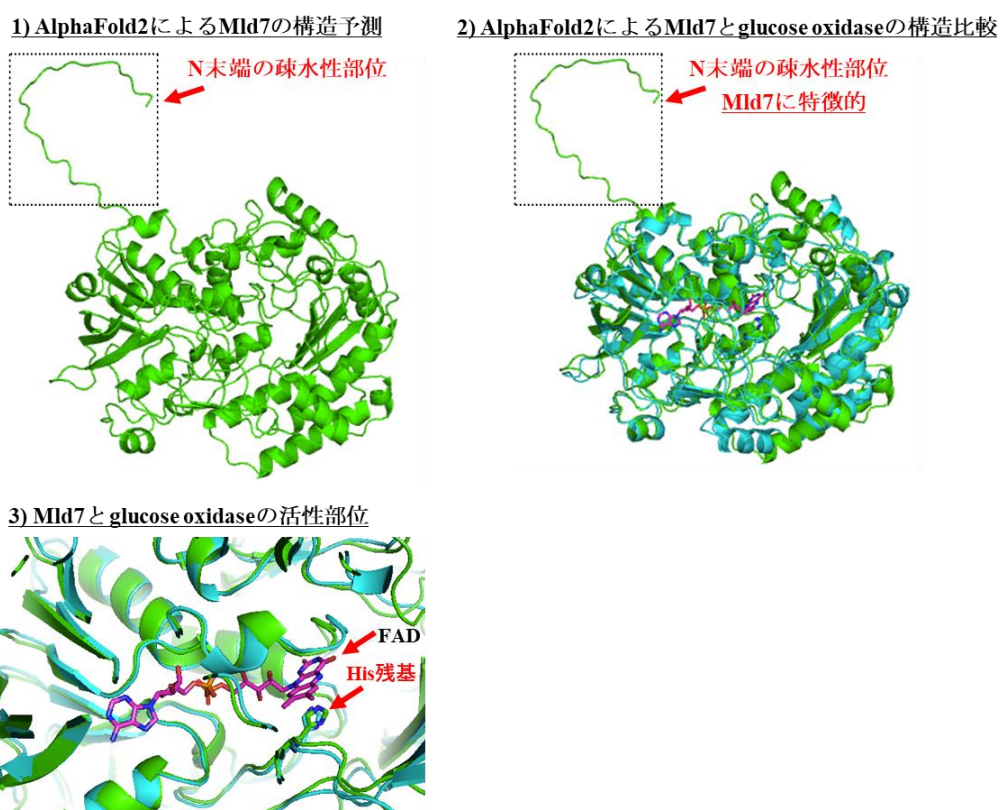


Figure 3-18. AlphaFold2によるMld7の構造予測

3-5. まとめ

本章では、担子菌由来天然物の汎用的異種宿主発現法の開発と酵素機能解析を目指して、melleolide 生合成経路の解明を行った。異種宿主発現による生合成中間体の取得と取得した中間体を用いた微生物変換実験や *in vitro* 反応から、1 α -hydroxymelleolide に至る生合成後期の反応に関わる酵素を特定し、その生合成経路を明らかにした。また、GCM oxidase ファミリーに分類される Mld7 が触媒する反応の反応機構を詳細に解析することで、本酵素が膜と相互作用することで反応機構が制御される新しいタイプの GMC oxidase であることを明らかにした。本酵素は、70 種類以上の melleolide 類をつくるための鍵酵素の一つであり、本酵素の発見は、多様な melleolide 類を酵素の機能を活用して合成することにつながると期待している。

3-6. 実験部 (melleolide)

1. 培地

LB (agar) medium: 1% Trypton, 0.5% Yeast Extract, 1% NaCl, 1.5% Agar

MPY medium: 3% Maltose, 1% Polypeptone, 0.5% Yeast Extract

DPY medium: 2% Dextrin, 1% Polypeptone, 0.5% Yeast Extract

PG medium: 20% Potate, 2% Glucose, 1.5% Agar

CD agar medium: 3.5% Czapek-Dox, 4.6% NaCl, 1.5% Agar

Rice medium: 100 g Polished rice, 10 mg Adenine

CYA medium: Czapek-Dox 10 ml, Sucrose 30 g, Trace elements 1 ml, Yeast extract (Carl Roth) 5 g, dH₂O 1000 ml (pH 6.3±0.2)

PG (+ hyg) medium: 20% Potate, 2% Glucose (, 1.5% Agar), 1.2 M sorbitol, 100 µg/mL hygromycin

YEPD medium: 20g/L Glucose, 20g/L Yeast Extract, 20g/L bacto peptone

5-FOA agar medium: 20% Potate, 2% Dextrin, 1g/L 5-フルオロオロチン酸(5-FOA), 1.5% Agar

2. 試薬

a) 自作試薬

大腸菌ミニプレップ用

Sol I: 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl, 50 mM MD-glucose (pH 8.0)

Sol II: 0.8 % NaOH, 1 % SDS

Sol III: 29.5 % CH₃COOK, 12.8 % CH₃COOH, 20 mM EDTA (pH 8.0)

PEG solution: 20 % PEG 6000, 2.5 M NaCl

麹菌形質転換用

solution 0: 0.8 M NaCl, 10 mM NaH₂PO₄ (pH 6.0)

solution 1: 0.8 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

solution 3: 40 % PEG 4000, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

フィルター滅菌 (Sartorius stedim bioteth, Mimisart[®], 0.20 µm)

麹菌孢子回収用懸濁液 : 0.1 Tween 80, 0.8 % NaCl

フィルター滅菌 (Sartorius stedim bioteth, Mimisart[®], 0.20 µm)

b) 市販試薬

RNase: Ribonuclease A (Biochemical grade, ncalai tesque)

In-Fusion 試薬: In-Fusion[®] HD Cloning Kit (TaKaRa)

Ligation 試薬: DNA Ligation Kit Ligation high Ver. 2 (TOYOBO)

DNA polymerase: 2×KOD PCR Master Mix (TOYOBO)

糸状菌細胞壁溶解酵素: Yatalase (TaKaRa)

DNA ゲル溶出キット: FastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics)

酵素の検量線作成 Quick Start Bradford Protein Assay Kit (Bio-Rad)

その他生物実験に用いた試薬: 100 mg/ml アンピシリン (Nacalai tesque), 1.0 M IPTG (Wako), TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))

3 プラスミド構築

3-1. クローニング

当研究室の長嶺が構築したプラスミド DNA をテンプレートとして用い、PCR 反応で目的遺伝子を増幅した。PCR に用いるポリメラーゼは、KOD-One を使用した。また、オリゴヌクレオチドプライマーは、北海道システムサイエンス株式会社に依頼した。<https://www.hssnet.co.jp>。増幅した DNA は、1 %アガロースゲルにて電気泳動後、目的のバンドを切り出し、Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics)を用いて精製した。その後、以下に示す方法に従って目的遺伝子を挿入した異種発現用プラスミドを構築した。

3-2. In-Fusion[®]法によるプラスミド構築

精製したインサート DNA をベクターDNA に連結する際に、In-Fusion[®]法を用いた。本手法は、インサートを PCR で増幅する際、プライマーにベクターとの相同配列を 15 bp 以上組み込むことで、簡便にプラスミド構築ができるものである。ベクターを適当な制限酵素で消化した後、アガロースゲルを用いて精製した。また、同一のゲルにベクターとインサートをアプライし電気泳動を行って、それぞれの輝度を確認し、ベクターとインサートのモル比を以下の式より算出した。

$$\text{pmols} = (\text{weight in ng}) \times 1,000 / (\text{base pair} \times 650)$$

インサートとベクターのモル比が 2:1 で、総液量が 4 μ L になるように 0.2 mL エッペンチューブで混合した。これに In-Fusion[®]酵素溶液を 1 μ L 加え、50°C で 15 分インキュベートした。

【構築したプラスミド(自分が構築したプラスミド)】

- pDP801::*mld7* (cDNA, N 末端に対して His Tag を付けたもの)
- pDP801::*mld7* (cDNA, C 末端に対して His Tag を付けたもの)
- pColdI::*mld7* (kodon を最適化したもの)
- pMALc4E::*mld7* (kodon を最適化したもの)

【先行研究で構築したプラスミド(尾関さんが構築したプラスミド)】

- pDP201::*mldI/CPR*
- pDP401::*mldI*

- pDP401::mld1/2
- pDP401::mld1/14
- pDP401::mld1/2/14
- pDP601::mld12
- pDP601::mld7/12
- pDP601::mld4/7
- pDP601::mld7
- pDP601::mld7/4
- pDP601::mld7/8
- pDP601::mld7/8/12

【プライマーリスト】

Insert	Sequence 5'-3'	Size (コメント)
<i>mld5</i>	F: GCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGATGTCTCAACGCATCTTC	1080 bp
	R: GGGTACGACCCGGGCTAGAGATGAAATCCGTC	cDNA
<i>linker (mld5- mld3)</i>	F: ATTTCATCTCTAGCCCGGGTCGTACCCGATGATGAAAC	871 bp
	R: CCGAGTCATCCCGGGTTTGACGAGCTGCGGAATTG	
<i>mld3</i>	F: GCAGCTCGTCAAACCCGGGATGACTCGGATATTCTCAG	1601 bp
	R: TTACCTTAAGCCCGGGTCAGTGATATCCAAGGAG	cDNA
<i>linker (mld3- mld2)</i>	F: TGGATATCACTGACCCGGGCTTAAGGTAACAGGATAGCCTAGACC	1881 bp
	R: GTGTGTCATCCCGGGGGTGATGTCTGCTCAAGC	
<i>mld2</i>	F: AGCAGACATCACCCCGGGATGACACACGCATCGTCTAC	1589 bp
	R: CCTTCACGAGCTACTACAGATCCCGGGTTAGTAGTGGCCAAGAAGC	cDNA
<i>mld5</i>	F: CAAGCTCCGAATTCGAGCTCGGTACCATGTCTCAACGCATCTTC	1089 bp
	R: GTCTAGGCTATCCTGTTACGGTACCCTAGAGATGAAATCCGTC	cDNA
<i>linker (mld5- mld2)</i>	F: GGTACCGTAACAGGATAGCCTAGACCCACA	1098 bp
	R: CTTAAGCCCGGGTTTGACGAGCTGCGGAAT	
<i>mld2</i>	F: GCAGCTCGTCAAACCCGGGCTTAAGATGACACACGCATCGTCTAC	1592 bp
	R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTCATTAGTAGTGGCCAAGAAGC	cDNA
<i>mld5</i>	F: CAAGCTCCGAATTCGAGCTCGGTACCATGTCTCAACGCATCTTC	1089 bp
	R: GTCTAGGCTATCCTGTTACGGTACCCTAGAGATGAAATCCGTC	cDNA
<i>linker (mld5- mld3)</i>	F: GGTACCGTAACAGGATAGCCTAGACCCACA	1098 bp
	R: CTTAAGCCCGGGTTTGACGAGCTGCGGAAT	
<i>mld3</i>	F: GCAGCTCGTCAAACCCGGGCTTAAGATGACTCGGATATTCTCAG	1616 bp

	R: TCATCGGGTACGACTACCCGGGTCATCAGTGATATCCAAGGAG	cDNA
<i>mld1</i>	F: GCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCATGGCCCTCTTCTCAGCATATG	1599 bp
	R: ATCGGGTACGAGAATTCCTAATCCTGCTCAAATGG	cDNA
<i>linker (mld1-mld6)</i>	F: TGAGCAGGATTAGGAATTCGGTACCTCGTACCCGATGATGAAAC	874 bp
	R: CGCAGAATCCATCTTAAGTTTGACGAGCTGCGGAATTG	
<i>mld6</i>	F: GCAGCTCGTCAAACCTAAGATGGATTCTGCGTCTCTTG	1564 bp
	R: CTATCCTGTTACCTTAAGTCAGTCATCCTGCGTAATG	cDNA
<i>linker (mld6-cpr)</i>	F: GCAGGATGACTGACTTAAGGTAACAGGATAGCCTAGACC	1877 bp
	R: GTCGAAGACATGGATCCGGTGATGTCTGCTCAAGC	
<i>cpr</i>	F: AGCAGACATCACCGGATCCATGTCTTCGACGTCCTCATC	2235 bp
	R: CCTTCACGAGCTACTACAGATCCCCGGGATCCCTAGCTCCAGACATCCAG	cDNA
<i>mld8</i>	F: GCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCATCGATATGTCTGCCATGGGTAAC	987 bp
	R: ATCGGGTACGAATCGATTCAAGTAGTCTTTGCACTG	cDNA
<i>linker (mld8-mld13)</i>	F: CAAAGACTACTGAATCGATTCTGACCCGATGATGAAAC	873 bp
	R: GATGAACCCATGCTAGCTTTGACGAGCTGCGGAATTG	
<i>mld13</i>	F: GCAGCTCGTCAAAGCTAGCATGGGTTTCATCTTCGCATG	999 bp
	R: TATCCTGTTACGCTAGCCTATGCGTAGTCGTATTGC	cDNA
<i>Linker (mld13-mld14)</i>	F: CGACTACGCATAGGCTAGCGTAACAGGATAGCCTAGACC	1877 bp
	R: GCGTTGCCCATAAAGCTTGGTGATGTCTGCTCAAGC	
<i>mld7 (N 末タグ)</i>	F: GGAATTCGAGCTCGGTACCCATGGAACACCACCACCACCACATGCC AGCTCTCACTTATCTG	1911 bp
	R: CCTTCACGAGCTACTACAGATCCCCTTAGTATGCGTTCAAATCCTGCTTG	cDNA
<i>mld7 (C 末タグ)</i>	F: AGCTCCGGAATTCGAGCTCGGTACCCATGCCAGCTCTCACTTATCTGCTG	1911 bp
	R: TTCACGAGCTACTACAGATCCCCTTAATGATGATGATGATGATGGGATCC CTCGAGGGTACCGAGCTCCATATGGTATGCGTTCAAATCCTGCTTGATG	cDNA
<i>pColdI::mld7</i>	F: CGAGGGATCCGAATTCATGCCGGCGCTGACATATC	1911 bp
	R: TAGACTGCAGGTCGACTTAATACGCGTTTCAGATCTTG	kodon 最適化
<i>pMalc4E::mld7</i>	F: CAAGGTACCGGAATTCATGCCGGCGCTGACATATC	1911 bp
	R: TTGCCTGCAGGTCGACTTAATACGCGTTTCAGATCTTG	kodon 最適化

【Mld7_コドン最適化配列】

Gene name	Nucleotide sequences
mld7 (コドン最適化)	ATGCCGGCGCTGACATATCTTTTCTGGCGGCGATTGGCGCGAGCAGCGTGCATAGCCTGCCGAGCAAACAGAGCTGCGATCGGGCGGTGACCCCG AGCAGCTTTAGCAGCACGAGCCTGGATGTGGTGATTGTGGCGCGCGCACCGCGGGCCTGGTGCTGGCGAGCCGCCTGAGCGAAAGCAAAAACT GCAAGTGGGCGTGATTGAAGCGCGCTATGATCGCATTAACGACCCGCTAATTGATGTGCCAAACGCGGCCAACGCGCTGGGCTATCAAGCGCGCGTG TTTGGAATAGCACTTATGATTGGAATATACGAGCGTGCCGCGAGCGCGCCTGGATGGCCGCGTGCTGAGCTATCCGAGCGGCAAGTGTGGGCG GCAGCAGCGCGATTAAACGGCATTACCATTCAGCGCGGCGAGCCGCCGAAGATTATGATGCGTGGGGCAACGCGTTTGGCAACGGCCCGGAATGGACCT TTGATGCGCTGCTGCCGTATTTTAAACGCTATGAACGCTGGCATGCGCCGACCCCTGAGCGCGACCGCGCATCTGGATAGCGATGAAGTGAAGCGCGGT GCATGGCACCAGTGGCCGATTGCGGTGAGCTATAACAACTTTTAAACCGCGGTGAGCGTTCCGCTGACCCAAGCGGGAATTGCGCTGGGGCTGGG CCCGACGCGAAGCCGATGGCGGCGATGATAGCCTGTTTCCGAACCTTGGCGCGAGCCATGGCCTGGATCCGGCGACCGGCAACCGCAGCTATGC GGCGAACGGCTATTATGGTCAGACCGAACGCTGCCGCGAGCAACCTGCATCTGCTGACCGGCGCGGTGGTGACCCGCAATTGTGTGGGATAAAAAA CGCAGCGAAAGCAGTGGGCGTGAATATGCGGCGGGCAACTCAACCTTTACCGTGAAAGCGAGCAAGAAGTGAATCTGAGCGCGGGCAGCCTGC GCAGCCCGCAGATTCTGGAACCTGAGCGCGCTGGGCAACAAACCCCTGCTGCAGAGCCTGAACATTTCCGTTGGTAGTCGATCTGCCGCAAGTGGGCG AAAACCTGCAAGAACAGTTTATTGCGGCGACCGATTATCTGGTGCGCGATGGCGTGATTACCTGGATGCGCTGGGCAACACGCGACCTTTCTGAG CGAACAGCAGAACCTGTATCGACCAACAAACCGCGCGCTTTACCTATCTTCTTAACACCAACGCGCCGACCCGATTGCGAGCCTGGTGCCGAA GATCAGTATACCAACATGCGCGCGCGCTGGATACCTTTCTGGCGAGCGAAACCCCTGACCCCGCTGCAGATTGTGAGTATAACCATACATTACGCT GCTGGATGCGGGCGAAGTAGCCACATCTCACTTCTGTAGTTCCGAGCGCGCGCTGGTGAGCACCCCGCGCGCGGCCAAGGCTATATTAGCGT GGTGAGCAGCCCGGCCATCCGTTTAGCCGCGGCAACGTGCATATTAACACCAACCCGCTGGCGTATCCGCTGATTGATAGCGCTTTTCTGACC AACCCGTGGGATGTCAAGCGACCATTAACGTGATGAAATTTGTGCGCGCGCTGGGTTGCGACGTCGGATGTAATTGTGAGCCCGGGCACCCGCGCG CAAGAAGCGGATAGCTGGACCGATGATCAGTGACCGCGTATGTGCAGAGCGTGCTGGGCACCGCGCATCATCCGGTGGGACCGCGCGCATGGC GAGTCAGAACTGGGCGCGTGGTGGATCCGCGCTTAAAGTGATGGCCTGCAGAACGTGCGCGTGGTGGATGCGAGCGTGTTCCGATGCATATT GGCGTGGCGCGCTGAGCACCACCTATATGCTGGCGGAAAGCGCGGATAGCATTAAACAAGATCTGAACGCGTATTAA

4. 構築プラスミドの *E. coli* への形質転換 (塩化カルシウム法)

In-Fusion や Ligation で構築したプラスミドは大腸菌に導入し、培養した後に回収した。大腸菌の形質転換には、温度差によって遺伝子を導入する塩化カルシウム法を用いた。長鎖 DNA のクローニングに適した *E. coli* HST08 のコンピテントセルを、 -80°C から氷上に移して解凍した。そこへ In-Fusion 反応溶液を 2 μL (もしくは Ligation 反応液を 5 μL) 加え、氷上で 5 分間静置した。その後 42°C の湯浴で 30 秒熱し、速やかに氷上に移して 3 分間静置した。反応液を 1.5 mL エッペンチューブに移し、LB 培地を 950 μL 加え、 37°C 、30 分間の回復培養を行い、集菌後、ampicillin (final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加した LB 寒天培地に塗り拡げ、 37°C で 12 時間培養した。

4-1. *E. coli* (形質転換体)からのプラスミド抽出操作

大腸菌のコロニーを、ampicillin (final 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加えた 3 mL の LB 培地に爪楊枝を用いて植菌し、 37°C で 12 時間培養した。この際、培養液の一部はグリセロール溶液を加え (final 50 % w/v)、ストックとして -80°C で保存した。

プラスミド操作は、まず培養液を 1.5 mL のエッペンチューブに移し、遠心分離 (21,500 g, 1 min, 4°C) を行った。上清を捨て、sol I を 200 μL 加えてボルテックスにより菌体を懸濁した。その後、塩基性の sol II を 400 μL 加えて 10 回転倒混合し、細胞を溶解させて溶液が透き通る様子を確認した。続けて速やかに酸性の sol III を 300 μL 加えて溶液を中和し、白色沈殿の析出を確認した。さらにクロロホルムを 30 μL 加え、遠心分離 (21,500 g, 5 min, 4°C) を行った。上清 750 μL を別の 1.5 mL のエッペンチューブに移し、RNase 処理により、サンプル中の RNA を分解した。その溶液へクロロパン溶液の下層を 300

μL を加え、遠心分離(21,500 g, 5 min, 4°C)し、水層(上層)を回収することで、RNase を除去した。その後、回収した水層 700 μL を、別の 1.5 mL のエッペンチューブに移し、等量の冷イソプロパノールを加えた。ボルテックスで激しく攪拌した後に遠心分離(21,500 g, 10 min, 4°C)し、上清をデカンテーションで捨てた。沈殿物に 70 %冷エタノール 1 mL を加えて上下反転することで洗浄し、遠心分離(21,500 g, 5 min, 4°C)して上清をピペットマンで捨てた。その後、20 分間減圧乾燥させ、得られた白色固体に 30 μL の TE に溶解することでプラスミド溶液とした。得られた溶液は必要に応じて、吸光度を測定することで、プラスミド DNA の濃度を算出した。

5. 麹菌の形質転換 (protoplast-PEG 法)

100 mL の DPY 培地に、*A.oryzae* NSPID1 株もしくは形質転換体の孢子懸濁液(1.0×10^8 cell)を植菌し、30°C, 200 rpm で 1 日間培養した。得られた菌糸をガラスろ過器で集菌し、SP 水で洗浄し水分を除去した後、50 mL のファルコンチューブへ移した。そこにフィルター滅菌(Sartoriusstedimbioteth, Minisart®, 0.45 μm)した Yatalase(5 mg/mL)の Sol 0 溶液を加え、30°C, 200 rpm で 90 分インキュベートした。得られた懸濁液をミラクロースでろ過し、ろ液を回収した。遠心分離(スウィングロータ, 800g, 5 min, 4°C)し上清を除き、得られたプロトプラストの沈殿物を、0.8 M NaCl 水溶液 10 mL で優しく懸濁させた。懸濁液 10 μL を 100 倍希釈し、血球計算板と顕微鏡を用いてプロトプラスト数を計算した。残りの懸濁液を遠心分離(スウィングロータ, 800 g, 5 min, 4°C)して上清を捨て、沈殿を 2.0×10^8 cell/mL になるよう solution 2 とその 1/4 当量の solution 3 を加え、プロトプラスト溶液とした。

調製したプロトプラスト溶液 200 μL に対し、2 μg のドナープラスミド溶液および 6 μg の遺伝子破壊用 Cas9 プラスミドを加え、優しく混合した後に氷上で 2 分間静置した。その後、1 mL の solution 3 をゆっくりと加え、室温で 20 分間静置した。この溶液を 10 mL の solution 2 で希釈した後に、遠心分離(スウィングロータ, 800 g, 5 min, 4°C)し、菌体が剥がれ落ちないように上清を捨て、200 μL の solution 2 で優しく懸濁した。このうち 20 μL で 10 倍希釈液を、20 μL の 10 倍希釈液懸濁液で 100 倍希釈液をそれぞれ調製した。CD 培地に 1 枚あたり原液においては 180 μL、希釈液においては 200 μL を塗布し、0.6 %軟寒天を重層後、30°C で 3-7 日間培養した。得られた形質転換体は新たな CD プレートに植え継ぎ、再度培養後 4°C で保存した。栄養要求性マーカーに対する選択培地には、対応する栄養素(Uridine, Uracil)を含めないことで選択をかけた。

【構築した形質転換体】

『*A. oryzae* NSPID1 株に対する追加導入株』

- AO-N 末 His-Tag-mld7
- AO-C 末 His-Tag-mld7

- AO-*mld1*/2/5/6/CPR
- AO-*mld1*/2/5/CPR
- AO-*mld2*/5/CPR
- AO-*mld1*/4/CPR/12
- AO- *mld2*/4/7/12
- AO-*mld1*/CPR/12
- AO-*mld1*/CPR/7/12
- AO-*mld1*/4/CPR/7

『AO-*mld5*/*mld3*/*mld6*/CPR/*mld4*/*mld13*/*mld15* (AO/(AON))に対する追加導入株』

- AO/(AON)-*mld1*/2/7/8/12/14
- AO/(AON)-*mld1*/2/7/12/14
- AO/(AON)-*mld1*/2/7/12
- AO/(AON)-*mld2*/7/8/12/14
- AO/(AON)-*mld1*/7/8/12
- AO/(AON)-*mld7*/8/12
- AO/(AON)-*mld7*/12

【利用した尾関さん構築形質転換体】

- AO-*mld7*
- AO-*mld1*/2/CPR/7/8/12/14
- AO-*mld5*/3/6/CPR/4/7/8/12/13/14 (armillol (**5**)生産株)
- AO-*mld5*/3/6/CPR/4/13/7/15 (melleolide (**8**)生産株)
- AO-*mld5*/3/6/CPR/4/13/15 (armillyl orsellinate (**6**)生産株)

【利用した長嶺さん構築形質転換体】

- AO-*mld1*/2/5/3/6/CPR/4/13/7/8/12/14/15 (α -hydroxymelleolide (**10**)生産株)

6. *pyrG* 脱落株の調製

以前まで、形質転換によって二次代謝産物の生合成経路に存在する多数の生合成酵素遺伝子を導入する場合において、選択マーカーの数に制限があることが課題として考えられてきたが、最近では、その解決策として選択マーカーをリサイクリングすることで繰り返し利用する実験法が提案されており、選択マーカーを相同領域間で組み替えることによって、リサイクリングする方法が報告されている。本実験では、先行研究と本研究室における実験結果を参考に、*pyrG* 欠損株を利用した形質転換を行った。ここでは、ウラシル要求性を相補する *pyrG* 遺伝子を選択マーカーに使用し、*pyrG* 欠損株が 5-フルオロオロチン酸(5-FOA)耐性を示すことを利用して、*pyrG* 相補株を 5-FOA を含む培地

で培養することで、選択マーカーの脱落を行った。選択マーカー脱落株の調製操作に関しては、形質転換体の孢子をプレートから爪楊枝で取り、5-FOA プレートに複数の線を引くように植え継いだ。30℃で3日程度培養すると、菌糸が生育するので、選択マーカー脱落株を確実に得るために、そこから再び同様の操作で5-FOA プレートに2回目の植え継ぎを行った。ここで得られた形質転換体を選択マーカー脱落株として、次の形質転換に使用した。

7. 代謝産物の抽出・解析 (米培地)

米培地に酢酸エチル 3 mL を添加し、12 時間ほど静置した。その後、有機層を回収し、等量の H₂O を加えて分液した後、再度有機層を回収した。回収した有機層を風乾し、MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 µm, PTFE, 4 mm) を通した後、UPLC/MS によって分析した (**Method A**)。

Method A

LC-MS analysis conditions

ionization mode: ES⁻

flow rate: 0.7 mL/min

column: ACQUITY UPLC BEH C18

1.7 µm, 2.1 x 50 mm

solvent A: water + 0.1 % HCOOH

solvent B: CH₃CN + 0.1 % HCOOH

gradient: 0 - 5 min, B 20 - 100 %

5 - 7 min, B 100 %

7 - 10 min, B 100 - 20 %

8. 代謝産物の抽出・解析 (MPY 培地)

培養液にアセトン 3 mL を加え、12 時間ほど静置した。その後、菌体を回収し、吹き付け濃縮によって、アセトンを完全に除去した。濃縮した抽出液に、等量の酢酸エチルを加えて分液した後、有機層を回収した。回収した有機層を風乾し、MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 µm, PTFE, 4 mm) を通した後、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

9. armillyl orsellinate の微生物変換

AO-*mld7* 株を MPY 培地 3 mL で2日間培養した (200 rpm, 30℃)。その後、armillyl orsellinate を 50 µg 投与し (5.0 µg/µL の MeOH 溶液を使用)、1日培養した (200 rpm, 30℃)。その後、記載した抽出操作に従って粗抽出物を得て、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

10. Mld7 の過剰発現・可溶化確認・精製

当研究室の尾関が構築したプラスミド (pColdI::*mld7*, pMAL-c4E::*mld7*) をタンパク質

過剰発現用のホストである *E.coli* BL21 (DE3) Gold 株へ導入した。pColdI::mld7 導入形質転換体株を LB 培地 (3 mL, 100 µg/mL Amp) に添加し、14 時間振とう培養(200 rpm, 37°C) することで種培養液を得た。LB 培地 (200 mL, 100 µg/mL Amp) に種培養液 1.5 mL を移し入れ、OD₆₀₀ が 0.6 の値になるまで振とう培養 (3h, 200 rpm, 37°C) した。0°C で 30 分間冷却した後、1M IPTG 100 µl (終濃度 0.1 mM) を加え、振とう培養 (19 h, 200 rpm, 16°C) した。得られた培養液を遠心分離 (4,000g, 10 min, 4°C) して集菌し、20 mL の破砕用 Buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl) に懸濁させて超音波破砕し、遠心分離 (15,000 g, 20 min, 4°C) して上清を可溶性画分とした。

pMAL-c4E::mld7 導入形質転換体を LB 培地 (3 mL, 100 µg/mL Amp) に添加し、14 時間振とう培養(200 rpm, 37°C) することで種培養液を得た。LB 培地 (200 mL, 100 µg/mL Amp) に種培養液 1.5 mL を移し入れ、OD₆₀₀ が 0.6 の値になるまで振とう培養 (3h, 200 rpm, 37°C) した。0°C で 30 分間冷却した後、1M IPTG 100 µl (終濃度 0.1 mM) を加え、振とう培養 (19 h, 200 rpm, 18°C) した。得られた培養液を遠心分離 (4,000g, 10 min, 4°C) して集菌し、20 mL の破砕用 Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 20% glycerol) に懸濁させて超音波破砕し、遠心分離 (15,000 g, 20 min, 4°C) して上清を可溶性画分とした。可溶性画分を、アミロースカラムクロマトグラフィー (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 20% glycerol, 10 mM Maltose で溶出) で精製した。回収した fraction に関しては、限外ろ過の後、Buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 20% glycerol) で 4 倍希釈し、5 回限外ろ過操作を繰り返し行うことで、マルトースを除去した。

11. AO-mld7 からの酵素溶液の調製

AO-mld7 を MPY 30mL x 8 本(200 rpm, 37°C) で 2 日間培養し、菌体と培養液をガラスろ過器によって分離した。ここで得られた菌体の水分を軽く除去し、乳鉢に移した菌体を液体窒素によって凍結した後、乳棒によって粉末状になるまで破砕した。粉末状の菌体を氷上のファルコンチューブに移し、Tris-HCl buffer (pH 7.4) を 30 mL 加えた。この時、液体窒素によって冷却された菌体によって、buffer が凍ったので、薬さじを用いて軽にかき混ぜることで、菌体と buffer を均一に混ぜた。その後、2 時間ほど氷上静置することで、酵素を溶出させた。菌体と酵素溶液を遠心分離(5000 g, 10 min, 4°C) し、上清を回収することで菌体を取り除いた。回収した酵素溶液を 1.5 mL エッペンチューブに移し、再び遠心分離(13000 g, 10 min, 4°C) することで完全に菌体を取り除いた。その後、回収した酵素溶液を限外ろ過濃縮によって 5 mL まで濃縮し、この溶液を Mld7 酵素溶液(CF) とした。



菌体(破砕前)



菌体(破砕後)



酵素抽出後

12. armillyl orsellinate の *in vitro* Mld7 酵素反応

調製した Mld7 酵素溶液 100 μ l に対して、armillyl orsellinate を 40 μ g 投与し(40 μ g/ μ l の MeOH 溶液を使用)、で 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μ m, PTFE, 4 mm)を通した後、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

13. 『cell debris』を用いた armillyl orsellinate の *in vitro* Mld7 酵素反応

13-1) 『麹菌 cell debris の調製方法』

Aspergillus oryzae NSPID1 株を MPY 30mL x 8 本(200 rpm, 37°C)で 2 日間培養し、菌体と培養液をガラスろ過器によって分離した。ここで得られた菌体の水分を軽く除去し、乳鉢に移した菌体を液体窒素によって凍結した後、乳棒によって粉末状になるまで破碎した。粉末状の菌体を氷上のファルコンチューブに移し、Tris-HCl buffer (pH 7.4)を 30 mL 加えた。この時、液体窒素によって冷却された菌体によって、buffer が凍ったので、薬さじを用いて軽くかき混ぜることで、菌体と buffer を均一に混ぜた。その後、2 時間ほど氷上静置した。菌体と溶液を遠心分離(5000 g, 10 min, 4°C)し、上清を取り除いた。このときに得られた沈殿物を『麹菌由来の cell debris』とした。

13-2) 『大腸菌 cell debris の調製方法』

Escherichia coli HST08 のコンピテントセルを LB 液体培地 3 mL で 10 時間培養 (200 rpm, 37°C)し、得られた培養液を 1 mL ずつ LB 培地 200 mL x 2 本に植菌した。その後、36 時間振とう培養 (200 rpm, 18°C)することで、OD₆₀₀ の値が 0.6~1.0 程度の培養液を得た。得られた培養液を遠心分離 (4,000g, 10 min, 4°C)することで集菌し、20 mL の破碎用 Buffer (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl)に懸濁させて超音波破碎した。破碎溶液を遠心分離 (15,000 g, 20 min, 4°C)し、上清を取り除いた。このときに得られた沈殿物を『大腸菌由来の cell debris』とした。

13-3) 『酵母 cell debris の調製方法』

Saccharomyces cerevisiae WAT11 株のコンピテントセルを YEPD 液体培地 3mL で 3 日間培養 (200 rpm, 30°C)し、YEPD 液体培地 100 mL に全量 3 mL を移し、2 日間振とう培養した(200 rpm, 30°C)。得られた培養液を遠心分離 (8,000g, 20 min, 4°C)することで集菌し、上清を取り除いた。ここで得られた菌体を乳鉢に移し、菌体を液体窒素によって凍結した後、乳棒によって粉末状になるまで繰り返し破碎した。このとき、菌体の様子は液体窒素で凍結する前は、水分を含んだペースト状のものであり、凍結後は乳鉢に張り付くように凍ったため、乳棒で軽く打ち付けるように破碎した。破碎後、粉末状になった菌体を氷上のファルコンチューブに移し、Tris-HCl buffer (pH 7.4)を 10 mL 加えた。こ

の時、液体窒素によって冷却された菌体によって、buffer が凍ったので、薬さじを用いて軽くかき混ぜることで、菌体と buffer を均一に混ぜた。その後、2 時間ほど氷上静置した。菌体と溶液を遠心分離 (8000 g, 20 min, 4°C) し、上清を取り除いた。このときに得られた沈殿物を『酵母由来の cell debris』とした。

13-4) 『cell debris/プロトプラストを用いた Mld7 酵素反応』

Mld7 酵素溶液(CF)100 μ l に対して、調製したそれぞれの『cell debris』をスパチュラ一杯分入れ、続いて基質である armillyl orsellinate を 40 μ g 投与し(40 μ g/ μ l の MeOH 溶液を使用)、30°C で 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μ m, PTFE, 4 mm)を通した後、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

14. 麹菌プロトプラストを用いた armillyl orsellinate の *in vitro* Mld7 酵素反応

14-1) 『Mld7 酵素反応用の調製方法』

100 mL の DPY 培地に、*A.oryzae* NSPID1 株の孢子懸濁液(1.0×10^8 cell)を植菌し、30°C, 200 rpm で 1 日間培養した。得られた菌糸をガラスろ過器で集菌し、SP 水で洗浄し水分を除去した後、50 mL のファルコンチューブへ移した。そこにフィルター滅菌 (Sartoriusstedimbioteth, Minisart®, 0.45 μ m)した Yatalase(5 mg/mL)の Sol 0 溶液を加え、30°C, 200 rpm で 90 分インキュベートした。得られた懸濁液をミラクロースでろ過し、ろ液を回収した。遠心分離(スウィングロータ, 800g, 5 min, 4°C)し上清を除き、得られたプロトプラストの沈殿物を、0.8 M NaCl 水溶液 10 mL で優しく懸濁させた。懸濁液 10 μ L を 100 倍希釈し、血球計算板と顕微鏡を用いてプロトプラスト数を計算した。残りの懸濁液を遠心分離(スウィングロータ, 800 g, 5 min, 4°C)して上清を捨て、沈殿を 2.0×10^8 cell/mL になるよう solution 2 とその 1/4 当量の solution 3 を加えた。このときに得られた溶液を『プロトプラスト溶液』とした。

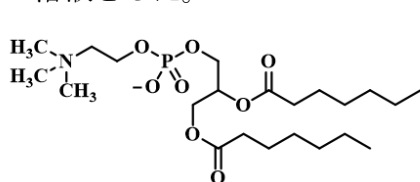
14-2) 『麹菌プロトプラストを用いた Mld7 酵素反応』

Mld7 酵素溶液(CF)50 μ L に対して、調製したプロトプラストを 50 μ L 入れ、続いて基質である armillyl orsellinate を 40 μ g 投与し(40 μ g/ μ l の MeOH 溶液を使用)、30°C で 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μ m, PTFE, 4 mm)を通した後、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

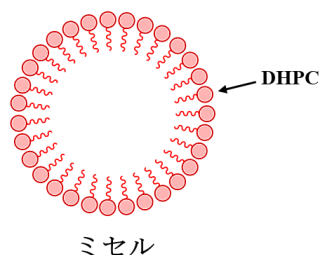
15. ミセルを用いた armillyl orsellinate の *in vitro* Mld7 酵素反応

15-1) 『ミセルの調製方法』

細胞膜を構成する成分としてのリン脂質に着目した際に、リン脂質に類似した性質を持つ 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC)を用いて実験を行った。DHPC は界面活性剤として知られており、15 mM 以上の濃度で溶液中に溶かすと、ミセルを形成することが知られている。今回の実験では、反応溶液の終濃度が 20 mM となるように溶液を調製した。DHPC をイオン交換水に溶解させ、40 mM DHPC 水溶液を作製し、これをミセル溶液とした。



1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC)



15-2) 『ミセルを用いた Mld7 酵素反応』

Mld7 酵素溶液 50 μ L に対して、ミセル溶液 50 μ L を加え、そこに armillyl orsellinate を 40 μ g 投与し(40 μ g/ μ L の MeOH 溶液を使用)、30°C で 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μ m, PTFE, 4 mm)を通した後、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

16. L- α -グリセロホスホリルコリンを用いた armillyl orsellinate の *in vitro* Mld7 酵素反応

ミセル溶液の調製と同様に、L- α -グリセロホスホリルコリンに関しても 40 mM の溶液を調製した。また、酵素反応に関しては、Mld7 酵素溶液 50 μ L に対して、L- α -グリセロホスホリルコリン溶液 50 μ L を加え、そこに armillyl orsellinate を 40 μ g 投与し(40 μ g/ μ L の MeOH 溶液を使用)、30°C で 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μ m, PTFE, 4 mm)を通した後、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

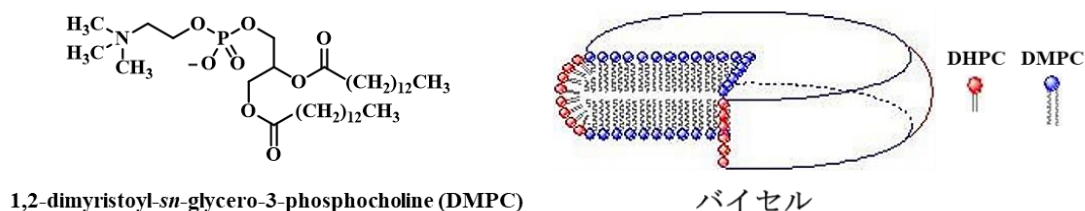
17. バイセルを用いた armillyl orsellinate の *in vitro* Mld7 酵素反応

17-1) 『バイセルの調製方法』

リン脂質二重膜の影響を調べるために、リン脂質二重膜構造を模した「バイセル」を作製した。バイセルとは、アルキル鎖の長いリン脂質と、短いリン脂質から形成される

ディスク上の脂質会合体であり、長鎖のリン脂質が形成する平面部分が二重膜構造を持つことから、最小の脂質二重膜構造モデルとしてよく用いられる。長鎖は 1,2-dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DMPC)、短鎖は 1,2-diheptanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DHPC) から構成され、この二種のリン脂質を溶液中で混合することで、バイセルが形成される。

バイセルは、以下のように作製した。初めに 100 μL のイオン交換水に 16 mM の濃度で DHPC を溶かし、2 分間ボルテックスし、DHPC 溶液とした。続いて、200 μL のイオン交換水に 8 mM となるように DMPC を溶かし、これを DHPC 溶液と混合し、5 分間ボルテックスした。この段階で操作をやめた場合、サイズが不均一なバイセルが得られる。その後、混合溶液を液体窒素による凍結と 40°C 下での溶解を 5 回繰り返し、最後に超音波処理すると、サイズが均一なバイセルが得られる。



17-2) 『バイセルを用いた Mld7 酵素反応』

Mld7 酵素溶液 50 μL に対して、バイセル溶液 50 μL を加え、そこに armillyl orsellinate を 40 μg 投与し(40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の MeOH 溶液を使用)、30°C で 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μm , PTFE, 4 mm) を通した後、UPLC を使い method A の条件で分析した。

18. 重水素を使った酵素反応

Mld7 酵素溶液 50 μL に対して、重水 (99.8 %D) 50 μL を加え、そこに armillyl orsellinate を 40 μg 投与し(40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の MeOH 溶液を使用)、30°C で 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μm , PTFE, 4 mm) を通した後、UPLC を使い method A の条件で分析した。

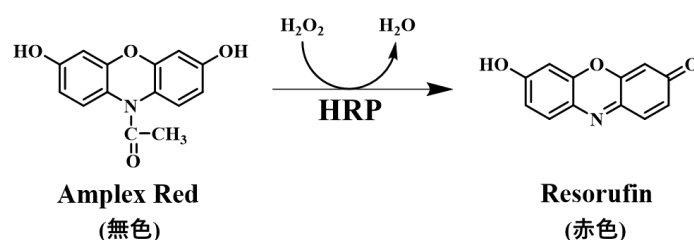
19. 重酸素水による ^{18}O ラベル化実験

Mld7 酵素溶液 50 μL に対して、Water- ^{18}O (97 % ^{18}O) 50 μL を加え、そこに armillyl

orsellinate を 40 μg 投与し(40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の MeOH 溶液を使用)、30°Cで 12 時間反応した。反応後、等量の酢酸エチルを加えて、ボルテックスにより混合した。有機層を回収し、風乾することで crude サンプルを得た。得られたサンプルを MeOH 1 mL に溶解させ、フィルター (Millex-FG, Syringe Driven Filter Unit, 0.2 μm , PTFE, 4 mm)を通した後、UPLC を使い **method A** の条件で分析した。

20. H₂O₂ 発生確認実験

FADH₂ が分解される際に発生する H₂O₂ を検出するために、H₂O₂ 検出 kit である Amplex™ Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay kit を用いて Mld7 酵素反応における H₂O₂ の発生を観察した。この kit は、Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)を用いて、過酸化水素もしくはペルオキシダーゼ活性を検出する高感度の 1 ステップアッセイになっている。一般的に、この Amplex® Red 試薬は、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)との組み合わせで用いられ、細胞などの生体試料や、酵素反応で放出される H₂O₂ を検出するために利用される。Amplex® Red 試薬は、ペルオキシダーゼの存在下において H₂O₂ と 1:1 の当量で反応し、赤色蛍光色を示す酸化生成物である resorufin を生成することが知られている。この反応を利用すると、100 μL 溶液中のわずか 10 pmol の H₂O₂ を検出することが可能となっている。



初めに、使用する試薬を調製した。使用する直前に、Amplex® Red 試薬 154 μg を 60 μL の DMSO に溶解し、Amplex® Red 試薬のストック溶液を調製した。また、5×Reaction buffer (28 mL of 0.25 M sodium phosphate, pH 7.4)の内、4 mL を 16 mL のイオン交換水と混合し、20 mL の 1×Reaction buffer 溶液を調製した。最後に、Horseradish Peroxidase (HRP) に関して、10 U のものを 1.0 mL の 1×Reaction buffer 溶液に溶かした (1 unit (U)は、pH6.0、20°Cの条件下において、20 秒の反応時間で酵素によって pyrogallol から purpurogallin が 1 mg 生成するときの酵素量と定義される)。続いて、調整したそれぞれの試薬を混合することで、H₂O₂ 検出用の酵素反応溶液を作製した。10 mM Amplex® Red 試薬ストック液 50 μL 、10 U/mL HRP ストック液 100 μL 、1X Reaction Buffer 4.85 mL を混合して、Amp 反応溶液とした。

H₂O₂ の発生は、以下のような条件で観測した。Mld7 酵素溶液 50 μL と Amp 反応溶液 50 μL を混合した後、基質である armillyl orsellinate を 40 μg 投与し(40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の MeOH 溶液を使用)、30°Cで 8 時間反応した。この時、基質を投与したものと、投与しないも

の2つのサンプルを作製し、溶液の色の変化を観察した。基質を投与したものでは、反応溶液が赤色になり、一方で、基質を投与しなかったものでは、無色もしくはかなり薄い桃色を示した。また、それぞれの吸光度を測定すると、**resorufin** に特徴的な吸収波長が観察され、基質を投与したものでは、その吸光度が大きく上昇していた。

3-7. References

- 1) Cadelis, M. M.; Copp, B. R.; Wiles, S. A review of fungal protoilludane sesquiterpenoid natural products. *Antibiot* **2020**, 9(12), 928.
- 2) Suzuki, T.; Oka, M.; Maeda, K.; Furusawa, K.; Uesaka, H.; Kataoka, T. Synthesis and Muscarinic Activity of Novel Aniline Derivatives with a 1-Azabicyclo[3.3.0]octane Moiety. *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, 47(1), 28-36.
- 3) Guialis, A.; Beatty, B. G.; Ingles, C. J. Regulation of RNA polymerase II activity in α -amanitin-resistant CHO hybrid cells. *Cell*. **1977**, 10, 53-60.
- 4) Boohnert, M.; Nutzmam, H.; Schroeckh, V.; Horn, F.; Dahse, H.; Brakhage, A.; Hoffmeister, D. Cytotoxic and antifungal activities of melleolide antibiotics follow dissimilar structure–activity relationships. *Phytochemistry*, **2014**, 105, 101-108.
- 5) Carmen, A.; J. Carlos, M. Chapter 6 - Anticancer Drugs That Interact with the DNA Minor Groove. *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. **2015**, 243-271.
- 6) Matthew Bryant, J.; Bouchard, M.; Haque, A. Anticancer Activity of Ganoderic Acid DM: Current Status and Future Perspective. *J Clin Cell Immunol*. **2017**, 535.
- 7) Engels, B.; Heinig, U.; McElroy, C.; Meusinger, R.; Grothe, T.; Stadler, M.; Jennewein, S. Isolation of a gene cluster from *Armillaria gallica* for the synthesis of armillyl orsellinate-type sesquiterpenoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 105(1), 211-224.
- 8) Schmidt-Dannet, C. Biosynthesis of terpenoid natural products in fungi. *Biotechnol.* **2015**, 148, 19-61.
- 9) Fukuyama, Y.; Hirayama, T.; Kitano, S.; Sato, K.; Uokawa, T.; Shirakawa, N. Efficient transformation of monokaryons from *Pleurotus salmoneostramineus* using the GPD promoter for hygromycin B resistance. *Mushroom Science and Biotechnology*. **2020**, 28, 171-174.

- 10) J F, de Jong.; R A, Ohm.; C, Bekker.; H A.B. Wosten.; L G, Lugones. Inactivation of *ku80* in the mushroom-forming fungus *Schizophyllum commune* increases the relative incidence of homologous recombination. *Microbiol. Lett.* **2010**, 310, 91-95.
- 11) K, Liu.; B, Sun.; H, You.; J, Tu.; X, Yu.; P, Zhao.; J, Xu. Dual sgRNA-directed gene deletion in basidiomycete *Ganoderma lucidum* using the CRISPR/Cas9 system. *Microb. Biotechnol.* **2020**, 13, 386-396.
- 12) A, Minami.; C, Liu.; H, Oikawa. Total Biosynthesis of Fungal Indole Diterpenes Using Cell Factories. *Heterocycles.* **2016**, 92, 397-421.
- 13) W, Ahmed.; P, Gyawali.; S, Feng.; S L, McLellan. Host Specificity and Sensitivity of Established and Novel Sewage-Associated Marker Genes in Human and Nonhuman Fecal Samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2019**, 85, 409-19.
- 14) C, Liu.; A, Minami.; T, Ozaki.; J, Wu.; H, Kawagishi.; J, Maruyama.; H, Oikawa. Efficient Reconstitution of Basidiomycota Diterpene Erinacine Gene Cluster in Ascomycota Host *Aspergillus oryzae* Based on Genomic DNA Sequences. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 15519-15523.
- 15) Dörfer, M.; Gressler, M.; Hoffmeister, D. Diversity and bioactivity of *Armillaria* sesquiterpene aryl ester natural products. *Mycol. Prog.* **2019**, 18, 1027-1037.
- 16) B, Engels.; U, Heinig.; T, Grothe.; M, Stadler.; S, Jennewein. Cloning and Characterization of an *Armillaria gallica* cDNA Encoding Protoilludene Synthase, Which Catalyzes the First Committed Step in the Synthesis of Antimicrobial Melleolides. *J. Biol. Chem.* **2011**, 286, 6871-6878.
- 17) J, Wick.; D, Heine.; G, Lackner.; M, Misiek.; J, Tauber.; H, Jagusch.; C, Hertweck.; D, Hoffmeister. A Fivefold Parallelized Biosynthetic Process Secures Chlorination of *Armillaria mellea* (Honey Mushroom) Toxins. *Appl. Environment. Microbiol.* **2016**, 82, 1196-1204.
- 18) B, Engels.; U, Heinig.; C, McElroy.; R, Meusinger.; T, Grothe.; M, Stadler.; S, Jennewein. Isolation of a gene cluster from *Armillaria gallica* for the synthesis of armillyl orsellinate-type sesquiterpenoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 105, 211-224.
- 19) B, Engels.; U, Heinig.; C, McElroy.; R, Meusinger.; T, Grothe.; M, Stadler.; S, Jennewein. Isolation of a gene cluster from *Armillaria gallica* for the synthesis of armillyl orsellinate-type

sesquiterpenoids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2021**, 105, 211-224.

20) G, Lackner.; M, Bohnert.; J, Wick.; D, Hoffmeister. Assembly of Melleolide Antibiotics Involves a Polyketide Synthase with Cross-Coupling Activity. *Chem. Biol.* **2013**, 20, 1101-1106.

21)J, Wick.; D, Heine.; G, Lackner.; M, Misiek.; J, Tauber.; H, Jagusch.; C, Hertweck.; D, Hoffmeister. A Fivefold Parallelized Biosynthetic Process Secures Chlorination of *Armillaria mellea* (Honey Mushroom) Toxins. *Appl. Environment. Microbiol.* **2016**, 82, 1196-1204.

22) Dervilla, M. X.; Donnellyrhona, M.; Hutchinson, D.; Michiko, Y. SESQUITERPENE ARYL ESTERS FROM ARMILLARIA MELLEA. *Phytochemistry.* **1990**, 29, 2569-2572.

23) J, Ren-Wang.; L, Kit-Man.; H, Po-Ming.; M, Thomas C. W.; W, Kam-Sang.; F, Kwok-Pui. Chemistry and Biological Activities of Caffeic Acid Derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Acta. Pharma. Sin.* **1991**, 26, 117.

24) W P, Dijkman.; G, Gonzalo.; A, Mattevi.; M W, Fraaije. Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 5177-5188.

25) W P, Dijkman.; G, Gonzalo.; A, Mattevi.; M W, Fraaije. Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 5177-5188.

26) D, Donnelly.; S, Sanada.; J, O'Reilly.; J, Polonky.; T, Prangé.; C, Pascard. Isolation and structure (X-ray analysis) of the orsellinate of armillol, a new antibacterial metabolite from *Armillaria mellea*. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1982**, 135-137.

27)C, Liu.; K, Tagami.; A, Minami.; T, Matsumoto.; J, Frisvad.; H, Suzuki.; J, Ishikawa.; K, Gomi.; H, Oikawa. Reconstitution of Biosynthetic Machinery for the Synthesis of the Highly Elaborated Indole Diterpene Penitrem. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 5748-5752.

28) K, Durchschein.; M, Hall.; K, Faber. Unusual reactions mediated by FMN-dependent ene- and nitro-reductases. *Green. Chem.* **2013**, 15, 1764-1772.

29) H, Wu.; K, Su.; X, Guan.; M, Elizabeth Sublette.; R E, Stark. Assessing the size, stability, and utility of isotropically tumbling bicelle systems for structural biology. *Biochim. Biophys. Acta.* **2010**, 1798, 3, 482-488.

30) Jawallapersand, P.; S, Mashele, S.; Kovačič, L.; Stojan, J.; Komel, R.; B, Pakala, S.; Kraševac, N.; Syed, K. Cytochrome P450 Monooxygenase CYP53 Family in Fungi: Comparative Structural and Evolutionary Analysis and Its Role as a Common Alternative Anti-Fungal Drug Target. *PLOS ONE*. **2014**, 9.

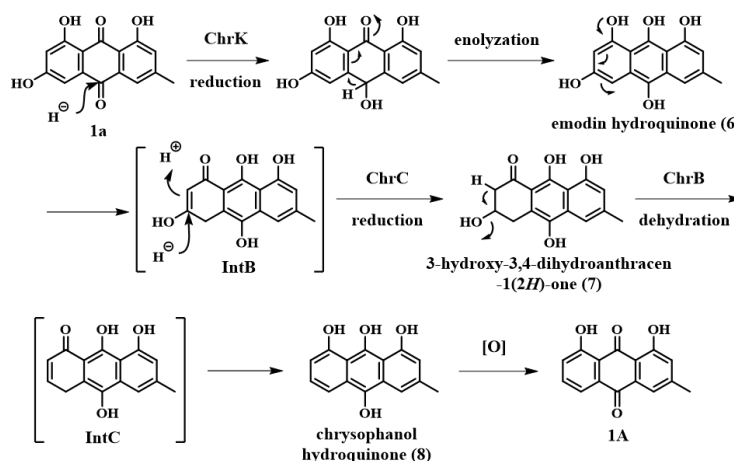
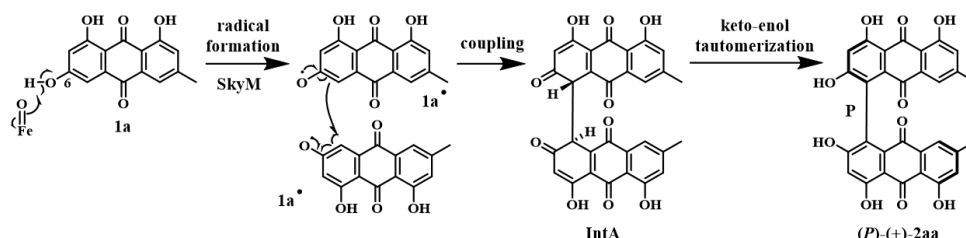
第4章 総括

微生物や植物が生産する天然物は、低分子医薬において中心的な役割をはたしている他、「タンパク質間相互作用の制御」「標的タンパク質の分解誘導」などの新しい概念に基づく創薬研究においても重要性が指摘されている天然由来の化合物である。その特徴は、化学構造の多様性にある。化学合成では同等のケミカルスペースを構築することが難しいため、天然物は医薬品などの重要なリソースとして再注目され、「つくる」「さがす」「(機能を) さぐる」に着目した研究が進められてきた。近年では、天然物の主要な供給源である放線菌や糸状菌のゲノム解析も進められ、天然物をつくるための設計図である生合成遺伝子群の「数」が既知天然物の「数」を上回ることが明らかにされつつある。これは、自然界には数多くの未踏分子が発見されずに残されていることを示唆している。こうした背景から、合成生物学的手法を利用した天然物の酵素合成(=異種宿主発現)が注目され、天然物の生合成機構を理解するための基礎的な研究も活発に進められている。

天然物の生合成は、天然物の種類に関わらず、基本炭素骨格の構築と修飾反応に大別することができる。後者に関わる修飾酵素の中には、ダイナミックな骨格変換や多段階反応、sp³炭素の活性化など、化学合成においても実現が難しい反応を触媒する酵素が知られている。こうした修飾酵素は、天然物の構造多様性を構築する上での鍵酵素であることから、古くから研究が進められてきた。その結果、酸化酵素であるチトクローム P450、フラボプロテインなどの基本的な触媒機構が解明されてきた。天然物の生合成においては、基本的な反応から逸脱した特徴的な反応を触媒する酵素が発見され、天然物の構造多様性構築機構の解明に大きく貢献している。しかしながら、こうした修飾酵素の機能解析を行うためには、複雑な構造をもつ基質の調製など課題も多く、古くから知られている代表的な天然物においても、その生合成に関与する修飾酵素の解析は十分に進められているとは言えない。そこで、本研究では、子囊菌が生産するアントラキノン系天然物(関連化合物 700 種を超える代表的な天然物群)と担子菌が生産するメレオライド(180 種を超えるプロトイルーダン型セスキテルペンを代表する天然物)に着目して、酸化酵素を中心とした修飾酵素の機能解析に着手した。

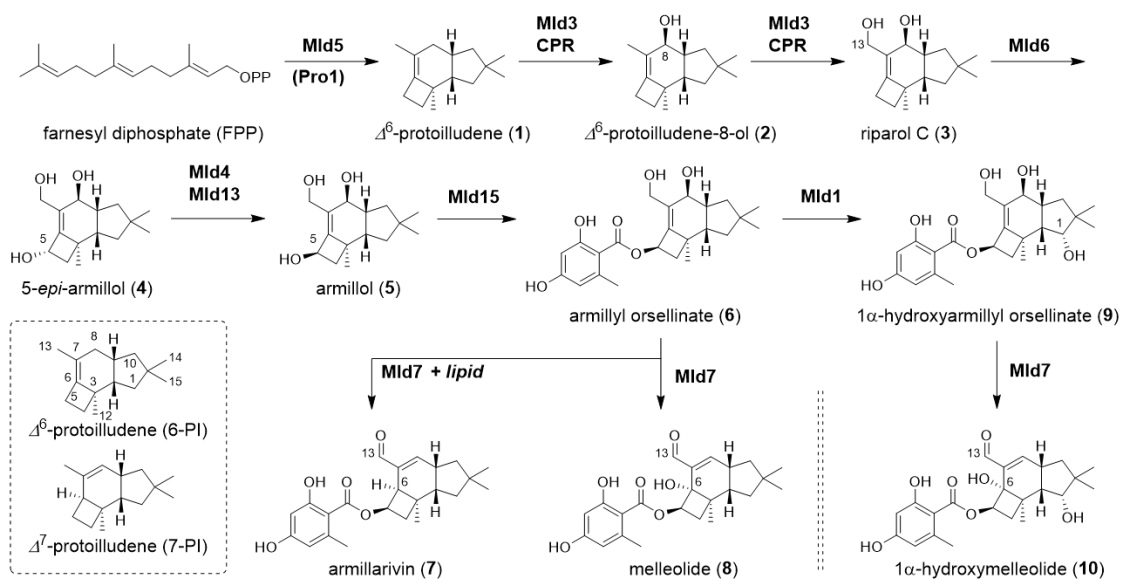
2 章では、子囊菌 *T. islandicus* Sopp が生産するアントラキノン系天然物に着目して、生合成遺伝子クラスターの探索、麹菌異種宿主発現系、微生物変換実験、組み換え酵素を用いた *in vitro* 解析による生合成酵素の機能解析を行った。その結果、共通中間体である emodin (**1a**)を基質とした酸化的カップリング反応により対応する 2 量体を与えるチトクローム P450 を同定し、本酵素が C6 位水酸基を有する単量体を基質としたエナンチオ選択的な反応を触媒することを明らかにした(Scheme 4-1)。また、**1a** の脱酸素化

を担う 3 種の修飾酵素を同定し、脱酸素化-酸化による構造多様性創出機構を提唱するに至った。これらの生合成酵素遺伝子が染色体上の 3 箇所にわかれて存在していたことは、進化の過程における天然物の構造変化 (= 化学進化) を考える上でも興味深い知見になったと考えている(Scheme 4-1)。



Scheme 4-1. 1a のカップリング反応および修飾反応まとめ

3 章では、担子菌 *Armillaria mellea* が生産する melleolide に注目し、異種宿主発現による生合成中間体の取得と取得した中間体を用いた微生物変換実験や *in vitro* 反応から、生合成後期にあたる armillyl orsellinate から 1 α -hydroxymelleolide への変換に関与する P450 とフラボプロテインの同定と機能解析に成功した(Scheme 4-2)。後者については、膜の有無により反応機構が厳密に制御されることで異なる構造をもつ生成物を与えることを実験的に証明し、70 種類にも及ぶ melleolide 類の構造多様性構築における鍵酵素であることを示した(Scheme 4-2)。また、本酵素の発見は、GMC oxidase ファミリーが触媒する反応機能を拡張することにもつながった。さらに、最終産物である 1 α -hydroxymelleolide の異種宿主生産に成功したことは、担子菌由来天然物の異種宿主生産における麹菌異種宿主発現系の利用可能性を示す結果となった。以上の結果から、合成化学的手法による melleolide 類の生産だけでなく、担子菌由来天然物の生合成経路の解明へとつながる知見を得ることができたと考えている。



Scheme 4-2. Biosynthetic pathway of 7 & 8

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(現所属; Wuyi University)、南篤志 准教授、尾崎太郎 助教(現所属; 東北大学薬学部)、劉成偉 助教(現所属; Northeast Forestry University)に心より感謝いたします。