

博士論文

論文題目 複雑骨格天然物のモジュール型生合成マシナリーの
機能解析と再設計

氏名 張 驪 騁

目次

第1章 序論	2
第1節 天然物の合成生物学	2
第2節 モジュール型酵素による複雑骨格天然物の生合成	4
第3節 本研究の目的	8
第2章 Antimycin A の生合成研究	10
第1節 緒論	10
第2節 クロトニル CoA 炭酸化酵素 AntE の構造解析	15
第3節 AntE の立体構造基盤に基づく酵素機能改変	21
第4節 AntE 変異体酵素の酵素反応速度論および立体構造解析	27
第5節 AntE を用いた新規 antimycin の生産	35
第6節 小括	38
第3章 アミノポリオールを産生する I 型 PKS の機能解析	39
第1節 緒論	39
第2節 Tetrafibricin 生合成遺伝子の同定	42
第3節 モジュール型 I 型 PKS の遺伝子配列解析	44
第4節 I 型 PKS リデザインのための理論基盤	56
第5節 アミノポリオール類の絶対立体配置の決定	59
第6節 硫酸転位酵素 MedB の機能解析	68
第7節 小括	70
総括	71
実験項	73
第2章実験項	73
第3章実験項	101
参考文献	117
謝辞	122

第1章 序論

第1節 天然物の合成生物学

天然物は医薬品供給源として薬学の発展に多大な貢献を果たしてきた。Penicillin (Alexander Fleming, 1928)や streptomycin (Selman A. Waksman, 1943)、artemisinin (Youyou Tu, 1972)、ivermectin (Satoshi Ōmura, 1978)の発見に代表されるように、天然物から単離された生物活性物質は、古来より人類の健康の脅威であった感染症の治療を劇的に進歩させた。これらの天然由来医薬品は人々の平均寿命を向上させ、今日の医療において欠かせないものとなっている。しかしながら 1980 年代以降、天然物の探索からは既知化合物の再単離が頻繁に報告され、新規抗生物質が思うように得られない状況が続いた。その代わりに、コンビナトリアル合成やハイスループットスクリーニングの盛り上がりと共に創薬資源の探索は天然物から合成化合物へと移っていった。ところが 21 世紀に入り、天然物は創薬資源として今再び脚光を浴びている^[1]。合成化合物ライブラリのスクリーニングも効率的な新規医薬品の発見に繋がらず、天然物ライブラリの方が生物活性を示す確率が高いことが明らかとなり、天然物の持つ分子空間が合成ライブラリより大きく、物性も優れていることが多いことが明らかとなったことが、天然物創薬を後押ししている^[2]。実際に、医薬品として上市する化合物のうち天然物由来であるものの割合は 21 世紀以降も半数を超えており、天然物の薬学における重要性を示している^[3]。

自然界での天然化合物のうち、生命活動に必須でないものは二次代謝産物と呼ばれ、二次代謝産物からは数多くの医薬資源が発見されてきた。このような二次代謝産物を含む天然物ライブラリが生物活性を示す確率が高いことは、その生き立ちを考えれば自然なことと思える。例えば微生物は生存競争に勝つために周囲の競合する菌類を無効化する化合物を生産するように進化したと考えられており、こうした進化や淘汰を経て現在まで残った二次代謝産物が生物に何らかの活性を示す可能性が高いことは必然とも言えよう。天然物が創薬資源探索に適しているのであれば、天然物に似た構造の新規化合物ライブラリを作成することで、効率の良い新規医薬品の開発ができることが期待される。しかし、天然物の分子構造はしばしば複雑であり、1)多数の立体中心を伴う sp^3 炭素が多い、2)大環状骨格や多環性骨格を有する、3)酸素官能基など様々な官能基を数多く含む、などの特徴が有機合成による天然物の供給及びライブラリの作成を阻んでいる。複雑骨格天然物を如何にして供給するかは、様々な有機反応が開発応用された今日でも天然物創薬における大きな課題となっている。

合成生物学は近年急速に発展している分野の一つであり、生物をシステムと見做し人為的

に要素を組み合わせシステムを再構築する、もしくは新たな機能を作り上げることを目標とした分野である⁴⁾。生物の代謝経路を改変し新たな機能を付与する研究が盛んに行われ、バイオエタノールやその他工業用途の高い化合物を高収量で発酵生産可能な微生物などを作り出し、エネルギー資源政策など社会にも大きな影響を与えている。天然物創薬においても合成生物学の影響は既に無視できないものとなっており、例えば抗マラリア薬のアルテミシニンは植物由来化合物であるが、その生合成遺伝子を導入した酵母を用いて異種発現することで発酵生産に成功し⁵⁾、これまで植物組織からの抽出と半合成に頼っていたアルテミシニンの供給に大きな変化をもたらした。天然物は自然界が合成方法を知っており、その生合成遺伝子や生合成酵素への理解が深まった今、自然の合成能力に学びその合成方法を人間が利用できる段階に差し掛かりつつある。ゲノム情報学の飛躍的な発展により生物のゲノムを手軽に解析できるようになったことも、合成生物学の発展を強力に後押ししている。特に、生合成経路とその遺伝子が明らかとなった天然物は合成生物学的手法を用いて供給方法を確立することに適しており、有機合成と比べて環境負荷や経済性、安全性で優れた手法となることが期待される。生物を合成工場と見做し任意の反応を触媒する酵素を導入し目的の代謝物を得る技術は、既存の成熟した有機合成技術とは異なる特徴を有し、補完しあうことで天然物創薬を一層発展させるものと考えられる。

合成生物学の利点には、最終産物が培養などワンポットで直接得られる、水系常温常圧で反応が進行する、酵素の立体選択性を利用でき立体制御が容易である、などが挙げられ、複雑化合物が供給可能となる以外にも多くの強みを有している。一方で、合成生物学は未だ発展途上の分野であり、生合成経路が解明された化合物なら何でも手軽に再構築し高収量の生産菌を創出できるまでには至っていない。また、最も大きな課題は、望み通りの化合物を任意に作り上げることが難しいことであり、基質特異性が寛容かつ高効率で反応を触媒できる酵素の開発や、触媒可能な反応の種類を増やし生物システムを用いて達成可能な代謝反応経路の数を増やすことが求められている。合成生物学の方法論を拡張することで、複雑天然物の供給や天然物の分子構造を持つライブラリの作成など、今までにない創薬科学が実現されることが期待される。

第2節 モジュール型酵素による複雑骨格天然物の生合成

天然には数十万もの化合物が存在し、炭素、水素、酸素原子からなる芳香環やケトン、アルコールなどから構成されるポリケタイド類、様々な非天然型を含むアミノ酸からなるポリペプチド類、特徴的な C₅ ユニットであるイソプレレンからなるテルペン類、主にトリプトファン由来の窒素原子を含むアルカロイド類など様々な化合物が存在する。これらの化合物群の生合成にはそれぞれに異なる生合成戦略が採られており、中でも複数のドメインからなる巨大複合体酵素により生合成されるポリケタイド類とポリペプチド類は多様な生理活性を示す数多くの抗生物質を含み、これらの生合成研究とエンジニアリングは創薬化学において大変意義深い。

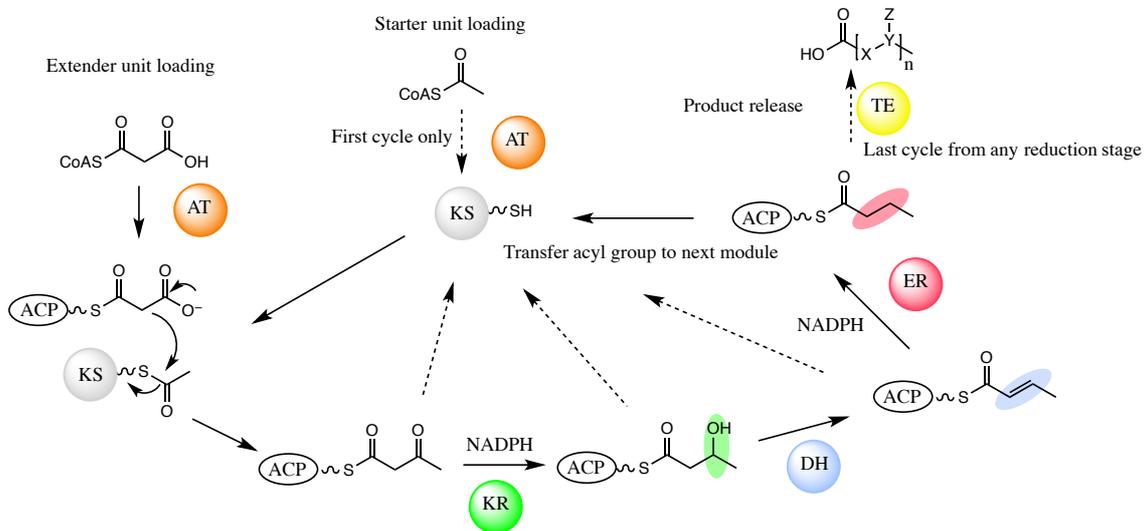


図 1-1 PKS の反応機構

ポリケタイド合成酵素(PolyKetide Synthase, PKS)は原核生物から高等植物まで広く存在する二次代謝産物合成酵素であり、ドメイン構造の違いにより幾つかのタイプに分けられる。共通する反応原理として、開始基質が PKS にロードされた後、主にマロニル CoA とメチルマロニル CoA からなる伸長基質による Claisen 型伸長反応とケトン基の還元や脱水反応の組み合わせ、そして環化などの後修飾を伴う生成物の解離により生合成される^[6]。PKS は Type I、Type II、Type III の 3 タイプに分かれる。Type I PKS は複数のドメインを含む巨大酵素であり、中でも分子量 300kDa を超えるモジュール型 PKS は、モジュールやドメインの繰り返し利用が無く、その並びが生成化合物の構造を正確に反映するため、エリスロマイシンの生合成を例にこれまで様々な生合成メカニズムの研究がなされ、機能改変による新規類縁体生産などが達成された^[7]。Type II PKS は各ドメインが独立したタンパク質として存在し繰り返し伸長反応を触媒し、Type III PKS は KS (ketosynthase)ドメインのみからなり、CoA 基質を用いて縮合反応を触媒することが知られているが、本論では Type I PKS に焦点をあてる。Type I PKS に必須なドメインは KS (ketosynthase)、

AT(acyltransferase)、ACP(acyl carrier protein)の各ドメインであり、ATが伸長基質をACPにロードし、KSは自身にロードされた伸長中間体とACP上の伸長基質と脱炭酸を伴うClaisen縮合反応を触媒し、ACP上に伸長された新たな中間体が残る。その後、KR(ketoreductase)がケトン基を水酸基に立体特異的に還元し、DH(dehydratase)が脱水を触媒、二重結合を形成し、ER(enoylreductase)が二重結合の還元を行うことで飽和脂肪酸が生合成される(図1-1)。この修飾ドメインの組み合わせにより様々な還元状態のポリケチド鎖が生合成されることで構造多様性が生じる。伸長鎖の α,β 位の修飾反応以外にも、ポリケチドの生合成には開始基質の選択^[8]、伸長基質の選択^[9]、そして後修飾反応^[10]の生合成により多様性を生み出すことができる。例えば、脂肪酸生合成ではアセチル CoA が専ら開始基質として使われるが、ポリケチド化合物ではプロピオニル CoA など様々な基質が開始基質として用いられる^[11]。PKSの伸長反応ではマロニル CoA 及びメチルマロニル CoA が主に用いられるが、近年クロトニル CoA 炭酸化酵素により供給されるアルキルマロニル CoA が伸長基質となり、ポリケチド骨格の多様化に寄与していることが明らかとなった^[9](図1-2)。後修飾ではPKSからの脱離においてTEドメインが触媒する環化や還元が起こることがあり、またPKS脱離後はアシル化反応、プレニル化反応、配糖化反応など、多種多様な後修飾を受けることが知られている。

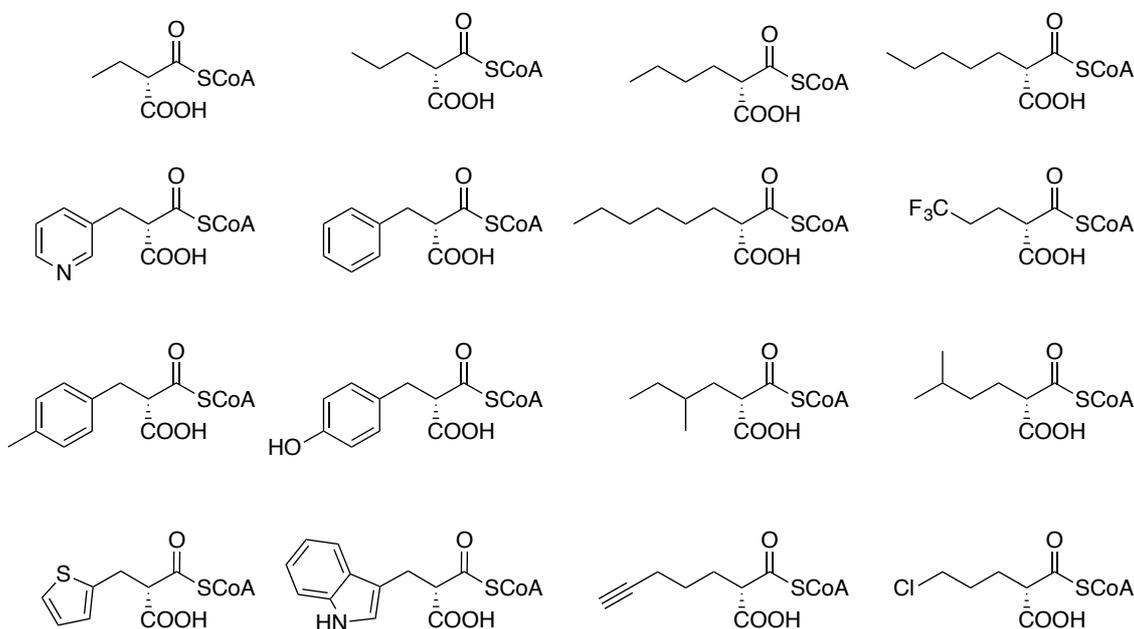


図 1-2 クロトニル CoA 還元酵素により生合成される多様なアルキルマロニル CoA

非リボソームペプチド合成酵素 (Nonribosomal peptide synthetases, NRPS)は専ら細菌や真菌など微生物に分布する、ペプチド化合物を生合成するモジュール型酵素である^[12]。ポリケチド合成酵素と同様に、その触媒反応は一つの酵素に含まれる複数のドメインが個別の反応を担

い、協調して働くことで生成物を合成する。NRPS に必要なドメインは、C ドメイン(condensation domain)、A ドメイン(adenylation domain)、PCP ドメイン(peptide carrier protein domain)が含まれ、A ドメインが基質となるアミノ酸を ATP を用いて AMP 化し、PCP ドメインにロードする。C ドメインは上流の PCP ドメインから基質を受けとり、A ドメインにより PCP にロードされたアミノ酸との縮合反応を触媒する。縮合を受け伸長された基質は他の修飾ドメインがある場合には構造修飾を受けて下流へと受け渡され、PKS と同様に TE ドメインにより加水分解または環化反応により酵素から切り離される。修飾ドメインにはアミノ酸の立体を反転させる epimerisation domain、チアゾリンやオキサゾリン環を形成する cyclization domain、酸化反応を触媒する oxydation domain、*N*-メチル化を担う *N*-methylation domain などが存在する^[13]。また、NRPS は非天然アミノ酸をしばしば基質として用いることに加え、 α -ヒドロキシ酸を基質に用いてエステル結合により生成物を伸長することもできるなど、構造多様性に富むペプチド化合物を生成することが特徴的である。

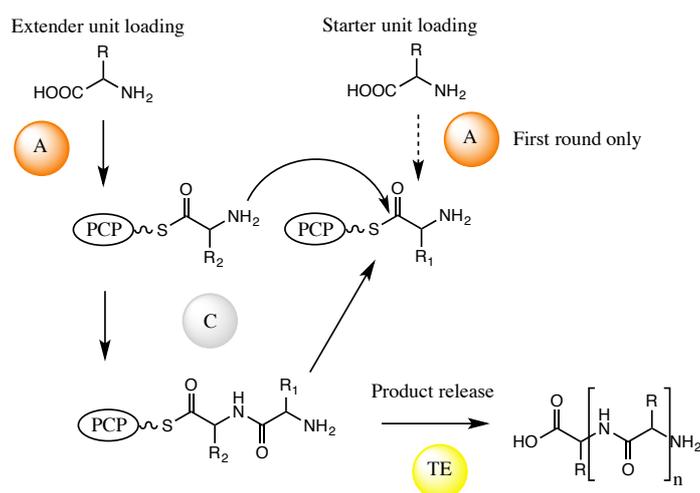


図 1-3 NRPS の反応機構

NRPS と Type I PKS はモジュール型酵素を用いる点で共通しており、また各モジュールは 1 度反応を触媒すると基質を下流に受け渡すため、「組み立てライン」様の反応様式をしていると考えることができる^[6]。これらの酵素が組み合わされた、NRPS-PKS 複合型の生合成経路も知られており、アミノ酸と酢酸マロン酸ユニットの両方を基質に用いた二次代謝産物も多く知られている。また、PKS や NRPS は複数のモジュールを有するため、遺伝子もサイズが大きく、ゲノム上でこれらの位置を同定することが容易である。ゲノム情報の解読が容易になった今日においてこの特徴は重要であり、配列情報から素早く有用化合物の生合成遺伝子を同定することを可能にしている。また、「組み立てライン」様の反応形式をすることは、ラインの再設計により(例えばモジュール a と b を並び替えた遺伝子をデザインすれば化合物構成要素の AB が入れ替わった新規化合物を理論上は生成する) 欲しい構造の非天然化合物を人為的に手に入れられ

ることが期待される。しかし、自由自在なモジュール型酵素の再設計は未だに困難であり、複数のドメインがどのように協調して働くのかや、自然界での遺伝子進化のメカニズムの解明などが必要である^[14]。これらのモジュール酵素はリボソームなどと同様に巨大分子マシンとしての反応機構も興味深く、酵素全体の X 線構造解析やクライオ電子顕微鏡解析などが盛んに行なわれている^[15]。

第3節 本研究の目的

本研究ではモジュール型 I 型 PKS の合成生物学を進展させ、自由自在な分子デザインを可能とする方法論を確立することを目指した。具体的な目的として、1) PKS に対し非天然型の伸長基質を供給可能な酵素の開発と、2) PKS 自身の組み替え再設計の理論的基盤を確立することを目的とした。ポリケタイド化合物は、マロン酸単位が伸長単位となり縮合を繰り返すことで生合成されるが、多数の立体中心を伴うポリケタイド化合物を合成できる汎用性ある有機化学的手法は無く、多くのポリケタイド化合物は天然からの抽出や半合成により供給される。これは同じモジュール型酵素による繰り返しの縮合で生じるペプチド化合物とは対照的であり、ペプチド化合物では固相合成法が確立され有機合成的な供給が容易であり、加えてリボソームの翻訳系を用いて目的ペプチドを得ることも実用的になりつつある。ポリケタイド化合物はマクロライド類、ポリエン類、スタチン類、テトラサイクリン類、フラボノイド類など多数の医薬資源となるほか、不飽和脂肪酸や短鎖脂肪酸など生理活性に重要な化合物も含み、その生合成改変や生合成の再構築による創薬化学への貢献は大きい。

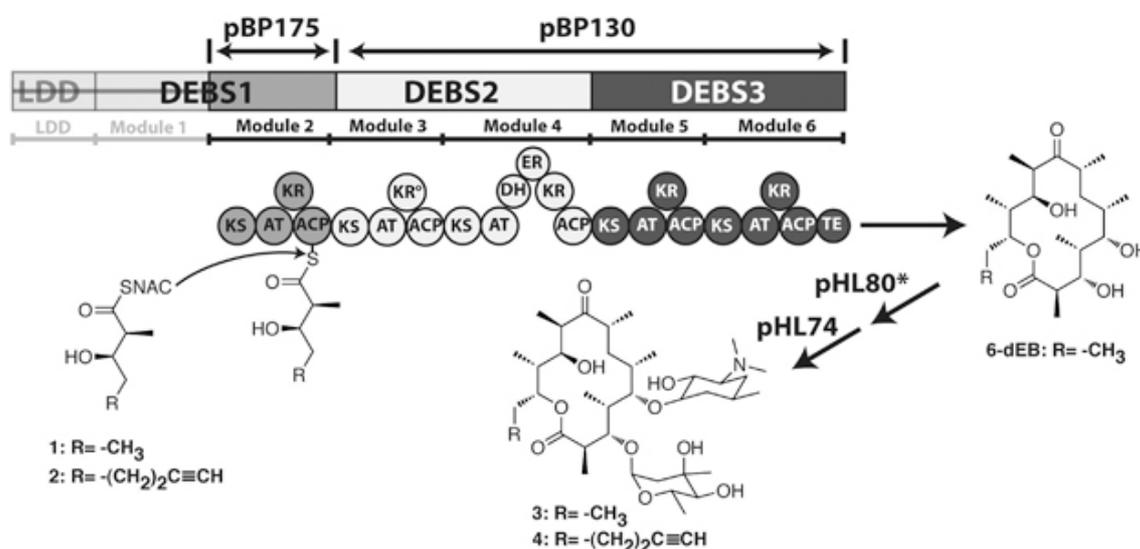


図 1-4 Mutasynthesis によるエリスロマイシン生合成の改変 (Ref17 より引用)

これまで、モジュール型 I 型 PKS の生合成改変では PKS の開始基質の変換に成功した例が多く報告されている^[16]。例えば、エリスロマイシンの生合成では開始基質の生合成に関わる遺伝子を欠損させ、非天然基質を投与することで当該基質が PKS の開始基質として取り込まれ、続く伸長反応が進行し非天然型化合物を、主生成物として得ることに成功している^[17] (図 1-3)。このような取り組みは mutasynthesis と呼ばれ、生合成経路の人為的改変のためにしばしば用い

られてきた^[18]。しかし、ポリケタイド骨格の大部分を構築するのは伸長基質であり、伸長反応を人為的に改変することは困難である。これまでに、伸長基質を選択し PKS にロードする AT ドメインに点変異を加え、非天然基質を培地添加することで非天然型エリスロマイシンの産生に成功した例はあるものの、エリスロマイシンが主生成物であることに変わりはなく、得られる非天然エリスロマイシンは 10 分の 1 以下の産量であった^[19]。また、エリスロマイシン生合成 PKS の AT ドメインを欠損させ、新たに *trans*-AT PKS 由来の acyltransferase を反応系に加えることでフルオロマロニル CoA を受け入れる PKS を創出した例も見られるが、この場合では一回の伸長反応が進行しトリラクトン様化合物が低収量で得られるに留まり、フッ素置換エリスロマイシンの生産は達成できていない^[20]。この様に、ポリケタイド骨格の大部分を占める伸長基質の改変は未だ難しく、また PKS のモジュール構造を並べ替えて新たな生合成経路を構成することはさらに報告例が少なく^[21]方法論は全く整備されていないのが現状と言える。

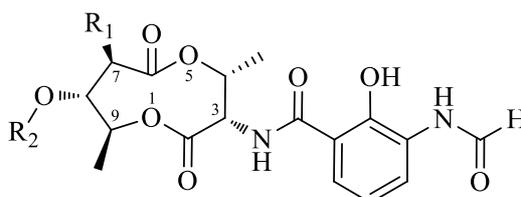
天然において多くの PKS では伸長基質にマロニル CoA またはメチルマロニル CoA しか用いられないが、一部の生合成経路においては多様な伸長基質の取り込みが可能であることが知られており、クロトニル CoA 炭酸化酵素が多様な伸長基質の供給を担っている。クロトニル CoA 炭酸化酵素はすべての微生物に存在している訳ではないため、そのような微生物においては伸長基質の供給がなされないことがボトルネックとなる^[22]。従って、多様な伸長基質を供給できる酵素を導入することで微生物の代謝経路を拡張し、細胞工場としての能力を向上させることができる。

第 2 章では、アンチマイシンの生合成中で PKS に様々な伸長基質を供給するクロトニル CoA 炭酸化酵素 AntE に着目し、その構造に基づいた合理的機能改変と、改変 AntE 酵素を用いた新規アンチマイシン生産を報告する。AntE は PKS に対する非天然の伸長基質となりうる種々の置換マロニル CoA を生産できる酵素であり、すべての PKS 経路でこれを利用できる可能性を有している。第 3 章では、アミノポリオール化合物の構造類似性に着目し、自然がいかにもジュール型酵素を組み替えて分子多様性を創出しているかのメカニズムを解明した。これらの遺伝子組換えメカニズムを応用した PKS リプログラミングにつながることを期待される。

第2章 Antimycin A の生合成研究

第1節 緒論

Antimycin A は1948年に Leven らにより *Streptomyces* 属放線菌から単離された9員環ジラクトン骨格を有する化合物群であり^[23]、C7、C8位の多様なアルキル側鎖の違いから今日では46もの類縁体が天然より単離報告されている^[24] (表2-1)。



Name	R ₁	R ₂
Antimycin A _{1a}	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{1b}	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A _{2a}	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	COCH(CH ₃) ₂
Antimycin A _{2b}	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{3a}	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{3b}	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A _{4a}	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH(CH ₃) ₂
Antimycin A _{4b}	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{5a}	CH ₂ CH ₃	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{5b}	CH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A _{6a}	CH ₂ CH ₃	COCH(CH ₃) ₂
Antimycin A _{6b}	CH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{7a}	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	COCH(CH ₃) ₂
Antimycin A _{7b}	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	COCH ₂ CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{8a}	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A _{8b}	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A ₉	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH ₂ Ph
Antimycin A _{10a}	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃

Antimycin A _{10b}	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A ₁₁	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A ₁₂	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	COCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A ₁₃	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A ₁₄	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	COCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A ₁₅	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂
Antimycin A ₁₆	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	COCH ₂ CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A ₁₇	CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Antimycin A ₁₈	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COCH ₃
Antimycin A ₁₉	CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	COCH ₂ CH(CH ₃)CH(CH ₃) ₂
Antimycin A ₂₀	CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	COCH ₃
Urauchimycin A	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ CH ₃	H
Urauchimycin B	CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H
Urauchimycin C	CH ₂ CH ₃	H
Urauchimycin D	CH ₃	H
Kitamycin A	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	H
Kitamycin B	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH(CH ₃) ₂	H
Deisovalerylblastomycin	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	H
Splenocin A	CH ₂ Ph	COCH ₃
Splenocin B	CH ₂ Ph	COCH(CH ₃) ₂
Splenocin C	CH ₂ Ph	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃
Splenocin D	CH ₂ CH ₃	COPh
Splenocin E	CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COPh
Splenocin F	CH ₂ (CH ₂) ₃ CH ₃	COPh
Splenocin G	CH ₂ (CH ₂) ₄ CH ₃	COPh
Splenocin H	CH ₂ CH(CH ₃)CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	COPh
Splenocin I	CH ₂ Ph	COPh
Splenocin J	CH ₂ Ph	H

表 2-1 アンチマイシンの種類

Antimycin A は興味深い活性を有しており、抗真菌活性の他、殺ダニ作用、殺虫作用、細胞毒性作用など多くの生物活性を持ち、その作用機序は、ミトコンドリア内の電子伝達系に存在する cytochrome b と c1 から構成される複合体 III を阻害することで呼吸鎖阻害活性が作用発現する^[25]。また、アンチマイシンはアポトーシス関連タンパクの bcl2 ファミリーを阻害し、アポトーシスを誘導することも近年明らかとなった^[26]。Antimycin A はその活性の強さから呼吸鎖阻害剤として生化学試薬として利用されているが、強力な細胞毒性を示すことが医薬品としての利用を妨げている。

顕著な生物活性を有し、かつ連続立体中心を含む 9 員環ジラクトン骨格を有する antimycin 類は全合成の標的化合物としてもしばしば注目され、数多くの全合成が達成されている^[24]。しかしながら、ジラクトン骨格の構築には立体制御とマクロラクトン化反応の二つの困難が伴い、未だに antimycin 類の網羅的全合成は達成されていない。

Antimycin A の生合成に関してもその発見以来盛んに行われ、その遺伝子群と生合成機序は、トリプトファンまたはアントラニル酸の放射性同位体を用いた標識実験や^[27]、著者が学部在学時に行った徳島文理大学薬学部浅川義範教授、伊藤卓也講師、および中国科学院上海有機化学研究所劉文教授との共同研究などにより明らかとなっている^[28] (図 2-1)。Antimycin A は 4 分子が NRPS-PKS 複合体酵素により順次縮合することで生合成され、その生合成は大きく 1) 開始基質の生合成反応、2) 伸長反応、3) 後修飾反応に分けることができる。

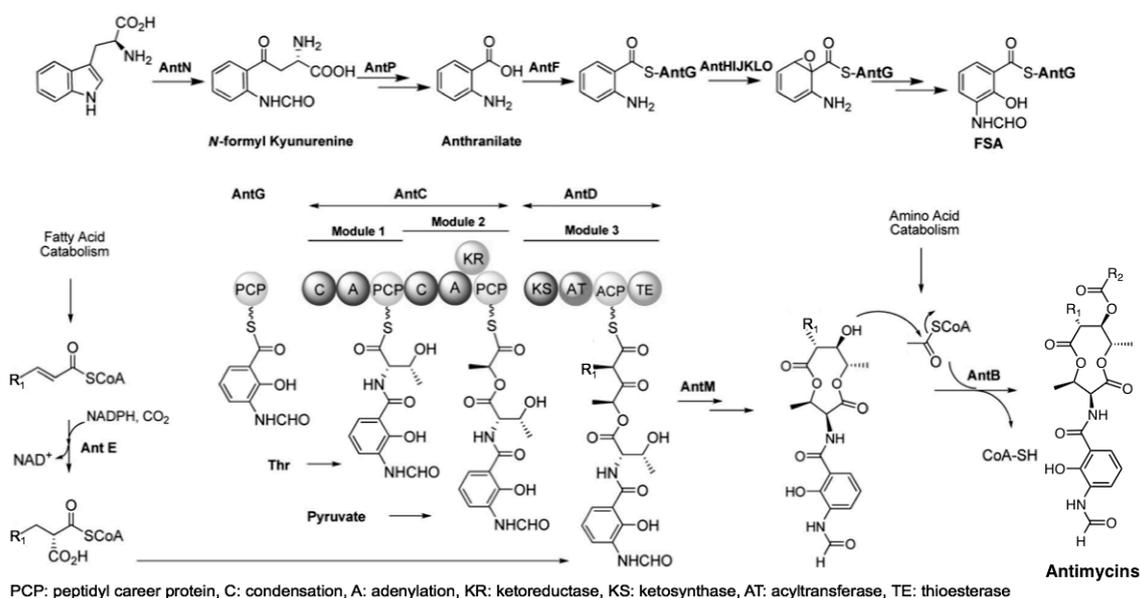


図 2-1 antimycin の生合成経路

1) 開始基質の生合成反応では、トリプトファンを原料とし、酸化的芳香環開裂反応を含む数ステップを経てアントラニル酸へと変換後、エポキシ化とつづく NIH-1,2-シフト型の転位反応により伸長反応の開始基質となる *N*-formamido salicylic acid (FSA) が生合成されると提唱されて

いる。2) 伸長反応ではまず NRPS 酵素 AntC により FSA とスレオニンがアミド結合を、次にピルビン酸がエステル結合を形成、そして PKS 酵素 AntD により様々な置換側鎖を持つアルキルマロニル CoA が Claisen 縮合により導入され、AntD の TE ドメインによる環化的脱離を経て 9 員環ジラクトン骨格が形成される。3) 後修飾反応ではケトレダクターゼ AntM がピルビン酸由来の C8 位ケト基を水酸基に還元すると予想され、アシル基転位酵素 AntB が C8 位の水酸基をエステル化し、多様なアシル側鎖を導入する。

Antimycin A の生合成における特徴の一つに、多様な伸長基質を PKS が受け入れ、構造多様性を生み出せることが挙げられ、一般に PKS はマロニル CoA 及びメチルマロニル CoA を専ら伸長基質として用いることと比較すれば興味深い特徴であると言える。Antimycin A は C7、C8 位(それぞれ R_1 、 R_2 のアルキル側鎖に対応)に多様な構造を有する化合物群であり、従って該当箇所を合成する酵素の基質認識は甘く、人為的なエンジニアリングによりさらなる構造多様性の拡張が期待される。著者は修士過程において、中国科学院上海有機化学研究所劉文教授との共同研究により、創薬化学の観点より薬効の向上と毒性の軽減を目的とした、またケミカルバイオロジーの観点より機能性小分子の作成を目的とした、生合成を利用した類縁体ライブラリの創出に成功している^[29](図 2-2)。

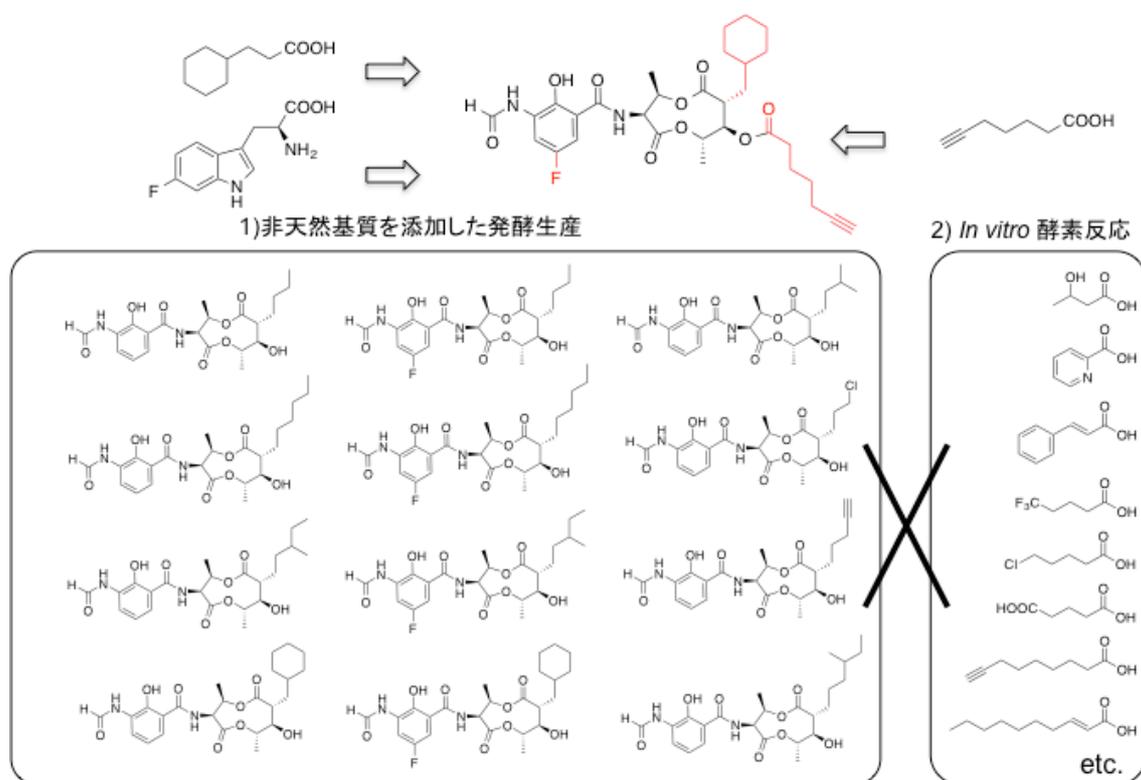


図 2-2 *In vivo* 発酵生産と *in vitro* 酵素反応の掛け合わせによる antimycin ライブラリの創出

ここでは deacylantimycin 産生株 (*Streptomyces* sp.NRRL2288 $\Delta antB$) に 6-フルオロトリプトファン及び種々置換基を有するカルボン酸を培地添加した発酵生産により 12 種類の deacylantimycin を産生、それぞれ単離した後、AntB によるアシル化酵素反応を 20 以上のカルボン酸を基質として用いて構造多様化することに成功している。得られた類縁体ライブラリの活性評価により、アシル基の有無が活性に極めて重要であることや、細胞毒性には疎水性側鎖の長さが重要であることなどが判明した。また末端アルキンの導入された類縁体を用い、細胞内で蛍光色素とクリック反応を行うことでその局在を示すことにも成功した^[29]。

以上の結果は生合成を利用した antimycin 類の構造多様化により、有機合成では困難であるジラクトン骨格側鎖の容易な変換とライブラリ創出を達成したことを示すものと考えられる。しかし同時に、これらの結果は生合成経路及び生合成酵素の基質特異性の曖昧さを利用したのみとも考えられる。Antimycin 類の生合成においてなぜ PKS の伸長基質に多様性が生まれるのか、つまり、なぜ伸長基質生合成に関わる酵素の基質特異性が曖昧なのか、を解き明かすためにはその触媒機構の分子基盤への理解が求められる。詳細な触媒メカニズムを解明することができれば、酵素の合理的機能改変が可能となるほか、他の酵素にこれらの発見を応用した生合成経路の拡張ができるなど、自然界を利用するだけでなく自然界を超越した生合成工学が可能となる。

本章ではアンチマイシン生合成においてその伸長基質の生合成酵素がなぜ寛容な基質特異性を持ち得たかを理解すべく、始めに、PKS に伸長基質を供給する鍵酵素であるクロトニル CoA 炭酸化酵素 AntE の結晶構造解析を述べる (第 2 節)。続いて立体構造に基づく AntE の合理的機能改変(第 3 節)と、AntE 変異体の活性評価および立体構造解析(第 4 節)、得られた活性の変化した AntE 変異体を用いた新規 antimycin の産生(第 5 節)を報告する。これらの実験を通じて、アンチマイシンの C7 位側鎖の多様性は AntE が供給する伸長基質プールの構成に由来することを明らかとし、また構造に基づく合理的機能改変で得られた AntE を用いた新規アンチマイシンの産生を達成した。AntE はアンチマイシンのみならず PKS 一般に対し非天然伸長基質を供給可能な生合成酵素であり、合成生物学を用いた創薬化学に広く応用可能な酵素となることが期待される。

第2節 クロトニル CoA 炭酸化酵素 AntE の構造解析

クロトニル CoA 還元/炭酸転位酵素 (crotonyl-CoA reductase/carboxylase) AntE は PKS 伸長反応に用いられる非典型伸長基質 (アルキルマロニル CoA) を供給する重要な役割を担う^[22]。一般に PKS はマロニル CoA やメチルマロニル CoA のみを用いて伸長反応を行うため、AntE の広汎な基質特異性は PKS 伸長反応の多様性の鍵となっている。その基質認識や反応機構を解明するため、AntE のタンパク質結晶構造解析を行った。AntE は α,β -不飽和 CoA を基質に、二酸化炭素を炭酸供給源として NADPH を補酵素に用い、二重結合の還元的炭酸化を触媒し、同時に還元副生成物も与えることが知られている^[28b,29] (図 2-3)。

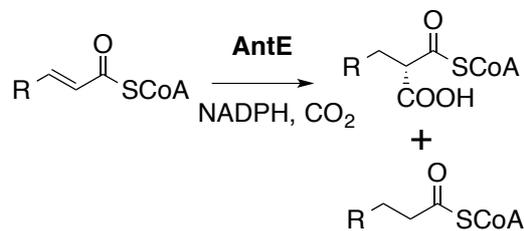


図 2-3 AntE の反応スキーム

始めに AntE 全長を His₆ tag リコンビナント酵素として発現すべく、antE-f および antE-r プライマーを用いて PCR 反応により AntE 全長を増幅、pET28a ベクターにクローニングを行った。得られた発現ベクター pANTE を大腸菌 *E.coli* BLR にヒートショック法で導入、1 mM IPTG を加え発現誘導し 23 °C、16 h インキュベートした。LB 培地 4L 分を培養し得られた菌体を回収後、超音波破碎し、Ni-affinity column と gel filtration column で順に精製を行い、タンパク質純度が 95% 以上であることを SDS-PAGE にて確認した(図 2-4)。得られたタンパク質溶液に 280 nm の吸光度測定を行い、10 mg/ml まで濃縮、計 2 ml を 50 μ l ずつ分注し -80°C 保存した。

Superdex200 カラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィーの結果、溶出時間から分子量は 143 kDa であり、三量体または四量体であると考えられた。動的光散乱法による DLS 分析を行った結果、多分散指数 12.6%、193 kDa の予測分子量を与えたことから、四量体であることが示唆された。

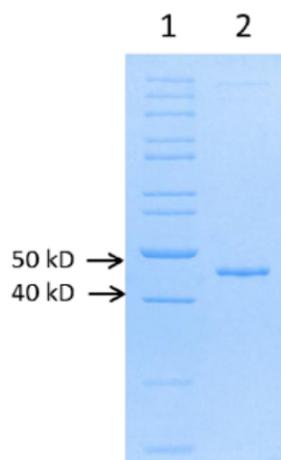


図 2-4 AntE の精製

1:分子量マーカー, 2:AntE (理論分子量 47 kDa)

結晶化スクリーニングに Wizard Crystallization Screen Kit と Hampton Crystal Screening Kit を用い、蒸気拡散法による結晶化を行った結果、始めに 20% PEG 3000, 100 mM HEPES/sodium hydroxide pH 7.5, 200 mM sodium chloride バッファー条件下で良質の結晶が得られた。しかしバッファー組成を実験室で各試薬を用い調整したものは結晶を再現することができず、また試薬を新しく購入したものでも再現性を得ることはできなかった。この要因としてスクリーニングキットの保存期間が長かったために PEG が酸化されたことや pH が変化していたことが予想される。そこで再度スクリーニング探索を行い、30% (v/v) PEG400, 100 mM CAPS/ sodium hydroxide pH 10.5 条件下でクラスター状結晶が再現性よく得られた。PEG 濃度と pH 条件を検討した結果、38% PEG 400, 100 mM CAPS/sodium hydroxide pH10.0 にて良質の結晶を得ることができた。得られた結晶を高エネルギー加速器機構・フォトンファクトリー-BL17A にて X 線回折を行い、分解能 2.2 Å で電子密度の取得に成功した (表 2-2)。

表 2-2 AntE の結晶構造解析

	AntE
Unit cell parameter	<i>I</i> 222
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	68.2, 134.9, 92.5
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>g</i> (°)	90, 90, 90
Resolution range (Å)	50.0 -2.20
Completeness (%)	99.7 (98.6)
$\langle I/sI \rangle$ (%)	15.92 (3.00)
R _{merge} (%)	12.7 (74.0)
Redundancy	7.31 (7.09)
No. of observed reflection	160275 (24519)
No. of unique reflection	21938 (3457)
Refinement	
Resolution (Å)	37.5 to 2.20
Overall R _{work} (%)	17.8
Overall R _{free} (%)	23.4
Total atoms	
No. of protein atoms	3128
No. of waters	109
No. of ligand	73
Average B-factors (Å ²)	
Protein atoms	35.9
Waters	38.7
Ligands	34.7
RMSD from ideal	
Bond length (Å)	0.007
Bond angles (°)	1.04

構造解析にはすでに結晶構造の解かれたクロトニル CoA 還元/炭酸化酵素である CinF^[30] (*Streptomyces* sp JS360 由来 PDBID:4A10)をモデルに Swiss Modelにより AntE 配列に置き換えたモデルを鋳型に分子置換法を適応、構造精密化を行い R_{work}=0.23, R_{free}=0.19 にて構造を決定した。

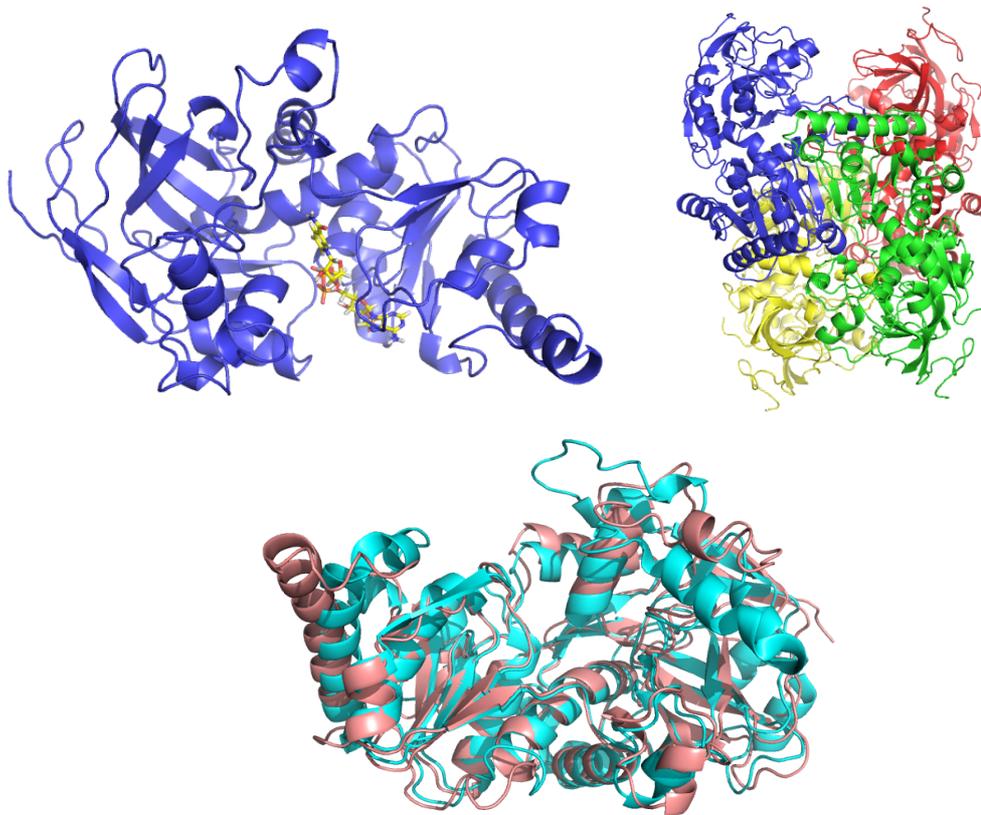


図 2-5 AntE の構造

左:AntE 単量体+NADP⁺ 右:AntE 四量体 下:AntE(赤)と CinF(青, PDB 4A01S)の比較

AntE は dimer of dimer 型の四量体構造をとり、各モノマーは CinF 同様の $\alpha\beta\alpha\beta$ バレル構造を有し、NADPH 結合ドメインと脂肪酸 CoA 結合ドメインに分かれていた。CinF の NADP⁺, CoA 共結晶構造(PDBcode:4A01S)に重ね合わせた結果、AntE は両基質の結合領域がよく一致し保存されていることが判明した(図 2-5-7, 赤:AntE 青:CinF)。

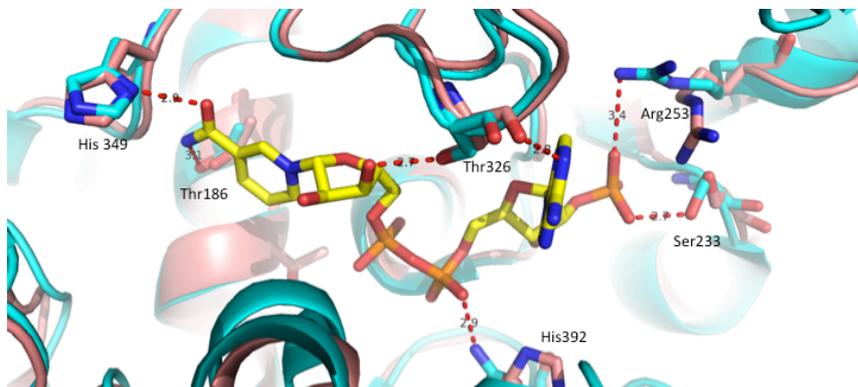


図 2-6 NADPH 結合様式

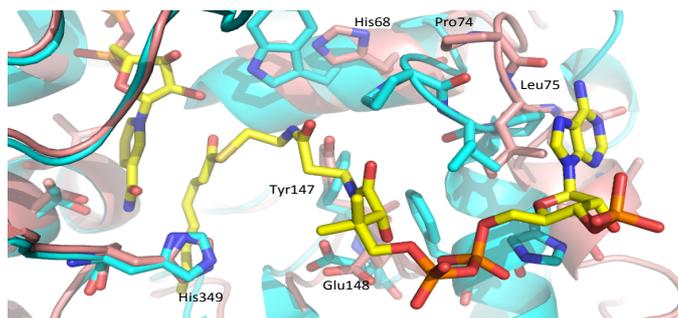


図 2-7 脂肪酸 CoA 結合様式

CinF は octenoyl-CoA を基質として受け入れる^[30]が、AntE は octenoyl-CoA の他にも第 3 節で示したように様々な基質を受け入れる。この理由として、基質結合部のアミノ酸変異および基質結合ループのずれによるキャビティの拡大が考えられる(図 2-8, 2-9)。キャビティ構成残基を見ると、Ala120 (CinF では対応するアミノ酸は Proline、以下同様), Ala182(Leu)などの変異によりキャビティの幅が拡大していることが示唆された一方で、キャビティ底部に位置する Cys121(Ala)、Val350(Gly)などかさ高い残基による置換も見られた。Val144(Ala)の位置する基質結合ループは CinF のものよりも外側にずれており、これらよりキャビティ中心では立体障害の小さいアミノ酸への変異により幅が拡大し、キャビティ底部ではかさ高いアミノ酸置換が見られるもののループのシフトおよび Ala120(Pro)、Ala182(Leu)によりポケットが形成されていると考えられる。

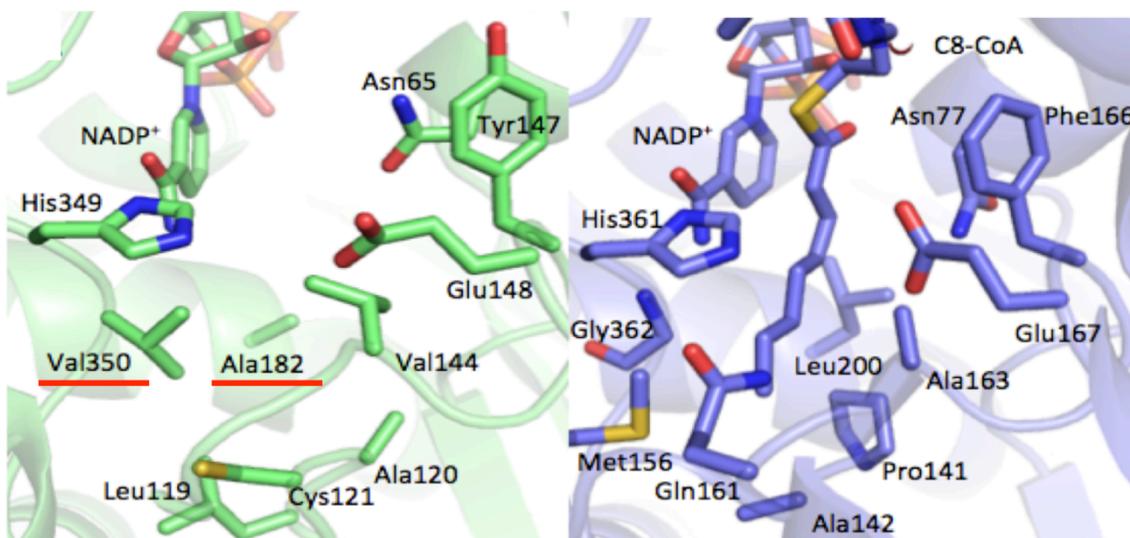


図 2-8 AntE(左)と CinF(右)のキャビティ比較

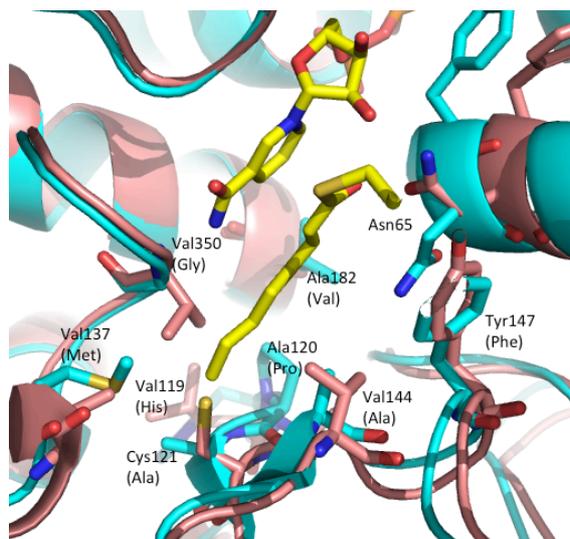


図 2-9 活性部位の構造比較 AntE(赤色)と CinF(水色)の重ね合わせ
黄色は CinF と共結晶構造の NADP⁺ と octenoyl-CoA

第3節 AntE の立体構造基盤に基づく酵素機能改変

AntE と CinF の比較から AntE の基質結合部位の横幅が広いことが明らかとなったが、基質結合ポケットを形成しているアミノ酸の役割を同定し、また合理的な機能改変を行うため、点変異を導入した AntE 変異体を作成し、各種基質を用いてその触媒能の変化を調べることにした。

始めに、CinF や他の CCR 酵素では Leu が保存されている箇所である Ala182 に着目し、A182L 及び A182G 変異体を作成した。構造分析の結果からは、A182L は基質結合ポケットを狭めるため、基質特異性が厳しくなり、A182G では逆により気質結合ポケットが広がるため寛容な基質特異性を示すことが予想された。変異体の作成のため、点変異導入 PCR により目的の変異を持つ *antE* 遺伝子をクローニング後、前節と同様に発現精製を行い変異体 AntE を調整した。続いて酵素の *in vitro* 反応を次の組成で行った(100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM NADPH, 1 mM substrate, 60 mM NaHCO₃, 10 uM Enzyme, 30 °C, 3 hrs incubation)。メタノールを反応系に等量加え反応を終結後、遠心上清を LC-MS を用いて分析した。Crotonyl-CoA、cinnamoyl-CoA、*p*-coumaroyl-CoA を用いた反応の結果を以下に示す。

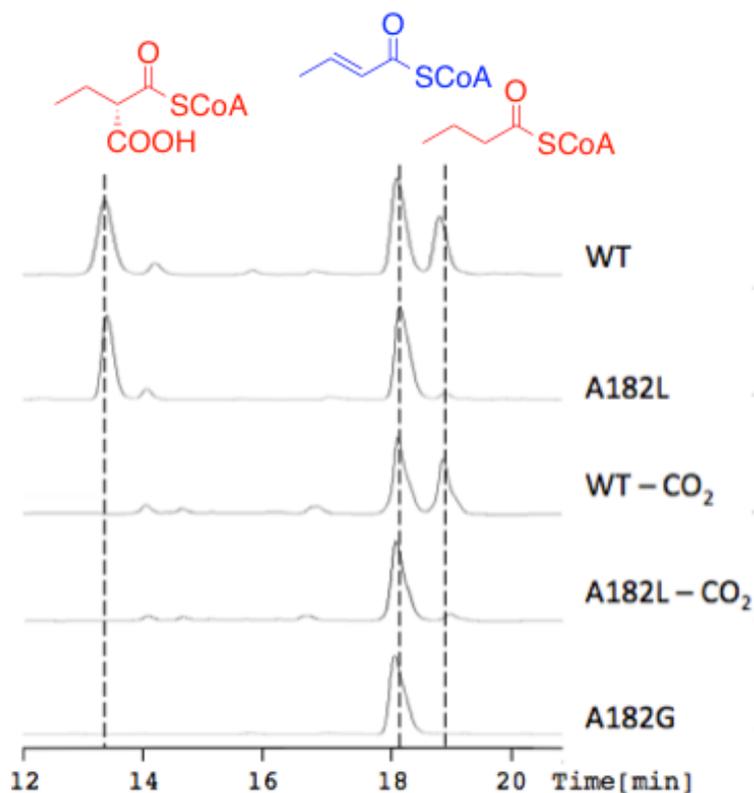


図 2-10 crotonyl-CoA を用いた A182 変異体の *in vitro* アッセイ

まず、crotonyl-CoA を用いた反応では(図 2-10)、野生型酵素(WT)は butyrylmalonyl-CoA を生

成し、副生成物として butylyl-CoA を与えるが、反応系から二酸化炭素供給源である炭酸水素ナトリウムを取り除いた場合(WT-CO₂)、butylyl-CoA のみを与えた。一方、A182L 変異体では通常の条件下で butylylmalonyl-CoA を選択的に生成し、炭酸水素ナトリウムを除いた A182L-CO₂ の反応条件では butylyl-CoA はほぼ生成しなかった。この結果は、A182L 変異により反応選択性が変化し、炭酸化選択的に反応が進行するようになったことを示している。他方、A182G 変異体では、通常の反応条件では全く反応の進行が見られなかった。A182G 変異体は基質特異性がさらに寛容になると予想されたが、この結果は A182 の側鎖が基質と疎水性相互作用を示すことにより、基質認識に関与することを示唆している。

続いて cinnamoyl-CoA を用いて WT 及び A182L, A182G の触媒能の変化を上記同様の条件のもと調べた(図 2-11)。野生型酵素では基質を完全に消費し、benzylmalonyl-CoA と副生成物である phenylpropanoyl-CoA を与え、WT-CO₂ は phenylpropanoyl-CoA のみが生成した。一方、A182L 変異体では反応は全く進行しなかった。これは嵩高い Leu 側鎖が基質結合ポケットを狭めているために、基質を認識しなくなったと考えられる。また、この結果は Ala182 が AntE の寛容な基質認識に重要であることを示している。興味深いことに、crotonyl-CoA では反応が進行しなかった A182G 変異体は cinnamoyl-CoA を基質に用いた場合では benzylmalonyl-CoA は生成しなかったものの、phenylpropanoyl-CoA の産生が確認された。この結果は、A182G は酵素活性を保っており、嵩高い基質を選択的に還元することを示している。

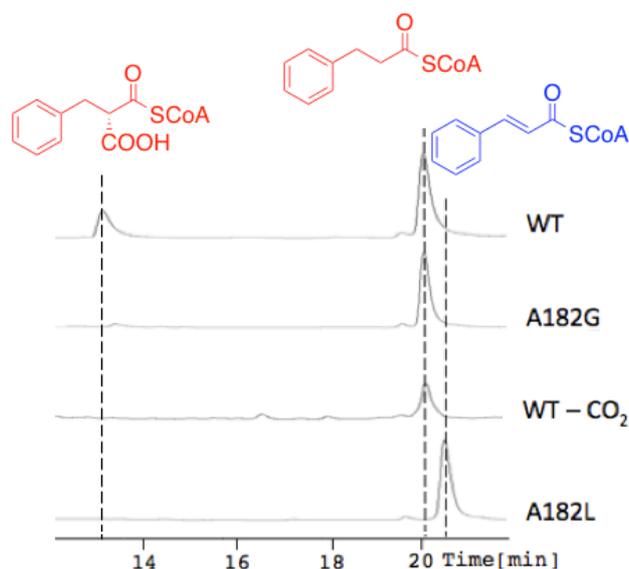


図 2-11 cinnamoyl-CoA を用いた A182 変異体の in vitro アッセイ

最後に *p*-coumaroyl-CoA を用いて WT 及び A182G の活性を調べた(図 2-12)。その結果、WT は *p*-coumaroyl-CoA を受け入れなかった一方、A182G は還元反応の進行した生成物を与えた。

これは、野生型 AntE では *p*-coumaroyl-CoA の水酸基が立体障害を生じることにより受け入れられないものの、A182G では基質結合ポケットが広がるために基質特異性が寛容になったことを示唆している。

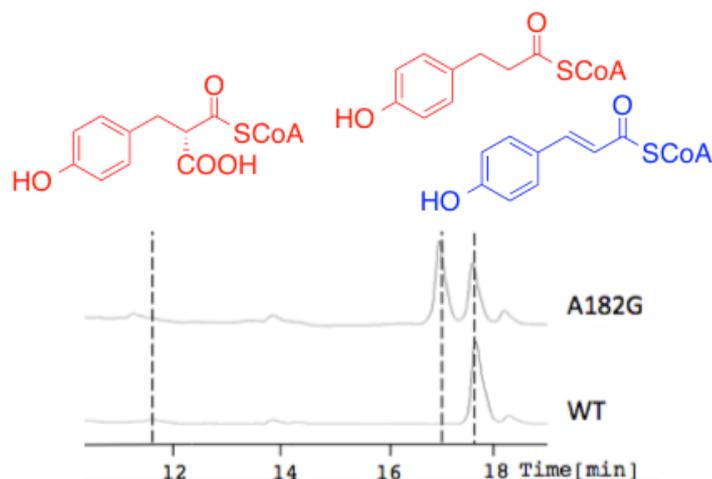


図 2-12 *p*-coumaroyl-CoA を用いた A182 変異体の *in vitro* アッセイ

以上、A182 への変異導入による酵素機能改変の結果をまとめる。1) A182L は基質特異性が狭まり、crotonyl-CoA のみを受け入れ、また反応選択性も炭酸化選択的となった。2) A182G は基質特異性が変化し、WT では受け入れない *p*-coumaroyl-CoA の触媒能を獲得したが、crotonyl-CoA などの小さな基質は受け入れず、また反応選択性も還元選択的となった。これらより 182 番残基は反応選択性を制御するとともに、基質の結合にも影響を与える重要な残基であると考えられる。

次に Val350 に着目し、V350A、V350G、V350F 各変異体をそれぞれ作成し、その触媒能の変化を *in vitro* 酵素反応により同様に調べた。Val350 は CinF での Gly に相当し、構造分析の結果からは V350A、V350G では基質結合ポケットが拡張されることから特異性がより寛容となり、V350F では逆に特異性が向上、もしくは活性が消失することが予想された。

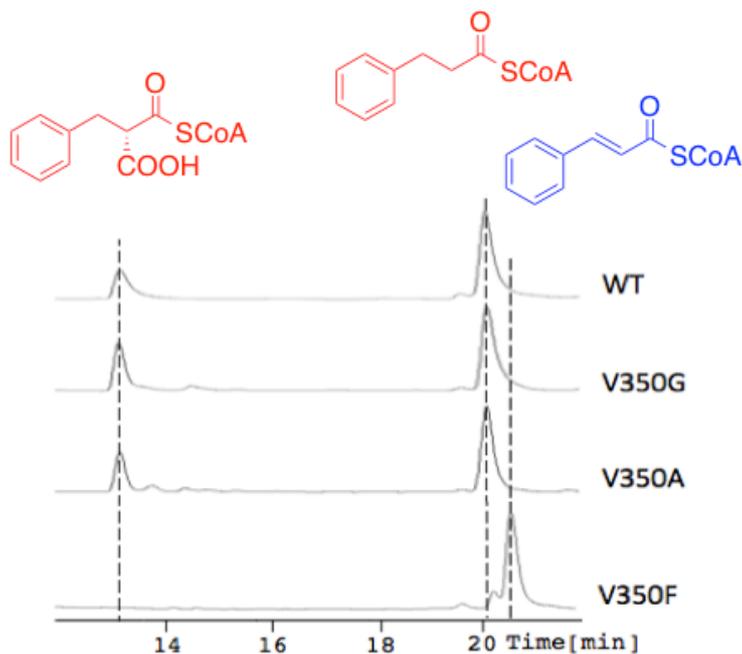


図 2-13 cinnamoyl-CoA を用いた V350 変異体の in vitro アッセイ

Cinnamoyl-CoA を基質用いた反応を各変異体について行った結果、V350A、V350G とともに野生型と同程度の活性を示し炭酸化産物と還元副産物を与えた一方、V350F では反応生成物は全く見られなかった(図 2-13)。これは、V350F ではより嵩高いフェニルアラニン側鎖が基質結合ポケットを狭めることで、cinnamoyl-CoA を受け入れなくなったと考えられる。

p-Coumaroyl-CoA を基質用いた反応では、野生型はこの基質を受け入れなかったが、V350A 及び V350G 変異体では炭酸化産物と還元産物を与えた(図 2-14)。この結果は V350A 及び V350G の変異により基質結合ポケットが拡大され、新たな触媒能を獲得したことを示している。これらの変異体がより嵩高い基質を受け入れるかを調べるため、次に Indolylallyl-CoA を基質に用いて活性評価を行った(図 2-15)。なお、3 時間の反応時間では生成物のピークが微弱であったため、反応時間を 12 時間に延長して測定を行っている。その結果、V350A は本基質を受け入れなかったものの、V350G では反応が進行し、炭酸化産物と還元副産物を与えた。

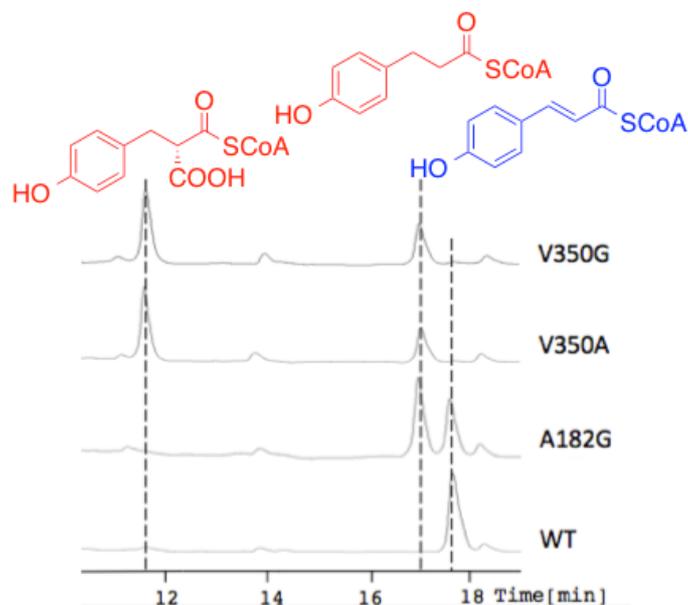


図 2-14 *p*-coumaroyl-CoA を用いた V350 変異体の in vitro アッセイ

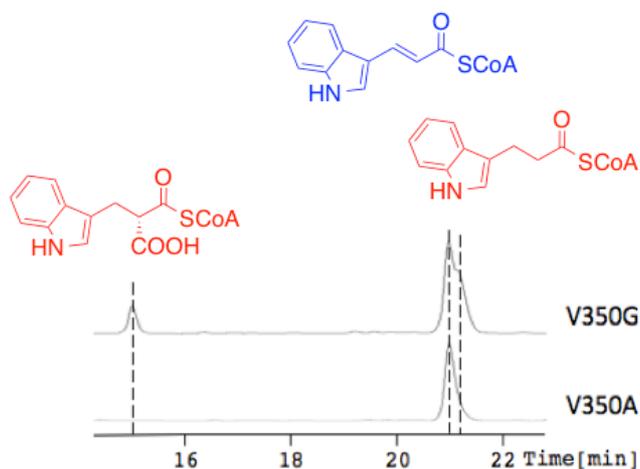


図 2-15 indolylallyl-CoA を用いた V350 変異体の in vitro アッセイ

以上、V350 への変異導入により、1)V350F は基質特異性が狭まり、cinnamoyl-CoA を受け入れなくなる。2)V350A は *p*-coumaroyl-CoA の触媒能を獲得し、V350G は indolylallyl-CoA をも触媒可能となる、ことが判明した。350 番残基は基質特異性の制御に大きな影響を与える残基であると考えられる。

第 3 節の結果をまとめる。構造に基づいた合理的変異導入の結果、点変異により AntE の機能改変に成功した。まず、Ala182 への変異により反応選択性を炭酸化および還元特異的に変化させることができた。また、Val350 への変異導入により基質特異性を変化させ、V350G では新たにインドール置換基を有する基質に対する触媒能を得ることに成功した。野生型 AntE ではこ

れまでに様々な長さのアルキル鎖を有する α,β -不飽和 CoA を受け入れ、またハロゲンやアルキンを有する基質も受け入れることが分かっている^[29] (図 2-16)。V350G 変異体酵素を用いた実験結果より、本酵素はフェノール性水酸基のような親水性官能基やチオフェンやインドールなどのヘテロ環を含む芳香環で置換された基質に対しても触媒活性があることが示された。インドール置換基質は V350A では受け入れられず、V350G でも活性は弱かったことを考えると、V350G は sp^3/sp^2 炭素を問わずインドールより小さい疎水性または親水性置換基を有する様々な α,β -不飽和 CoA を炭酸化できると予想される。

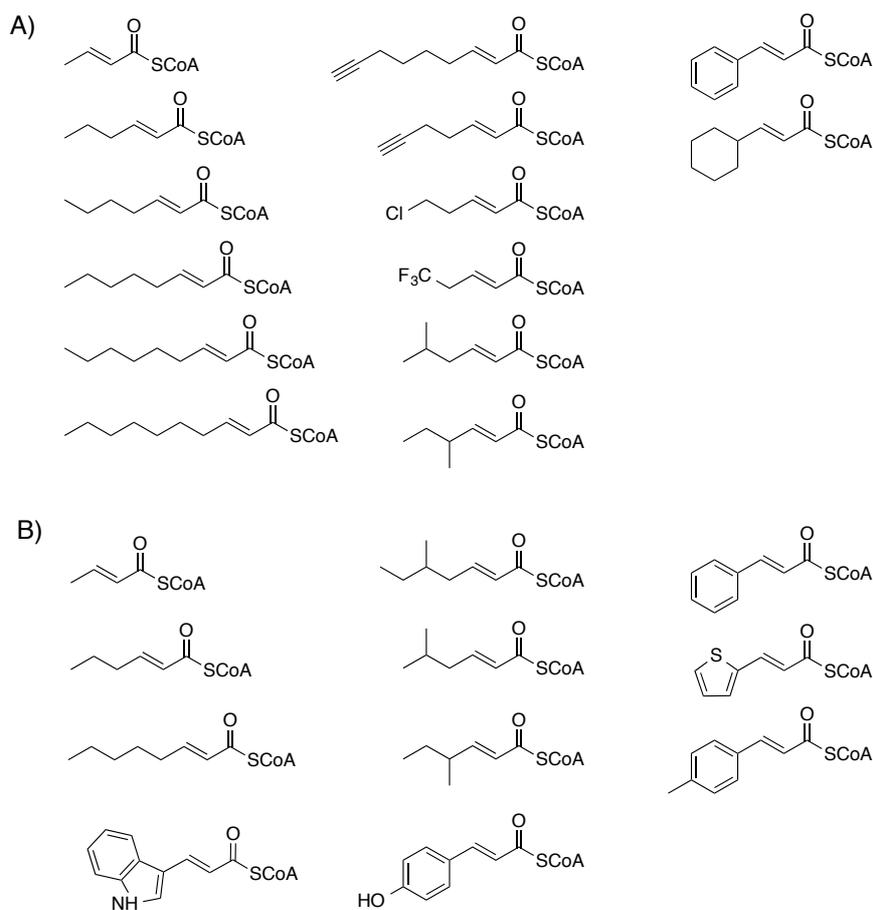


図 2-16 A) AntE WT の受け入れる基質
B) AntE V350G の受け入れる基質

第4節 AntE 変異体酵素の酵素反応速度論および立体構造解析

前節において触媒能の変化した AntE 変異体を作成したが、各変異体の触媒能力を生化学的に評価するため酵素反応速度論の評価を、変異導入による酵素反応の変化を構造に基づき説明するために変異体の構造解析を、それぞれ行った。

まず、定常状態を仮定しミカエリス・メンテン式を適応した酵素反応速度論解析を行った。基質濃度の異なる酵素反応液 50 μl (100 mM HEPES buffer, pH 7.0, 2 mM NADPH, 60 mM NaHCO₃, substrate 50 μM to 2 mM) に酵素を 2 μM 加え 30 秒間 30 $^{\circ}\text{C}$ 振盪の後、1 分ごとに 340nm の吸光をプレートリーダーで測定 (n=3)、別に測定した NADPH 及び *p*-coumaroyl-CoA の吸光検量線で補正し、NADPH の消費量から酵素反応定数を求めた (図 2-17、表 2-3)。

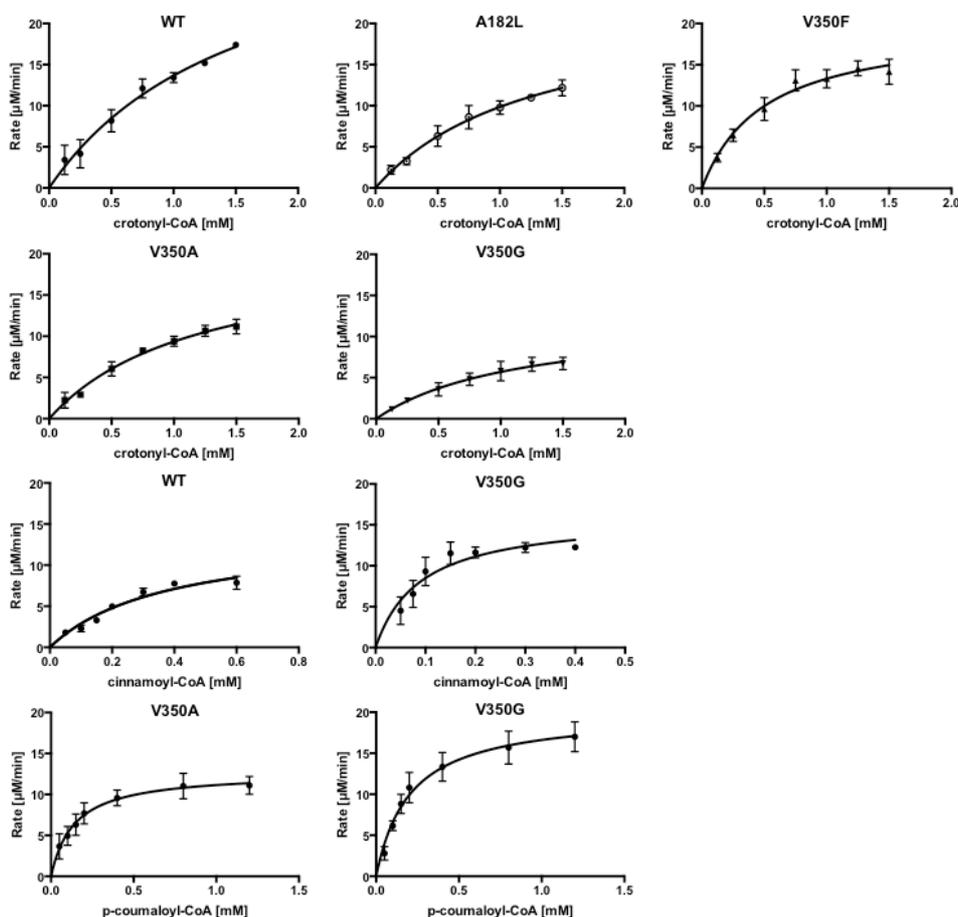


図 2-17 AntE 各変異体のミカエリスメンテンプロット結果

Enzymes	Substrates	k_{cat} (min ⁻¹)	K_M (mM)	k_{cat}/K_M (min ⁻¹ mM ⁻¹)	Reaction selectivity (carboxylation : reduction)
AntE	crotonyl-CoA	10.53±1.5	1.58±0.39	6.6	63:37
	cinnamoyl-CoA	4.13±0.47	0.38±0.081	10.8	25:75
AntE ^{A182G}	cinnamoyl-CoA	N/A	N/A	N/A	3:97
	4-coumaroyl-CoA	N/A	N/A	N/A	0:100
AntE ^{A182L}	crotonyl-CoA	9.11±1.1	1.31±0.29	6.9	95:5
AntE ^{V350F}	crotonyl-CoA	7.58±0.51	0.49±0.089	15.4	32:68
AntE ^{V350A}	crotonyl-CoA	7.18±0.75	1.21±0.23	5.9	58:42
	4-coumaroyl-CoA	4.41±0.24	0.14±0.025	31.5	65:35
AntE ^{V350G}	crotonyl-CoA	4.05±0.66	1.17±0.35	3.5	56:44
	cinnamoyl-CoA	5.26±0.44	0.089±0.021	59.1	30:70
	4-coumaroyl-CoA	6.54±0.35	0.20±0.031	32.7	64:36
	indolylallyl-CoA	N/A	N/A	N/A	30:70

表 2-3 AntE 及び変異体の各基質に対する動力学的パラメータ

その結果、酵素の回転数を表す k_{cat} は各変異体において基質によらず同じオーダーで変化が小さいが、基質との親和性を示す K_M は 10 倍以上の差が観察された。182 番及び 350 番残基は NADPH と二酸化炭素を用いた反応が起こる活性中心には直接影響しない部位であることから、反応機構には影響がなく従って k_{cat} は変わらないと考えられる。また、これらの残基は基質の結合に影響を及ぼすことが各種基質を用いた活性評価より示唆されたが、実際に各変異体における K_M の値に大きな変化が観察されたことで確かに基質の結合に関与することが示された。酵素の反応効率を示す k_{cat}/K_M は cinnamoyl-CoA に対する値の比較をした場合に、V350G 変異体は野生型よりも 5 倍以上の向上が見られた。

各変異体の反応における炭酸化と還元反応の反応選択性については、酵素反応生成物の LC-MS 分析の UV スペクトル面積よりその割合を求めた。A182G 変異体では cinnamoyl-CoA 基質の場合に 100:0、crotonyl-CoA 基質の場合 97:3 の割合で還元産物が優先的に生成した一方、A182L 変異体の crotonyl-CoA 基質との反応では 5:95 の割合で炭酸化産物が優先的に生成した。

次に、各変異体の反応の分子構造基盤を探るべく、構造解析を行った。まず V350A 変異体について、*p*-coumaroyl-CoA との複合体構造を得るべく共結晶化を試みた。野生型 AntE と同様に大腸菌 *E.coli* BLR を発現ホストに用い pET28a ベクターに AntE^{V350A} をクローニング、N-末端 His₆-tag リコンビナント蛋白として発現し Ni-アフィニティーカラム及びゲル濾過カラムにより精製した酵素を用いて結晶化を行った。共結晶化では 1 mM NADP⁺ と 1 mM *p*-coumaroyl-CoA を蛋白溶液に加え、AntE 野生型と同じ沈殿剤と混合することで良質の結晶を得ることができた(図

2-18)。X線構造解析を行った結果、分解能 1.7Å の回折像を取得することに成功した(表 2-4)。分子置換法により構造を取得した結果、NADP⁺の電子密度は構造内にはっきり確認できたものの、*p*-coumaroyl-CoA の電子密度を確認することはできなかった。そこで、共結晶化で用いる *p*-coumaroyl-CoA の濃度を 10 mM まで段階的に高めたものの、10 mM では結晶を取得することはできず、5 mM では結晶が小さく分解能の高い回折像を取得することはできなかった。

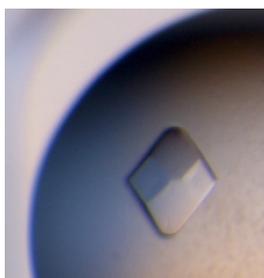


図 2-18 AntE V350A の結晶

次に、1 mM *p*-coumaroyl-CoA 存在下で得られた V350A の結晶に *p*-coumaroyl-CoA をソーキングすることで、複合体構造が得られないかを試みた。濃度を 10 mM と 20 mM でソーキングを行ったが、複合体構造の電子密度を得ることはできなかった。

表 2-4 AntE V350A の結晶構造解析

	AntE ^{V350A}
Unit cell parameter	I222
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	77.6, 95.6, 129.5
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>g</i> (°)	90, 90, 90
Resolution range (Å)	50.0 -1.50
Completeness (%)	99.8 (98.9)
<I/sI> (%)	27.62 (4.29)
R _{merge} (%)	3.6 (46.0)
Redundancy	6.61 (6.46)
No. of observed reflection	509267 (79287)
No. of unique reflection	77021 (12258)
Refinement	
Resolution (Å)	47.8 to 1.50
Overall R _{work} (%)	18.0
Overall R _{free} (%)	19.6
Total atoms	

No. of protein atoms	3123
No. of waters	414
No. of ligand	73
Average B-factors (Å ²)	
Protein atoms	24.0
Waters	33.5
Ligands	23.3
RMSD from ideal	
Bond length (Å)	0.006
Bond angles (°)	1.12

野生型酵素と V350A 変異体の構造を鋳型に、A182L 変異体、および V350G 変異体の構造モデルをそれぞれ作成し、基質結合ポケットの比較を行った図 2-19 を以下に示す。A182L 変異体では Leu182 と Val350 の側鎖により野生型酵素よりもポケット中央の幅が狭まることから、嵩高い基質が結合できなくなる一方で、V350A または V350G では Val 側鎖に相当する部分が広がるために、野生型酵素では受け入れないほどの嵩高い基質も結合できる空間が生まれたと考えられる。V350A と NADP⁺の共結晶構造に二酸化炭素と *p*-coumaroyl-SNAC (N-acetylcysteamine thioester)をドッキングした図2-20を以下に示す。基質のチオエステル酸素と NADP⁺および Asn65 が水素結合できる距離に位置し、Ala350 付近に *p*-ヒドロキシ基が位置し、拡大されたポケットに基質が収まることがわかった。二酸化炭素の結合部位では Asn65 と Glu148 が水素結合できる距離にあり、CO₂炭素の求電子性を高めるとともに Tyr147 のπ電子が CO₂炭素の δ⁺を安定化することで反応が促進されることが考えられる。また Tyr147 は二酸化炭素結合部位や活性中心に水分子が侵入することを防ぐ作用もあると考えられる。なお、CinF と 2-octenoyl-CoA 共結晶構造においては、基質のα位炭素と CO₂炭素の距離は 3.3 Å であり、AntE のドッキングモデルの 4.8 Å はこれよりも離れている。この違いはおそらく CoA 基質結合の有無により酵素構造に変化が生まれることに由来し、AntE でも CoA 基質の結合に伴い、二酸化炭素結合部位がより反応点に近づく形で構造変化が起こるものと予想される。

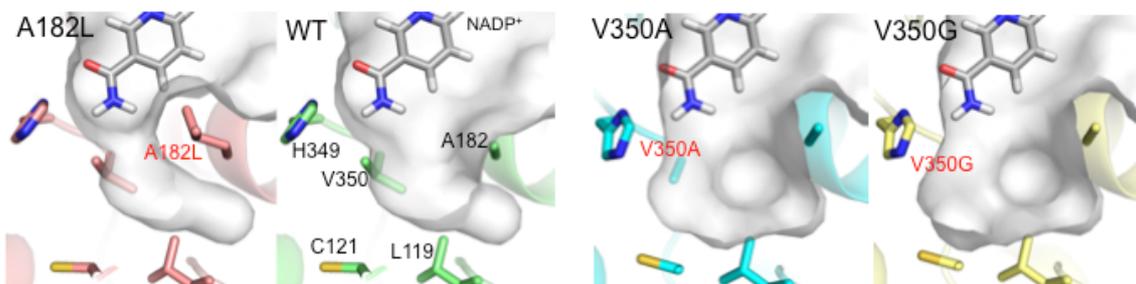


図 2-19 AntE 各変異体のキャビティ比較

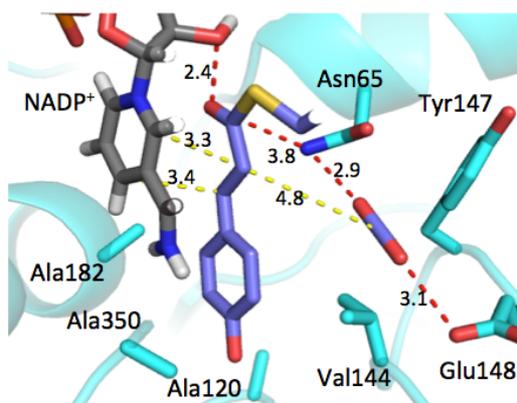


図 2-20 AntE V350A と NADP⁺ 共結晶への二酸化炭素と *p*-クマル基質のドッキングモデル

A182L および A182G での反応選択性の変化が生じた理由についても構造に基づき考察を試みた。CCR は通常、二酸化炭素存在下では α,β 不飽和 CoA 基質の還元的炭酸化反応のみを触媒し、飽和炭素への還元反応は触媒せず、二酸化炭素のない反応系では水分子が求電子剤となりわずかに還元反応が進行することが報告されている^[22b]。また、ほとんどの CCR では AntE の 182 番残基に対応する部位はロイシンが保存されている。一方 AntE は二酸化炭素存在化においても還元反応が副反応として無視できない割合で進行し、二酸化炭素を除いた場合には還元反応が良好に進行する。これらの特徴は 182 番残基側鎖の違いによりある程度説明することができる。まず、A182L において炭酸化選択的になった理由には、Leu182 側鎖が基質結合部への水分子の侵入を防ぎ疎水性ポケットを形成することから、還元反応が進行しなくなったと考えられる。逆に A182G 変異体においては Ala 側鎖のメチル基が消失することで水分子がさらに活性中心に侵入しやすくなり、結果として二酸化炭素への求核攻撃と競合し完全に阻害するか、二酸化炭素の酵素への結合自身を妨げてしまうことで、還元選択的になると考えられる(図2-21)。通常、CCR は Leu 側鎖が水分子の侵入を妨げることで効率的な炭酸化を触媒するが、AntE は Ala 側鎖が水分子の侵入を完全に排除できず反応が競合した結果、還元副産物を与えたと考えられる。

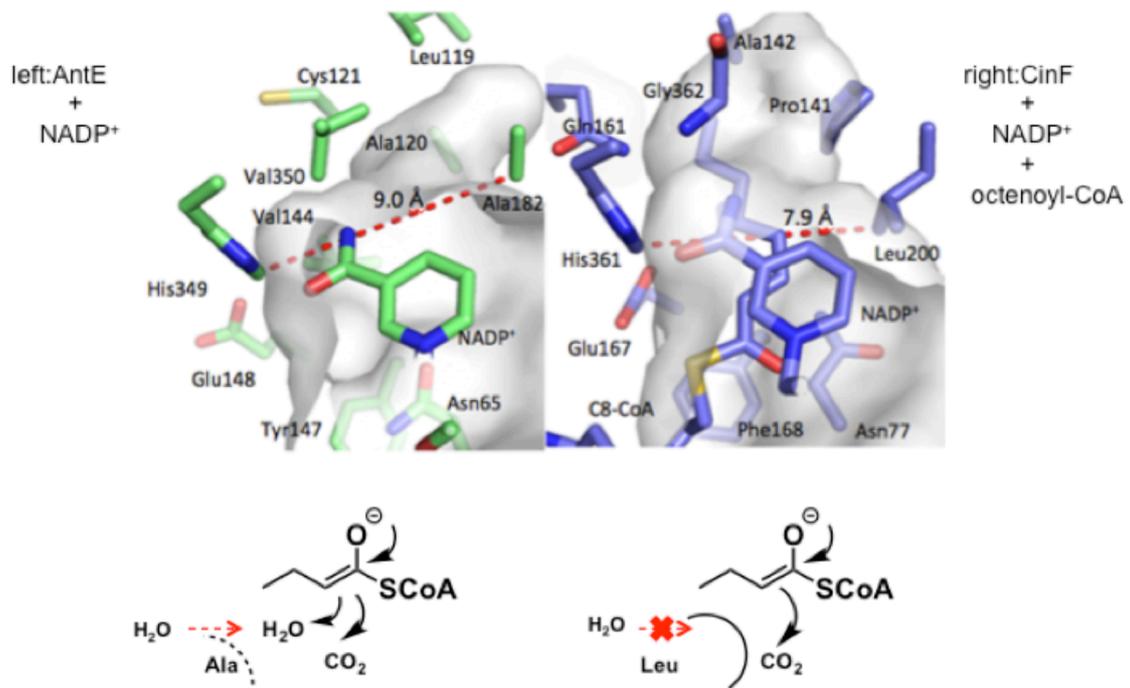


図 2-21 上:AntE と CinF のキャビティ比較
下:A182Lによる反応選択性制御のモデル図

Ala182 は前節の結果より寛容な基質特異性をもたらす残基であることも判明しているが、AntE はいわば、反応選択性を犠牲にすることで寛容な基質特異性を得ることができたと考えることができる。興味深いことに、CCR 酵素群は MDR (medium chain reductase) スーパーファミリーに属する酵素であり還元酵素から炭酸化能を獲得することで進化したと提唱されている^[31]。点変異により酵素の触媒反応の種類を制御した本結果は、自然界の進化メカニズムを実験的に再現していると捉えることも可能である。どのように二酸化炭素結合部位(N65, Y147, E158)が形成されるに至ったかは不明であるものの、還元酵素から炭酸化酵素への進化には活性中心への水分子の侵入を排除することが重要であると予想される。

AntE の反応選択性の変化は、酵素進化の観点からも興味を持たれる。CCR 酵素と AntE の系統樹解析を行う為、生化学的に活性が評価された CCR 酵素 (図中黒丸及び黒三角で表記) と、それらを鋳型とし NCBI での BLAST 検索で相同性スコアの高かった配列をまず収集した。これらのアミノ酸配列アライメントに基づき、ロバスタチン生合成経路で働く MDR 還元酵素 LovD をアウトグループに系統樹解析行なった結果、AntE は放線菌の二次代謝経路に多く存在する CCR の系統 (groupA) ではなく、一次代謝経路であるエチルマロニル CoA 経路中に存在する CCR 酵素に近い系統 (groupB) に位置した (図 2-22)。この経路はグラム陰性細菌のうち貧栄養条件で

生存する菌の多くに分布していることから、AntE は進化的に古い起源を有していると考えられることができる。一般に酵素が新しい触媒能を獲得する際には、万能型の間mediateを経てから新しい触媒能に特化した酵素になると提唱されており^[32]、AntE はまさに万能型中間体の性質を示している点は興味深い (図 2-23)。

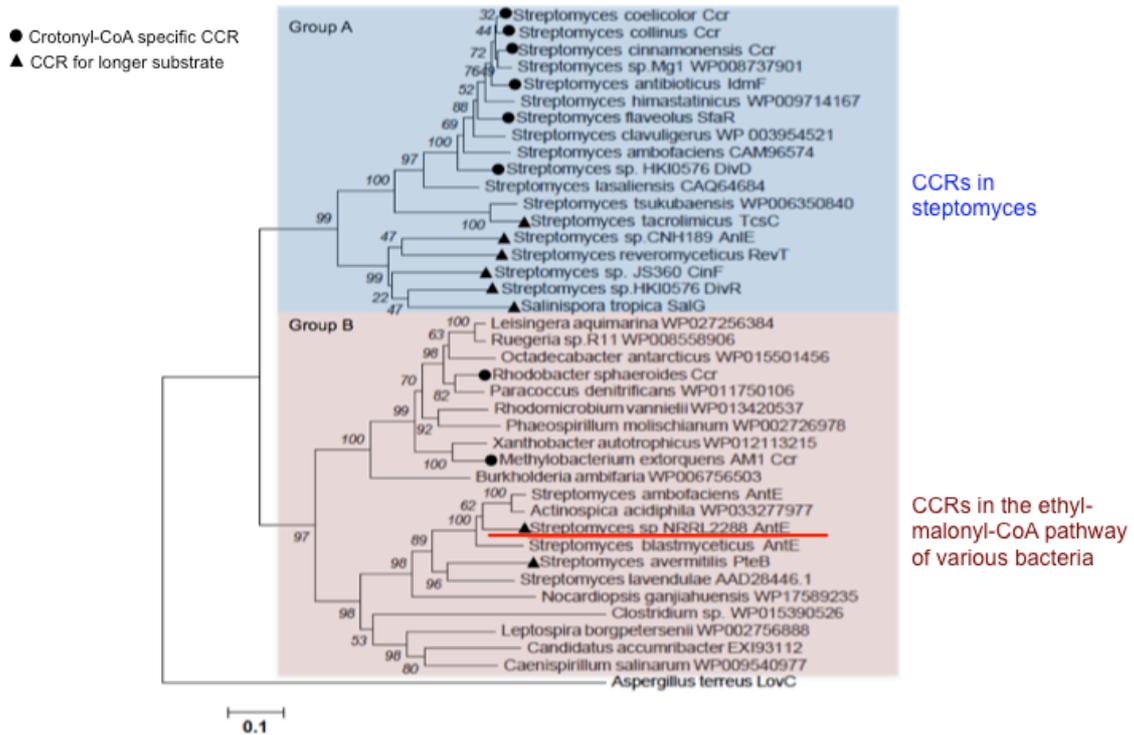


図 2-22 CCR の系統樹解析 AntE は赤線で表示

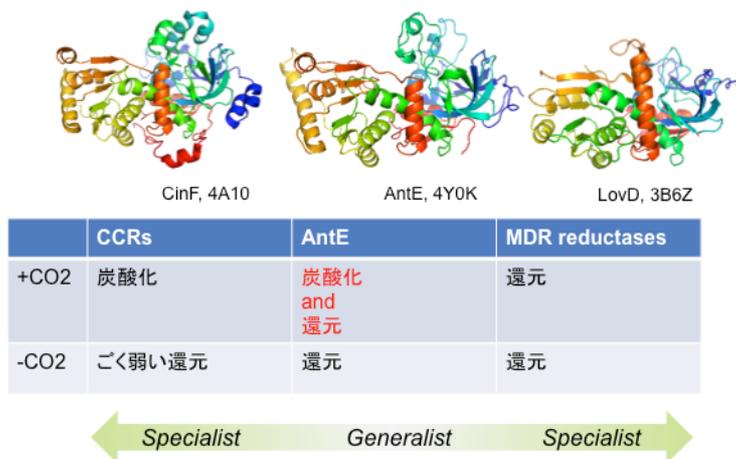


図 2-23 CinF、AntE、LovD の反応の違いの模式図

ここまでの第4節の結果をまとめる。本節では AntE 各変異体の触媒能力を動力的に評価し、酵素活性の違いを生み出す構造的基盤を分析した。さらに、触媒能力の変化に対して酵素進化の観点から議論を加えた。AntE の基質結合ポケットの形状を Val350 と Ala182 が定義しており、変異により形状が拡大または縮小されることで基質特異性が制御され、反応選択性に関しては Ala182 が水分子の侵入を制御していることが、酵素の機能変換の鍵となっていることが判明した。AntE の点変異による機能変換は酵素進化の観点からも興味深く、AntE が進化的に古い起源を持つ万能型酵素であり、水分子の活性中心からの排除が CCR における炭酸化能の獲得に重要であることが示唆された。

第 5 節 AntE を用いた新規 antimycin の生産

AntE は様々な α,β -不飽和 CoA 基質を炭酸化可能でありこれまで非天然基質の培地添加によりアンチマイシンの C7 位側鎖の構造多様性を生み出せることがわかっていたが¹²⁹⁾、AntE V350G はインドール置換基を有する α,β -不飽和 CoA のような極めて嵩高い基質も炭酸化可能であり、その触媒能力を生かした非天然アンチマイシンの生産を試みた。また、アンチマイシンは発酵生産により試薬として供給されるがアルキル側鎖の構造異性体混合物として販売されており C7 位と C8 位の多様性が分離精製を妨げている。AntE A182L を導入することで C7 位の多様性を減少した純度の高いアンチマイシンが生産できると考えられたため、A182L のアンチマイシン生産への利用を試みた。

これまでに中国科学院劉文研究室で構築された放線菌 *Streptomyces* sp.NRRL2288 $\Delta antBE$ 株に AntE A182L または V350G と CoA-ligase である LE4CL¹³³⁾を同時に導入した (図 2-24)。pTYM19ep ベクターに *ermE* プロモーターを先頭に加えた両遺伝子をクローニングし、二遺伝子共発現系を構築した。pTYM19ep/AntEV350G-LE4CL は大腸菌 *E.coli* S17-1 による接合伝達で上記放線菌に導入し、形質転換株を apramycin 耐性により選択、発酵生産を行った。*Streptomyces* sp.NRRL2288 $\Delta antBE:: antE V350G-LE4CL$ を A3M 培地で 3 日培養の後、クロロホルム:メタノール=1:1 溶媒で遠心菌体を抽出、減圧蒸留残渣をメタノールに溶解し、HPLC 分析を行った。

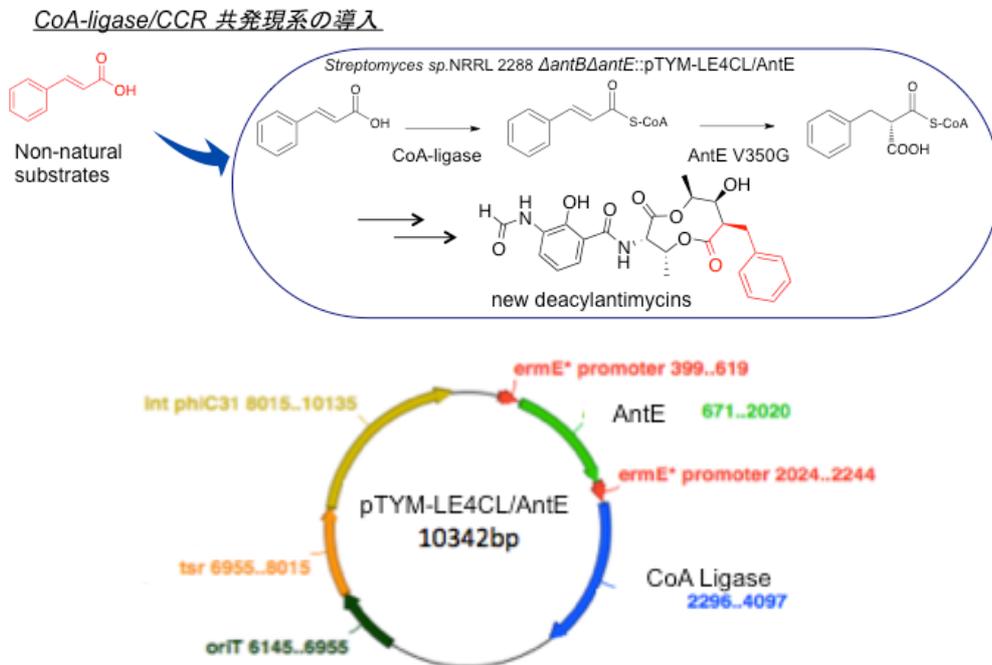


図 2-24 上)AntE と CoA-ligase の共発現株への投与実験の模式図

下) 発現ベクターマップ

C₁₈逆層カラムを用いた HPLC 分析の結果を図 2-25 に示す。対照群として用いた *Streptomyces* sp.NRRL2288 $\Delta antB$ (野生型 AntE を保持、C8 位アシル基転移酵素 AntB を欠損、 $\Delta antB$ と表記) と *Streptomyces* sp.NRRL2288 $\Delta antBE$ ($\Delta antBE$ と表記)では、 $\Delta antB$ 株は天然に見られるアンチマイシンの多様性に相当する deacylantimycin 5 種の産生が確認された一方、 $\Delta antBE$ 株では antE 欠損のため PKS の伸長基質が供給されないため、deacylantimycin 類は生産されなかった。A182L を導入した株では図中化合物 **5** (0.5 mg/L)が選択的に産生した。V350G を導入した株では長鎖アルキル基を持つ deacylantimycin の産生割合が増加し、分岐アルキル鎖を持つ urauchimycin A (**10**, 0.7 mg/L) の産生が確認された。これらの結果は AntE によって供給される PKS 伸長基質プールの構成がアンチマイシンの構造多様性の由来となっていることを示唆し、伸長基質供給の鍵酵素 AntE の機能変換によって PKS 産物の構造多様性を合理的に制御したことを示している。従って A182L は純度の高いアンチマイシンを供給する産業株として有用であることが期待される。

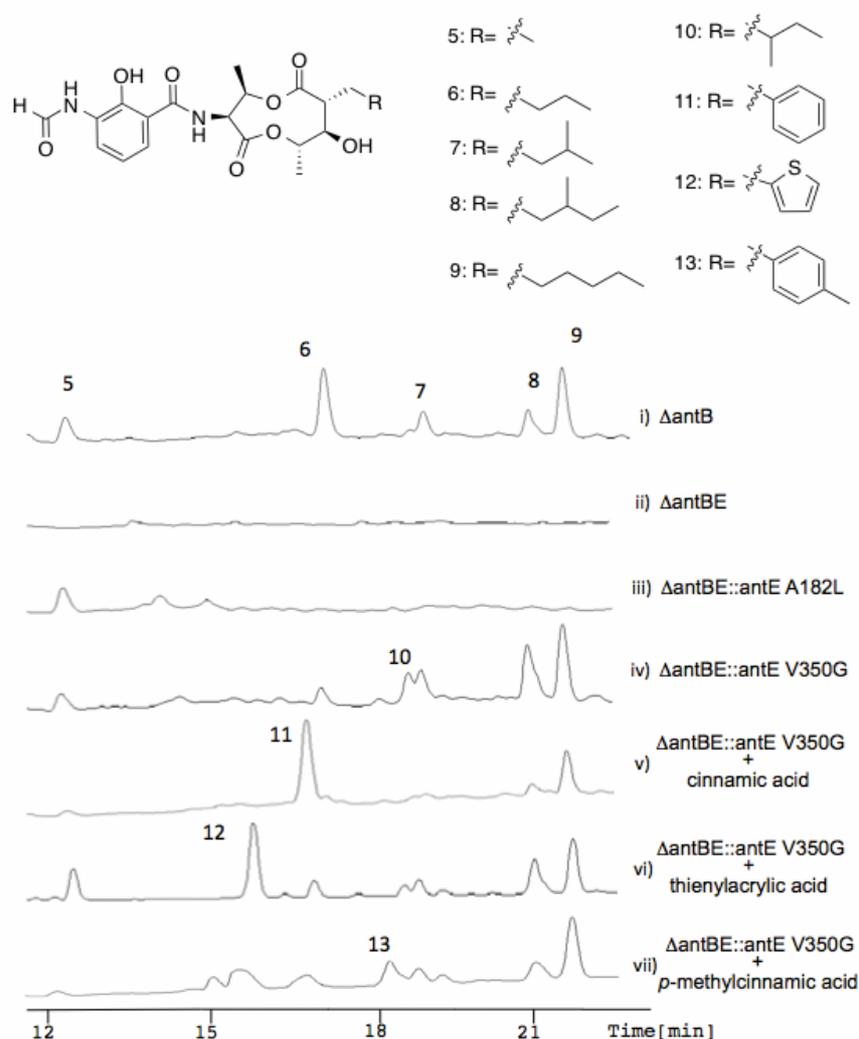


図 2-25 *In vivo* 発酵生産の HPLC 分析

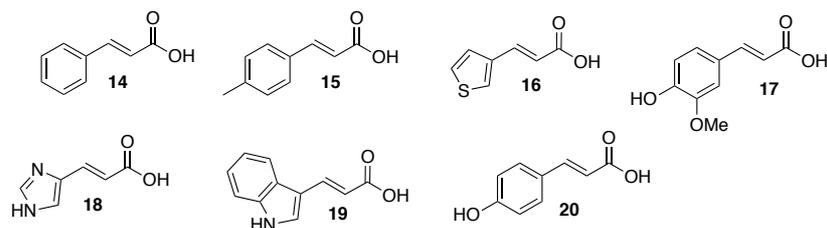


図 2-26 培地添加に用いられた基質の構造

次に、AntE V350G を用いたさらなる構造拡張のため、図 2-26 に示す基質の培地添加を行った。V350G はインドール置換基質を受け入れるが、このような基質は当生産菌の代謝経路からは供給されないため、外部からの投与が必要である。A3M 培地で培養 24 時間後に下図各種基質を終濃度 1 mM となるように投与し、さらに 48 時間の培養後、同様に抽出し分析を行った。その結果、化合物 **14-16** の投与から splenocin J (**11**)と新規 deacylantimycin (**12**; 4.7 mg/L, **13**; 1.1 mg/L) の生産が確認された。化合物 **17-20** の投与では対応する deacylantimycin の生産は確認されなかった。これらの結果は、ポリケタイド化合物に置換基を有する芳香環及びヘテロ環を伸長基質として用いた初めての報告であり、変異体 AntE を用いたアンチマイシンの構造多様性の拡張に成功した。化合物 **17-20** の投与による新規 deacylantimycin の産生が見られなかった原因として、PKS の基質特異性により排除されたことや、投与化合物が細胞内で早い代謝を受けたことなどが考えられる。

一般に PKS はその種類や type によらず触媒する縮合反応において脱炭酸を伴う Claisen 縮合を用いる。従って AntE が供給できる非天然型の置換マロニル CoA は理論上全ての PKS に応用可能な、普遍的な伸長基質供給酵素であると言える。AntE V350G を用いた生合成の合理的再設計により、例えばインドールを PKS 骨格側鎖に持つポリケタイド-アルカロイドハイブリッド化合物などの人為的な創出に応用可能であることが期待される。

第6節 小括

本研究では、antimycin の生合成における伸長基質供給酵素 AntE に着目し、その構造解析と構造に基づく合理的機能改変、さらに改変酵素を用いた antimycin の物質生産を行った。始めに AntE の構造解析においては分解能 2.2 Å(WT)及び 1.7 Å (V350A)の結晶構造に基づき、A121 や A182 などの残基により基質結合ポケットの大きさが確保されており、寛容な基質特異性をもたらしていることが示唆された。また、点変異の導入により A182 については基質特異性を制御するのみならず、反応選択性まで制御している残基であることが判明した。A182G は還元選択的な、A182L は炭酸化選択的な酵素となり、同一の酵素が点変異により二種類の反応を使い分けられるという興味深い結果を得た。A182L は基質特異性が厳しくなっており、それぞれの酵素は代謝経路で選択的な反応を導入したい時に活用可能である。また、V350 に対する変異導入により、基質特異性をさらに拡張しインドール置換 α,β -不飽和 CoA をも受け入れる変異体の創出に成功した。野生型 AntE にはない触媒能を獲得した V350G 変異体は、例えばインドールをポリケタイド骨格に導入したポリケタイド-アルカロイド複合化合物といった、新たな天然物様骨格化合物を創出することに応用できると期待される。最後に、実際に A182L や V350G 変異体酵素を放線菌に導入し発酵生産を行うことで、選択的な deacylantimycin の生産や新規 deacylantimycin の生産を達成した。antimycin の生合成経路はポリケタイド化合物の中で唯一芳香環（ベンジル基）を持つ伸長基質が用いられる例であるが、基質の投与を通じて置換芳香環やヘテロ環を持つ伸長基質によるポリケタイドの創生に成功した初の報告となった。ポリケタイドの構成単位を大幅に拡張できる AntE は、PKS が Claisen 縮合を普遍的に用いることから、原理的にすべての PKS に応用可能であり、非天然型の伸長基質を供給できる酵素として合成生物学の新たなパーツとなることが期待される。

第3章 アミノポリオールを産生する I 型 PKS の機能解析

第1節 緒論

ポリケタイドはマクロライド系抗生物質やテトラサイクリン系抗生物質など数多くの医薬品が属する天然物群であり、天然においてはポリケタイド合成酵素 (PKS) により生合成される。序論で簡潔に言及したように、ポリケタイド合成酵素はその構成の違いにより、一つのポリペプチド鎖上に複数の触媒ドメインが連なった、一つの酵素が伸長反応と β -ケト基の還元を触媒できる I 型 PKS (Type 1 PKS, エリスロマイシンやアムホテリシン B、FK506 など比較的分子量の大きな化合物を主に産生)、複数の触媒ドメインがそれぞれ独立した酵素として存在し共同して伸長反応と還元反応を制御する II 型 PKS (Type 2 PKS, テトラサイクリンなど多環性芳香族化合物を主に産生)、そして一つの酵素が伸長反応のみを触媒する III 型 PKS (Type 3 PKS, フラボノイドなどを主に産生)に分けることができる^[6a]。I 型 PKS はさらに、触媒ドメインが複数の酵素にわたり多数連なり、各ドメインは単回の伸長反応にしか用いられない「モジュール型」のものと、一つの酵素上の触媒ドメインが伸長反応を複数回担う「繰り返し型」に分かれるが、本章ではモジュール型の I 型 PKS に焦点を当て、その機能解析を行った。

モジュール型 I 型 PKS は各触媒ドメインが一度しか利用されず、ドメインの並ぶ順に反応が進行するため、モジュール構成の配列を読むことで生成産物の化学構造を予想することができる。また、多数の伸長反応を経て生合成される化合物の場合はドメインの数もそれに対応して増えるため、しばしば数十 kbp を超える巨大な遺伝子群を伴う。これらの特徴により、モジュール型 I 型 PKS は遺伝子の同定と産生化合物の予想が容易であるため、しばしばゲノムマイニングの対象にされてきた。ゲノムマイニングとは生物のゲノム情報を分析し、その中から有用化合物を産生する生合成遺伝子を探索することを指し、近年 DNA シークエンス技術が急速に発達したことから、生合成研究の強力な手法となっている^[34]。ゲノムマイニングにより発見された新規化合物の初期の代表例として、アミノポリオール化合物の ECO-02301 が挙げられる(図 3-1)。McAlpine らは 2005 年に、*Streptomyces aizunensis* NRRL B-11277 のゲノムより約 130kbp にわたる長大な PKS 遺伝子群を発見し本遺伝子が新規化合物を産生すると予想、実際に ECO-02301 を単離することに成功した^[35]。

モジュール型 I 型 PKS の遺伝子配列と化合物構造が対応するという特徴は、PKS の合理的機能改変にも有用であると考えられる。すなわち、ドメインの配列を自由にデザインすることで、欲しい化合物を産生する遺伝子が設計できることが期待される。ところが、PKS の伸長反

応の合理的改変は期待通りの結果をもたらすことができず、組み替えられた遺伝子はしばしば機能を失い、また目的化合物が得られた場合でもその産量は野生型の 100~1000 分の 1 以下と、実用に足るものではなかった。近年、配列類似性の高い二つの PKS 遺伝子のキメラを作成することにより本来の産物とは異なる化合物を得ることに成功した例はあるものの^[21]、PKS の機能改変は未だに方法論が確立されていない。組み替えにより効率的な PKS 遺伝子の再設計のためには、どの遺伝子領域で組み替えると酵素機能を損なわずにドメインを交換できるか、などの理論的な基盤が必要である。

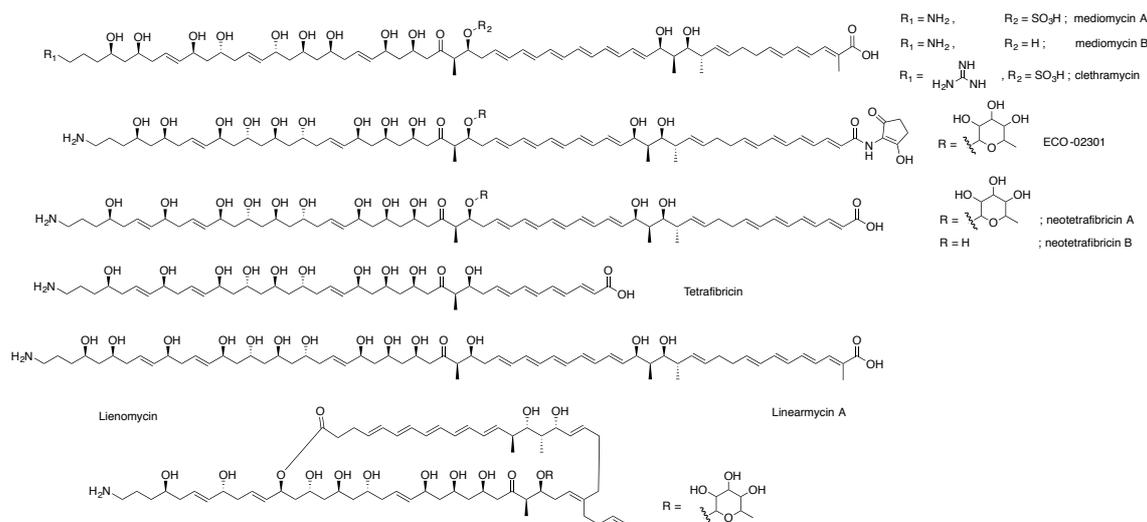


図 3-1 アミノポリオール化合物の構造

PKS 遺伝子は脂肪酸合成酵素(FAS)より進化し、遺伝子重複や遺伝子組み替えにより多様性を獲得したと提唱されている^[36]。しかし、具体的な組み替え領域や組み替え方法などは未知であり、PKS 改変の理論的基盤には至っていない。自然界で起こる進化メカニズムを理解できれば進化工学による PKS の改変が可能となる。これまでに *S. blastmyceticus* NBRC12747 株の antimycin 生合成遺伝子クラスターの下流に約 130kbp にわたる PKS 遺伝子群があり、その PKS がアミノポリオール化合物の mediomycin を産生することが同定されている(著者修士論文)。アミノポリオール類はアミノ基またはグアニジノ基を末端に、ポリオールとポリエン構造をその炭素骨格に有する化合物群^[37]であり、mediomycin^[38]や ECO-02301^[35]のほか clethramycin^[39], desertomycin^[40], tetrafrabricin^[41], linearmycin^[42], lienomycin^[43]など、様々な化合物が報告されている(図 3-1)。これら化合物はモジュール型 I 型 PKS から生合成されることが予想でき、また構造類似性が高いことから共通の祖先から進化したと考えられる。従って、これら化合物の生合成遺伝子を比較することで、自然界がいかにかモジュール型 PKS を再設計し構造多様性を生み出したかのメカニズムを解き明かすことができる。

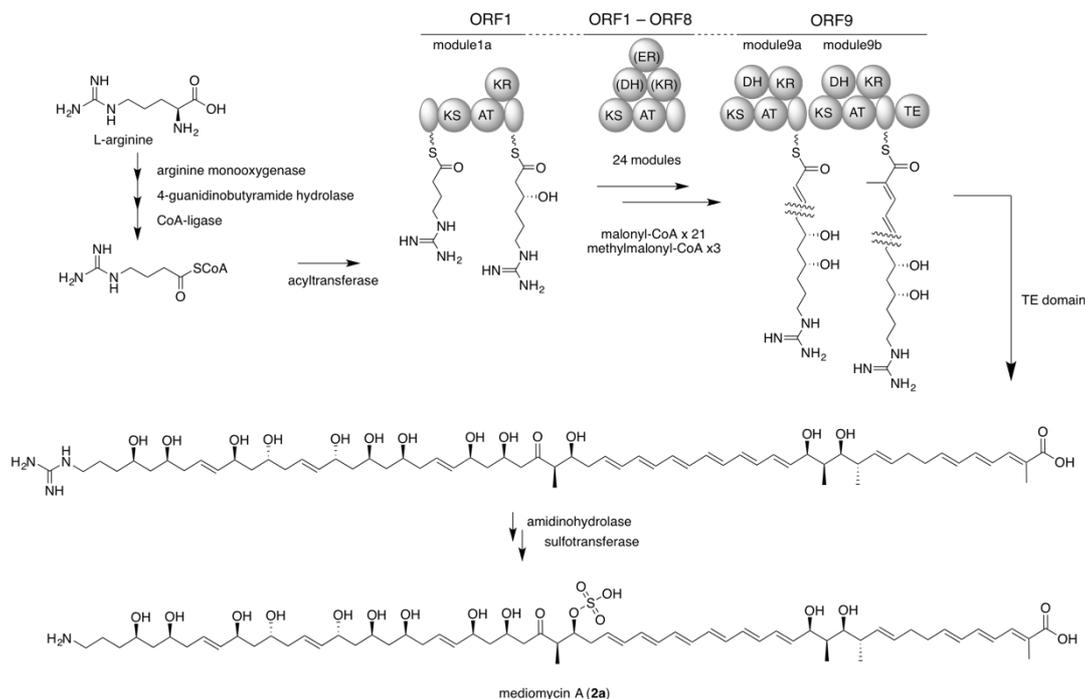


図 3-2 mediomycin の生合成経路

本章ではアミノポリオール類に着目し、その進化様式を遺伝子解析から解き明かすことで、PKS 機能改変に理論的基盤を与えようと試みた。第2節では tetrafibricin 生合成遺伝子の同定を述べ、第3節ではこれらモジュール型 I 型 PKS の配列比較と系統樹解析により、アミノポリオール類の構造多様性を生み出した遺伝子基盤の解明を述べる。また、第4節ではポリケタイドの修飾反応には珍しい硫酸化を触媒する酵素を mediomycin 生合成中より同定しその機能解析を行った。第5節ではこれら化合物の絶対立体配置について遺伝子配列に基づく立体配置の予想と分析化学的手法による立体配置の検証により絶対立体配置の決定を行った。これらの分析によりモジュール型 I 型 PKS の自然界での組み替えメカニズムと遺伝子産物の絶対立体配置を同定した。アミノポリオール PKS は、ケトンや水酸基、二重結合、飽和結合とポリケタイドの全ての要素を構成でき、多様な立体を作り分けるモジュールを含んでいる。また、様々な機能を持つにも関わらず互いに配列相同性が高いため、人為的な PKS 再設計の格好の遺伝子テンプレートとなることが期待される。

第2節 Tetrafibrin 生合成遺伝子の同定

Tetrafibrin は 1993 年に Kamiyama らにより *Streptomyces neyagawaensis* NR0577 より単離同定されたアミノポリオールであり、他のアミノポリオール類より炭素骨格が短いことが特徴である^[44]。従って、Mediomycin や ECO-02301 の PKS 遺伝子と比較することにより自然界がどのように炭素骨格を拡大させたか、つまりどのように遺伝子重複をすることで PKS のモジュールを増やしたか（またはどのように遺伝子を欠損させ、産生化合物を縮小させたか）への知見が得られると考えられた。そこで本株よりゲノム情報を取得し、tetrafibrin 生合成遺伝子の探索を行った。

始めに tetrafibrin の産生を確かめるため、*S. neyagawaensis* の発酵生産を行った。A3M 培地または TP 培地で 3 日培養後、菌体をクロロホルム:メタノール=1:2 で抽出、減圧蒸留残渣をメタノールに溶解し LC-MS にて分析した。その結果、tetrafibrin に相当する化合物は検出されなかったが、ペンタエン構造に特徴的な λ_{\max} =310, 330, 350 の UV 吸収を持つ $[M-H]^-$ =1227 または 1081 の二つの新規化合物 neotetrafibrin A および B を検出した (図 3-3)。培養上清は凍結乾燥後メタノールで抽出し同様に分析したが、tetrafibrin は検出できなかった。なお、文献記載の培地成分でも発酵生産を試みたが、tetrafibrin の産生は確認できなかった。Neotetrafibrin A/B はその分子量とペンタエン構造、および tetrafibrin の構造から分子構造が図のように推定され、その構造は大量培養後に単離された各化合物の 1D および 2D-NMR 解析により確認された。Tetrafibrin は 230 L の大量培養からフィブリノーゲン受容体阻害活性を指標とした分離により単離された微量化合物であり、その構造は neotetrafibrin の部分構造と完全に一致することから、neotetrafibrin 生合成経路の副生成物であると考えられる。

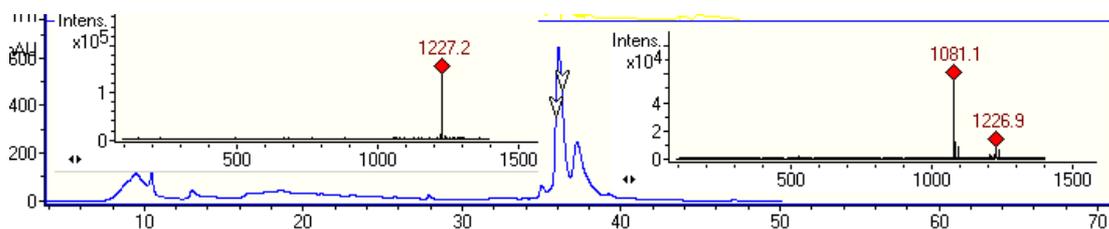


図 3-3 *S. neyagawaensis* の HPLC 分析

Tetrafibrin が neotetrafibrin 生合成経路より合成されることが考えられることで、アミノポリオール化合物の炭素骨格の大幅な短縮に関する遺伝的/進化的知見を得ることは出来ないと思われたが、neotetrafibrin と mediomycin および ECO-02301 を比較することで 3 化合物の構造多様性を生み出す遺伝子基盤を解き明かせることには変わりはない。そこで、次に *S. neyagawaensis* よりゲノム DNA を抽出し PKS 遺伝子配列の取得を行った。抽出したゲノム DNA を制限酵素処

理により断片化、アガロースゲル電気泳動で 400 bp~450 bp の断片を切り出し回収した。得られたゲノム DNA 断片は次世代シーケンサー Ion Torrent PGM 用のサンプル調整試薬を用い PCR により増幅され、精製後に同シーケンサーにより配列の取得を行った。得られたリード配列は平均 250 bp、リード数は約 300 万、およそ 750 Mbp の配列情報を取得した。放線菌は約 10 Mbp のゲノムサイズであり、比較すると 75x の深度となり、*de novo* 配列決定に必要とされる 30x を超える十分なリード配列の情報量を取得できた。これらのリード配列を Geneious platform を用いてアセンブリを行ったところ、GC-rich な放線菌ゲノムの性質と PKS のモジュール構造がもたらす繰り返し配列の影響により、PKS 領域の全長を取得することはできなかった。そこで、アセンブリされた PKS 部分配列をリード配列に照らし合わせ、また mediomycin と ECO-02301 の遺伝子配列を参考に手動アセンブリを行い PKS 配列を取得した。PKS は全長約 130 kbp、27 モジュールを含み mediomycin および ECO-02301 の PKS と高い配列類似性を示した。遺伝子配列上のモジュールの並び、および各ドメインの活性部位配列によるドメイン活性予測は NMR により決定された構造と一致したことから、本遺伝子は neotetrafibricin 生合成遺伝子(*tfb* クラスター)と同定した。

第3節 モジュール型 I 型 PKS の遺伝子配列解析

本節ではアミノポリオール類を生合成するモジュール型 I 型 PKS の配列比較と系統樹解析を述べる。産業総合研究所の新家一男先生らは保有する放線菌ゲノムデータベースより mediomycin、ECO-02301 および neotetrafabricin の PKS に極めて類似した PKS 遺伝子群を見出し、当該遺伝子クラスターを発現することで新規アミノポリオール neomediomycin B が産生されることを明らかとしていた。そこで、遺伝子配列を提供いただき neomediomycin B と合わせて4つの PKS 遺伝子クラスターの比較解析を行った。進化系統解析では Geneious Platform を用い、各ドメインごとにアミノ酸配列を用いて作成したアライメントを元に系統樹を作成した。なお Mediomycin (*med*)、ECO-02301 (*eco*)、neotetrafabricin (*tfb*)、および neomediomycin B (*nmd*) の4PKS 遺伝子クラスターの構成と対応する化合物構造は以下に示した(図 3-4)。まず、KS ドメインを用いた系統樹解析の結果について述べる。KS ドメインは PKS の縮合反応を担う中心ドメインであり、他のドメインに比べて配列保存性が高いことから、PKS を代表する配列として系統樹解析によく用いられている^[36c]。4 クラスターの KS ドメインと、他のポリケタイド生合成に関わる KS ドメインの配列を MUSCLE プログラムを用いてアライメントしたのち、近隣結合法を用いて系統樹を作成した結果、4 クラスターの KS ドメインは同じアミノポリオールである desertomycin (*des*) の KS ドメインやポリエンマクロライドの amphotericin B や Nystatin の KS ドメインと近い距離にあった (図 3-5)。また、4 クラスターの各 KS ドメインは互いに近い距離に位置したことから、共通の祖先から派生したと考えられた。

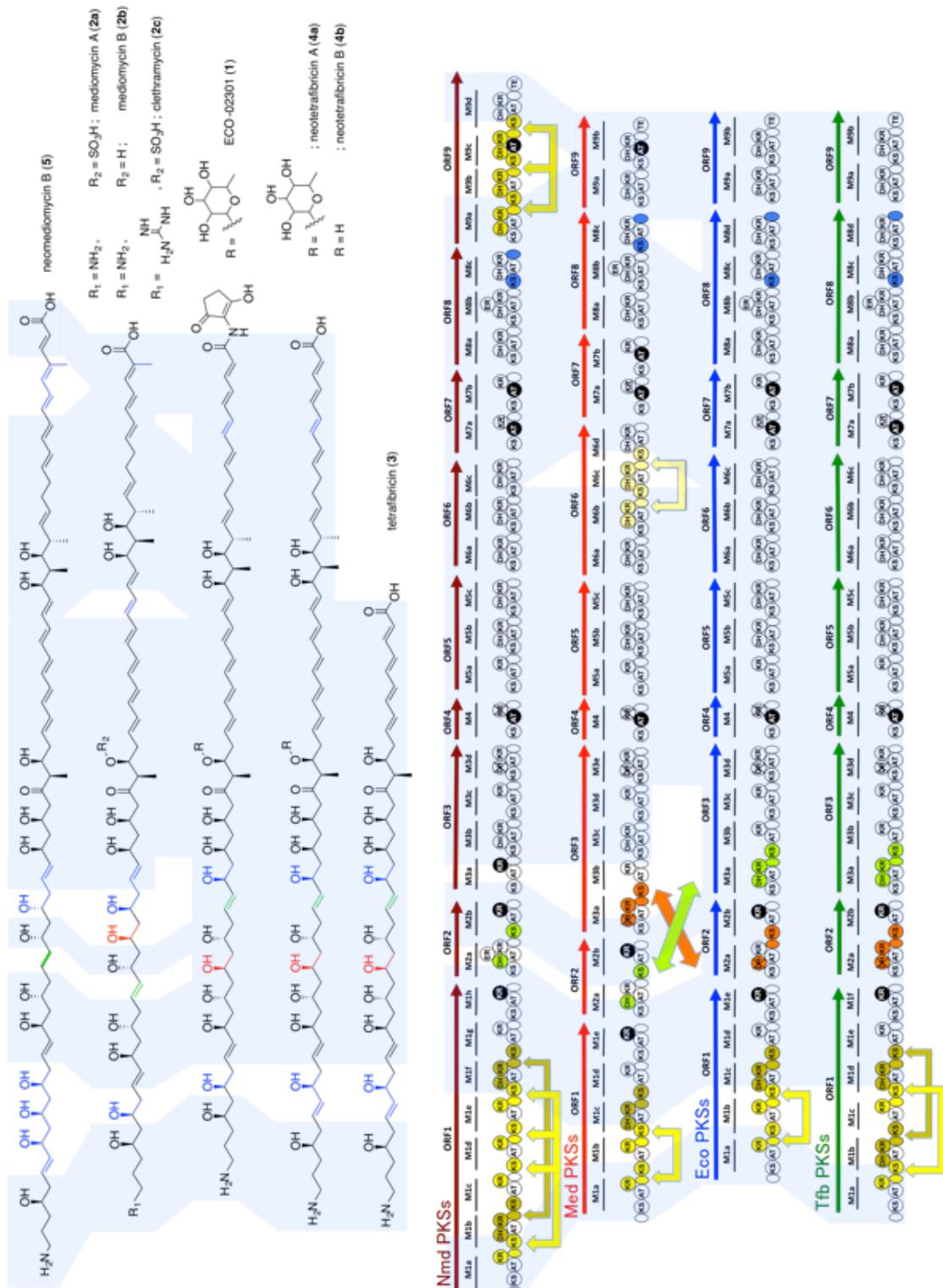


図 3-4 med, eco, tfb, nmd 4 クラスターの遺伝子と化合物比較

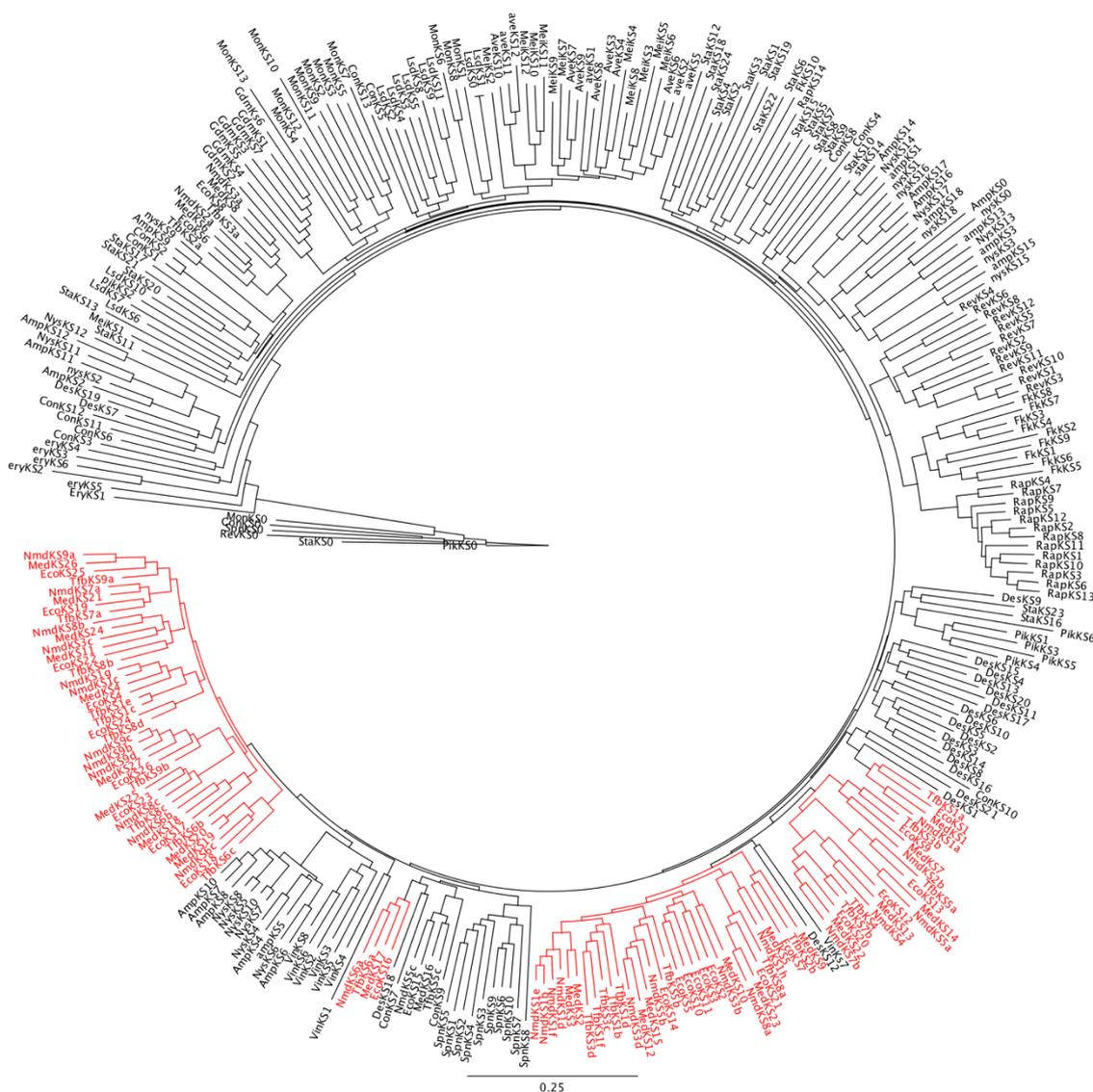


図 3-5 KS ドメインの系統樹解析 Nmd: neomediomycin; Med: mediomycin; Eco: ECO-02301; Tfb: neotetrafabricin; Amp: amphotericin; Nys: nystatin; Vin: vicenistatin; Spn: spinocin; Des: desertomycin; Pik: pikromycin; Rap: rapamycin; Fk: FK506; Rev: revelomycin; Sta: stambomycin; Ave: avermectin; Mei: meilingmycin; Con: concanamycin; Lsd: lasalocid; Mon: monensin; Gdm: geldanamycin; Ery: erythromycin.

次に、4 クラスターの KS ドメインに絞り、より統計的に信頼度の高い最尤法を用いて系統樹解析を行った。その結果、各クラスター間の対応するモジュール同士、例えば medKS5a、nmdKS5a、ecoKS5a、と tfbKS5a (クラスター名、ドメインの種類、ORF 数字番号、ORF 内でのアルファベット順を略記、図参照)がそれぞれ最も近い距離に観察された(図 3-6)。このような、4 クラスターの同じモジュール番号に相当する KS 同士が最も近い距離に現れる様子は多くの

KS で見られ、4 クラスター由来の KS が入り混ざるモザイク様の系統樹が形成された。このことは、これら 4 つのクラスターが別々に遺伝子重複を繰り返して形成されたのではなく、共通の一つの巨大 PKS が水平伝播されたことにより形成されたことを示唆している。一方で、対応するモジュール同士が同じ分枝上に位置しない KS も観察された。medKS2b と nmdKS2 は ecoKS3b と tfbKS3b と同一の分枝を形成し、反対に medKS3b は ecoKS2b と tfbKS2b と同一の分枝を形成した。これより、当該領域で遺伝子の相同組換えが発生し、順番の前後が入れ替わったことが示唆される。また、nmdKS1b,1d,1e,1f などに見られるように、同じクラスター内の KS 同士が非常に近い枝を形成する様子も認められ、これらは遺伝子の水平伝播が起こった後に、各クラスターで独自に遺伝子重複が進行したことを示唆している。また、KS の系統樹では基質の構造ごとに異なるクレードを形成し、特徴的なモチーフも見られた(図 3-6, 第 4 節参照)。

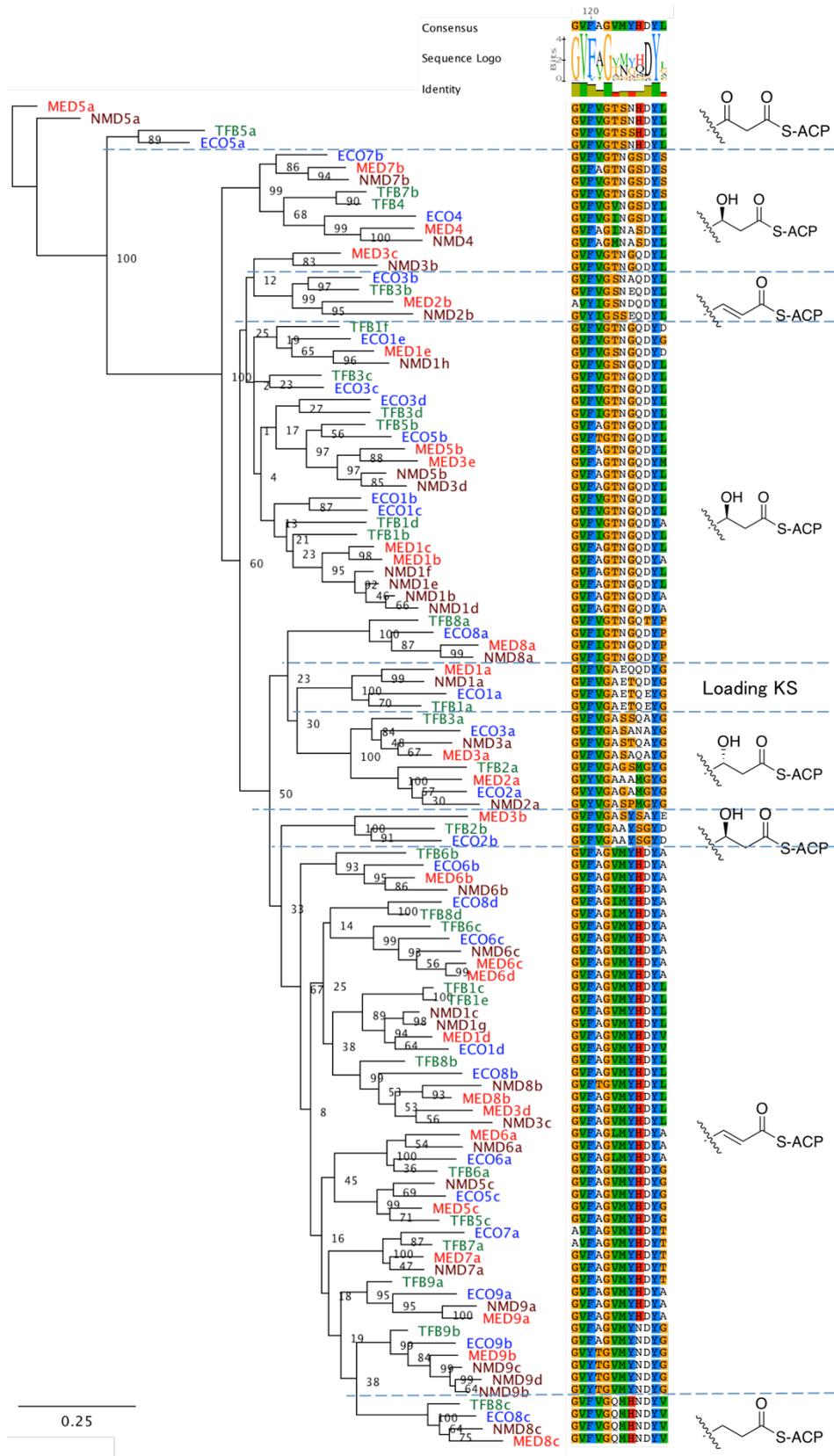
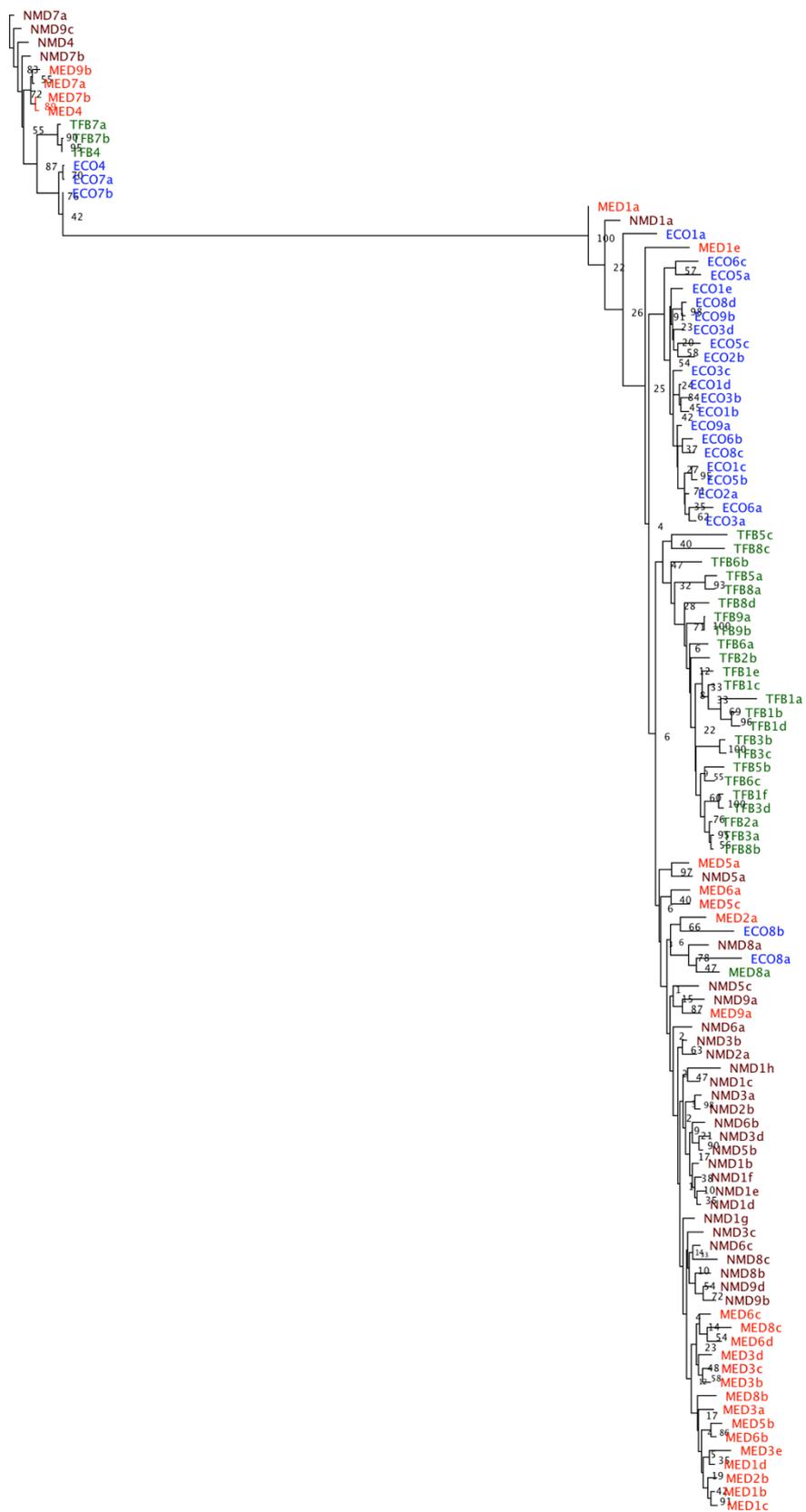


図 3-6 KS ドメインの系統樹解析とモチーフ配列 基質の構造を右に示した

AT ドメインの系統樹も同様に作成したところ、KS とは異なり、まずマロニル CoA 選択的 AT (図の上部のクレード) とメチルマロニル CoA 選択的 AT (図の下部大半を占めるクレード) に大きく分かれた後、クラスターごとに明確なクレードを形成した。すなわち AT ドメインは 4 つの株で共通の祖先を持つのではなく、各遺伝子クラスター独自に進化したと考えられる。KR ドメイン、DH ドメイン、ACP ドメインについても系統樹を作成した結果、これらは KS 同様にモザイク様の分枝を示し、クラスター間で対応するモジュール同士が一番近い距離に位置する様子が観察された。



0.25

図 3-7 AT ドメインの系統樹

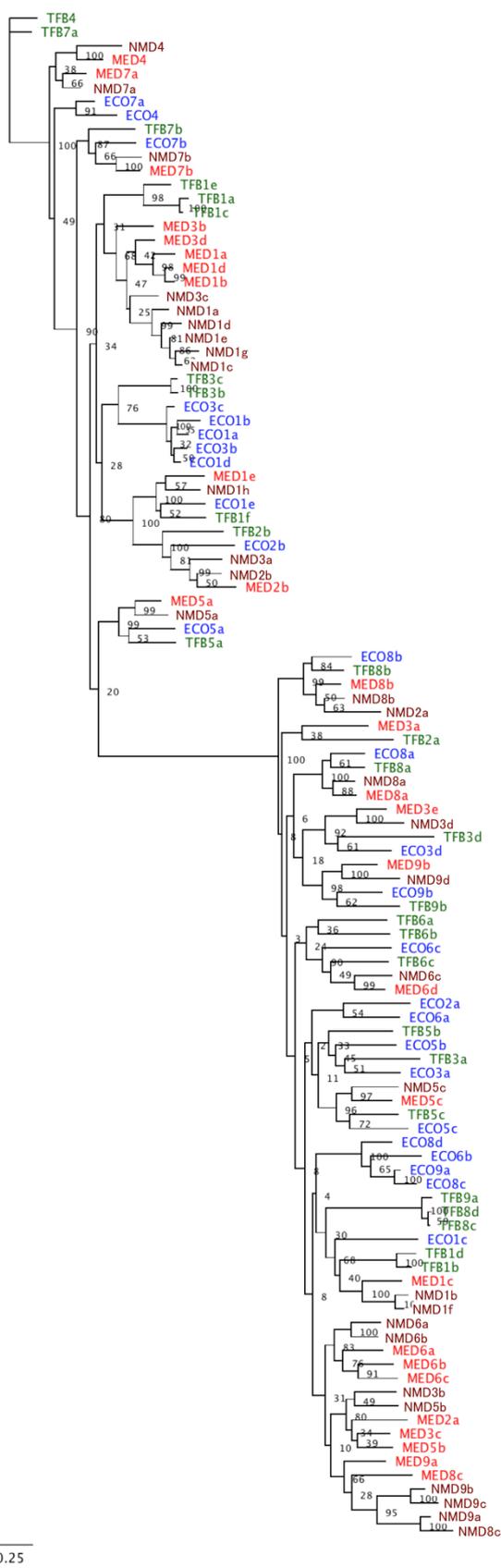
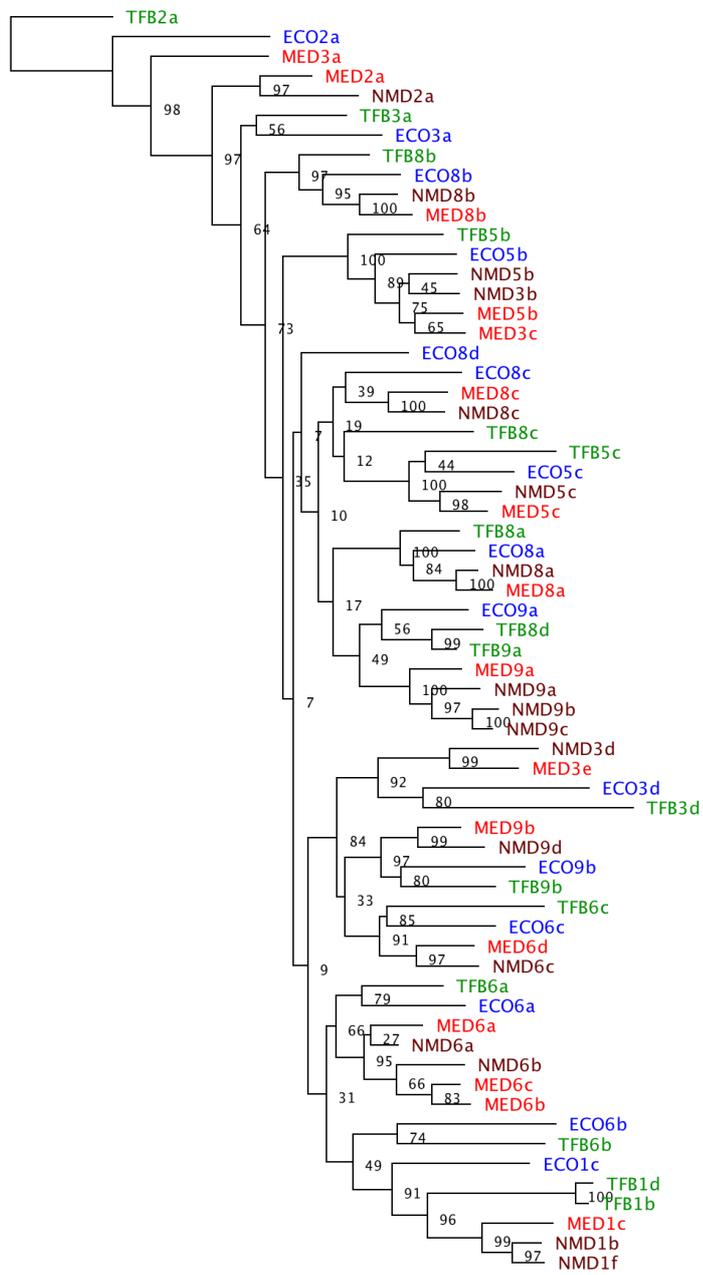


図 3-8 KR ドメインの系統樹



0.25

図 3-9 DH ドメインの系統樹

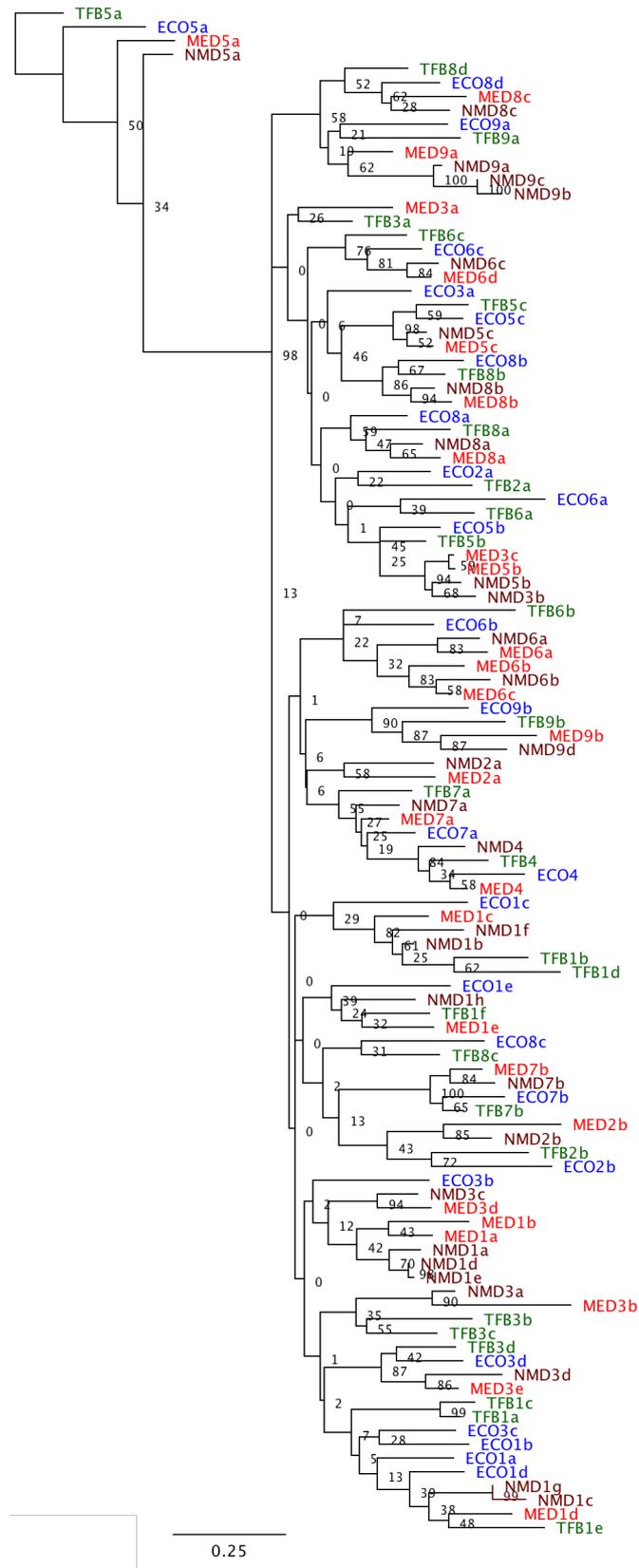


図 3-10 ACP ドメインの系統樹

KS ドメインや KR、DH、ACP ドメインの系統樹からは 4 クラスターが共通の祖先を有し水平伝播により拡散されたことを示唆している。しかし AT ドメインの系統樹では対照的に、*med* クラスターの AT は *medAT* 同士でクレードを形成、*eco*、*tfb*、*nmd* クラスターとは進化的に離れる結果となった。したがって、AT ドメインは共通の祖先を持たず、むしろ化合物内で独自の進化を経て形成されたと考えられる。AT ドメインの機能面を見れば、KS や KR など各モジュールで異なる基質を認識しているドメインとは異なり、AT ドメインはマロニル CoA (もしくはメチルマロニル CoA) を ACP にロードするという同一の機能を全てのモジュールで共通に担っている。それゆえ AT ドメイン同士の組換えは機能を損なう可能性が少なく、許容性が高いと考えられる。このような、相同性の高い配列がその配列内で均質化するように組み変わる進化は「協奏進化」と呼ばれる^[45]。PKS のエンジニアリングに関して、AT ドメインを他の PKS 由来の AT ドメインと交換しても PKS の機能は失われない例や^[46]、AT ドメインを省略しても化合物を産生する報告^[20a]があることから、AT ドメインは進化の自由度が高く、PKS 全体の水平伝播後に菌体内で何らかの選択圧がかかり AT のみ菌株内で独自の進化をした可能性は十分に考えられる。KR ドメインでも部分的に協奏進化が見られる(*medKR6a*, *6b*, *6c* など)一方、KS ではこうしたクラスター内での均質化は見られなかった。

各クラスターごとの系統樹解析の結果を統合すると、興味深い遺伝子組換えメカニズムが浮かび上がる。すなわち、KS ドメインはその上流のβ位修飾ドメイン(DH,ER,KR)と ACP と同調して遺伝子重複や遺伝子組み換えが起こることが示唆された (図 3-11)。各クラスターの ORF1 では遺伝子重複が観察されているが、例えば *medKR1a* は *medKR1b* と、*medACP1a* は *medACP1b* と、*medKS1b* は *medKS1c* と系統樹上で最も近い枝に位置し、配列相同性も 90%以上であり、水平伝播によりクラスターが分かれた後、最近になって遺伝子重複が起こったと考えられる (図中黄色の矢印)。KS の入れ替えが観察されたモジュール 2b と 3b の上流にあたるモジュール 2a と 3a のβ位修飾ドメインも同様の傾向が見られ、例えば *nmdDH2a* と *medDH2a* は *tfbDH3a* と *ecoDH3a* と最も近い枝に見られる。これらの遺伝子重複や遺伝子組換えは常に KS と上流のβ位修飾ドメインが同調しており、DH-ER-KR-ACP_n-KS_{n+1} の単位で PKS 組換えが起こることが示唆された。また、同様の KS と上流のβ-修飾ドメインがセットで組み変わる現象は *trans*-AT PKS の進化でも報告されており^[47]、PKS に普遍的なメカニズムであると考えられる。

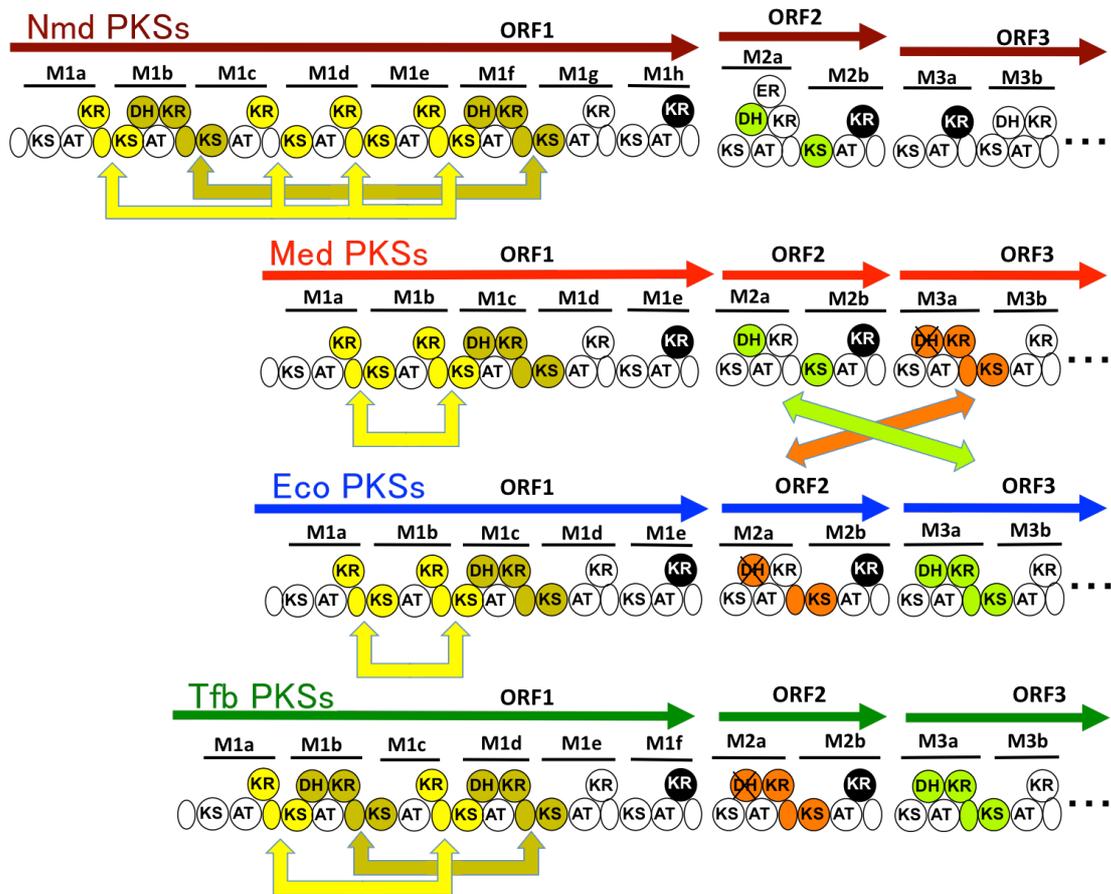


図 3-11 遺伝子組み替えメカニズム 同じ色のモジュールは配列相同性が高いことを表す

第4節 I型 PKS リデザインのための理論基盤

前節で見出された DH-ER-KR-ACP_n-KS_{n+1} の PKS 組換え単位は人為的な PKS 遺伝子の再設計にも有用であると考えられる。PKS の自由自在な再設計を可能にするため、さらなる理論基盤確立を目指しアミノポリオール4化合物の PKS 配列詳細な分析を行った。

始めに組換え単位の境界を調べた。4 クラスターの比較から DH の前もしくは KS の後ろの領域に組換えの発生する領域があることが予想されたため、KS-AT リンカー及び post-AT リンカー領域に着目し、配列アライメントを作成した (図 3-12, 3-13)。4 クラスターの ORF9 では medKS9b、ecoKS9b、tfbKS9b、nmdKS9b/9c/9d は全て配列相同性が高いが、同一モジュール内の AT ドメインはマロニル CoA を受け入れるもの (ecoAT9b、tfbAT9b、nmdAT9b/9d) とメチルマロニル CoA を受け入れるもの (medAT9b、nmdAT9c) とが見られる。マロニル CoA 選択的 AT とメチルマロニル CoA 選択的 AT は配列の特徴が大きく異なることが知られており、配列の比較が容易になる。アライメントの結果、post-AT リンカー領域の前半は AT ドメインの種類と強い配列の相関が見られ、post-AT リンカー領域の後半に AT ドメインの種類によらない保存領域が認められた (図)。この保存領域のすぐ後方は DH ドメインまたは KR ドメインに連絡しており、遺伝子組み換えのつなぎ目として用いられていることが示唆された。一方、KS-AT リンカー領域では特定の相関や保存領域を見出すことはできなかった。遺伝子の相同組換えには配列が保存された領域が必要だが、AT ドメインではタイプによって配列が異なるため、KS ドメインの末端まで遡った保存された GTNAH 領域が AT ドメイン前半の組換え箇所になり得ると考えられる。実際にこの GTNAH 領域と post-AT リンカーの保存領域を用いることで AT ドメインを実験的に入れ替えることに成功した報告があり¹⁴⁶⁾、配列分析により実験結果に対し進化的な観点から裏付けを与えることができた。

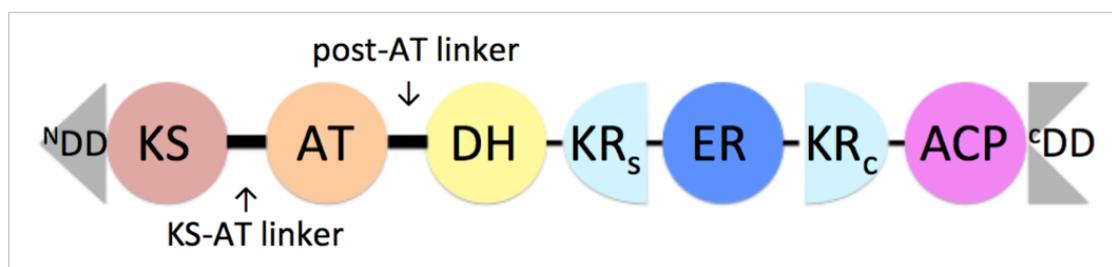


図 3-12 PKS のドメインとリンカーの模式図

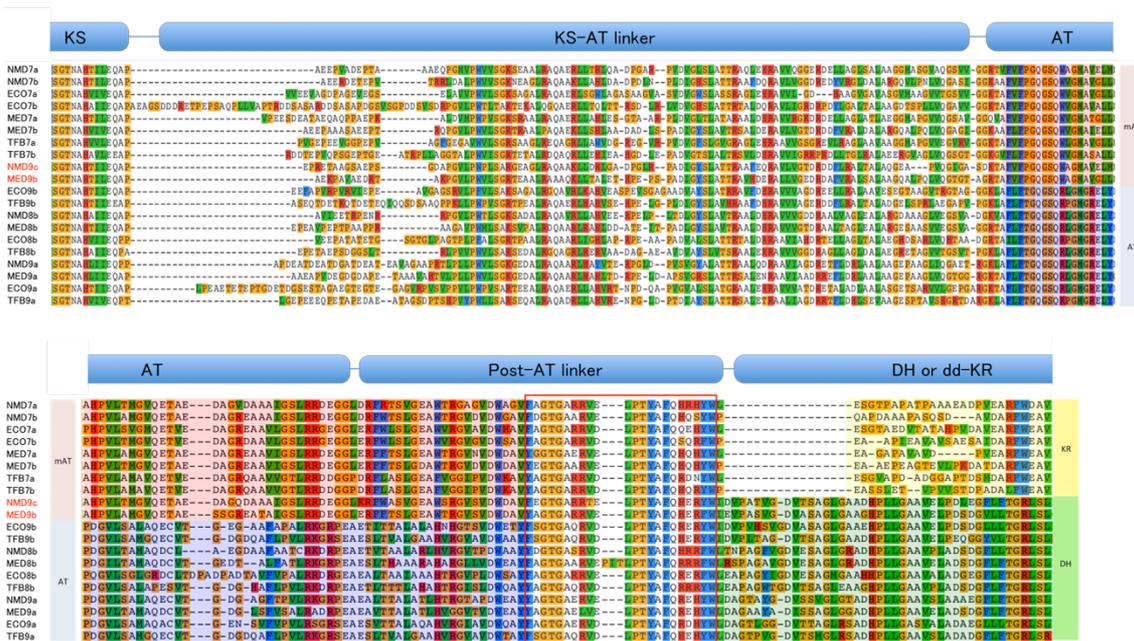


図 3-13 AT ドメイン前後のリンカー配列アライメント

次に KS ドメインの配列解析を行った。KS ドメインは配列の相同性が任意の 2 ドメイン間で平均 75%と他のドメインより高いが、系統樹解析において対応するモジュール間の分枝が最も厳密に観察され、すなわちその高い配列相同性にも関わらず協奏進化が最も少なかった（図 3-6）。そのため、配列の均質化を防ぐ機能上の選択圧があると予想できる。モジュール型 I 型 PKS の一種である *trans*-AT PKS（AT ドメインが PKS に存在せず、acyltransferase 酵素として単体で外部に存在する）では、KS ドメインは受け入れる基質化合物の構造によって異なるクレードを系統樹上で形成し、また配列の特徴から基質化合物の構造が予想できることが報告されている^[48]。アミノポリオール 4 クラスターの KS ドメインの系統樹解析の結果からも、基質化合物の構造によって異なるクレードを系統樹上で形成していることが判明した。また、配列上に基質構造と対応する特徴があることを見出し、TNGQ モチーフの場合 β -D-hydroxyl 基質を、VMYH モチーフの場合 α,β -olefin 基質を受け入れる強い相関が見られた。アミノポリオール類の PKS が属する *cis*-AT PKS（AT ドメインが PKS 内に存在する）ではこれまでこうした報告はなく、KS ドメインの配列機能相関の理解を深める結果を得た。なお、erythromycin 生合成に関わる PKS において該当する領域である Ala154（TNGQ/VMYH の N/M に相当するアミノ酸）を Trp に変異させることで KS の基質特異性が変化することが報告されており^[49]、本領域の基質認識に対する重要性を実験的に示しているものと考えられる。

KS ドメインの配列が基質の β -位の構造と相関していること、及びその基質構造は上流の β -修飾ドメインが産生していることを合わせて考えれば、KS ドメインが上流の修飾ドメインとセットとなり遺伝子組み換えが起こることは極めて合理的であると考えられる。このような遺伝子組み換えでは KS の基質特異性により異なる構造の基質を排除してしまうエラーを防ぐことができる。一方でこのような組み替えは KS と下流のドメインとの繋がりを切ってしまう。KS の系統樹解析の結果から下流のドメインとの相関は確認されず、medKS9b/nmdKS9c と ecoKS9b/tfbKS9b は最も近い分枝に位置し配列相同性が極めて高いにも関わらず異なる伸長基質（マロニル CoA またはメチルマロニル CoA）を用いることから、KS ドメインは上流から受け渡される基質は厳しく認識するものの、伸長基質の側は基質認識が寛容であることが示唆される。KS ドメインの伸長基質への寛容性は単一のモジュールを用いた生化学的な酵素アッセイでもしばしば見られたが^{50]}、伸長反応自体が問題なく進行しても下流の KS が非天然基質を拒絶してしまい、目的最終化合物が得られないことがこれまでの PKS エンジニアリングの問題点であったと予想される。medKS9b は最終モジュールであり、下流に次の KS が存在しないため伸長基質の改変が受け入れられやすいと考えられ、したがって、モジュール型 PKS の最終モジュールでの伸長基質改変は中途モジュールでの改変よりも成功しやすいことが示唆される。また、medKS3d と medKS8d が非常に近接した分枝に見られ配列相同性が90%以上であるにも関わらず、その基質は β 位の官能基は同じであるものの長さは20炭素以上異なることから、KS は基質の長さよりも $(\alpha,)\beta$ 位の構造をより認識していると考えられる。アミノポリオールのような長大な化合物のすべてが酵素の結合ポケットに収まるとは考えられず、したがって反応点に近い部位のみを認識していると考えの方が合理的である。

第5節 アミノポリオール類の絶対立体配置の決定

Mediomycin A の立体配置については NMR データベースを活用した相対立体配置のみが部分的に決定されており、未だ全不斉中心の絶対立体配置決定には至っていない。アミノポリオール化合物は巨大な分子に二重結合で分断された 1,3 ジオール構造が並び、メチル基の立体も伴い絶対立体配置の完全な決定は多大な労力を要し困難である。PKS の配列情報から化合物の立体情報を得ることができれば、アミノポリオール類の絶対立体配置の決定が容易となる。そこで本節では、これまでに提唱されている配列モチーフに基づく絶対立体配置の推定と分析化学的手法による検証を行った。

はじめに、既知の PKS 配列モチーフの分析に基づいた、全ての sp^3 立体中心に関する絶対立体配置の予測を行った。KR ドメインは β -ケト基を還元すると同時に α -メチル基の立体も制御していることが知られており、その配列の特徴から A type (L- β -hydroxy を形成)と B type (D- β -hydroxy を形成)に分けられ、さらに α -メチル基の立体によって A1/A2、B1/B2 と区別される^[51](図 3-14)。配列分析の結果、まず各 KR4 は活性残基の Tyr が Gln に変異していることから不活性 KR であることが分かった。各 KR7a は B2 type の配列的特徴を、nmdKR1h/2b/3a、medKR1e/2b、ecoKR1e/2b、tfbKR1f/2b は A1 type の配列的特徴を、そして残りの KR は B1 type の配列的特徴を有していた。これらの情報に基づき、4 化合物の絶対立体配置を以下のように予測した。(図 3-15、3-16)

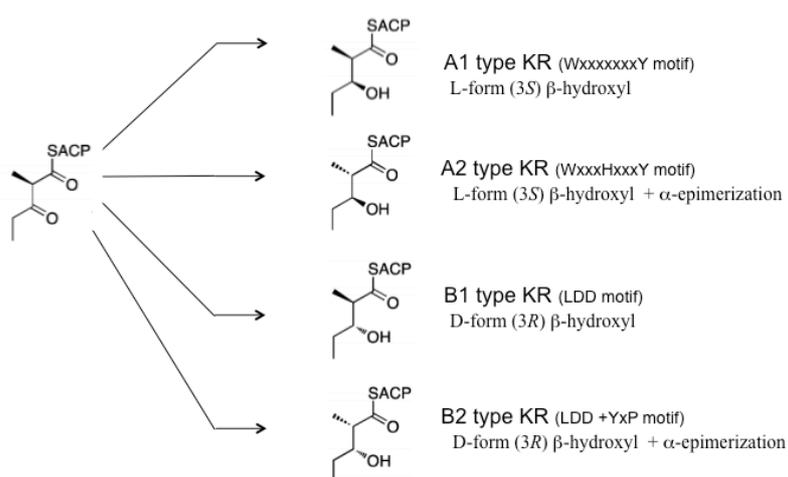


図 3-14 KR ドメインの配列による立体予測

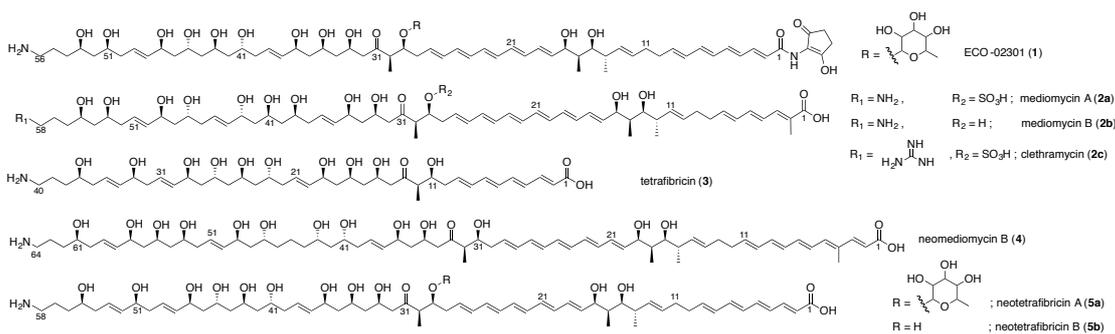


図 3-15 アミノポリオール類の絶対立体配置予測

motifs: LDD...WxxxxHxxYxP	motifs: LDD...WxxxxHxxYxP	motifs: LDD...WxxxxHxxYxP	motifs: LDD...WxxxxHxxYxP
NMD1a	MED1a	ECO1a	TFB1a
NMD1b	MED1b	ECO1b	TFB1b
NMD1c	MED1c	ECO1c	TFB1c
NMD1d	MED1d	ECO1d	TFB1d
NMD1e	MED1e	ECO1e	TFB1e
NMD1f	MED2a	ECO2a	TFB1f
NMD1g	MED2b	ECO2b	TFB2a
NMD1h	MED3a	ECO3a	TFB2b
NMD2a	MED3b	ECO3b	TFB3a
NMD2b	MED3c	ECO3c	TFB3b
NMD3a	MED3d	ECO3d	TFB3c
NMD3b	MED3e	ECO4	TFB3d
NMD3c	MED4	ECO5a	TFB4
NMD3d	MED5a	ECO5b	TFB5a
NMD4	MED5b	ECO5c	TFB5b
NMD5a	MED5c	ECO6a	TFB5c
NMD5b	MED6a	ECO6b	TFB6a
NMD5c	MED6b	ECO6c	TFB6b
NMD6a	MED6c	ECO7a	TFB6c
NMD6b	MED6d	ECO7b	TFB7a
NMD6c	MED7a	ECO8a	TFB7b
NMD7a	MED7b	ECO8b	TFB8a
NMD7b	MED8a	ECO8c	TFB8b
NMD8a	MED8b	ECO8d	TFB8c
NMD8b	MED8c	ECO9a	TFB8d
NMD8c	MED9a	ECO9b	TFB9a
NMD9a	MED9b		TFB9b
NMD9b			
NMD9c			
NMD9d			

図 3-16 KR ドメインのモチーフ配列アライメント

次に、配列に基づく立体予測を各種方法を用いて検証した。まず、neotetrafibricin の部分構造は tetrafibricin と一致するが、tetrafibricin は岸らによる Universal NMR Database^[52]や全合成によりその絶対立体配置が決定されている^[53]。遺伝子配列より予測した neotetrafibricin の立体配置は tetrafibricin のものと全て一致していた。また、neotetrafibricin を単離し測定した NMR スペクトルより、Universal NMR Database を用いて決定した相対立体配置も、遺伝子配列により予測した立体配置と一致した(図 3-17)。Mediomycin も NMR スペクトルより Universal NMR Database を用いて相対立体配置が決定されているが^[38]、遺伝子配列より予測した立体配置はこれと矛盾なく一致していた。

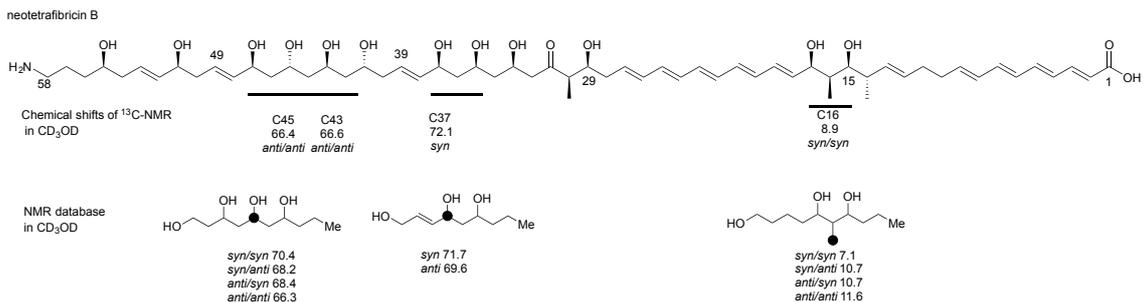


図 3-17 neotetrafrabricin の universal NMR database 分析

これらの分析は遺伝子配列に基づく立体予測の妥当性を裏付けるものであるが、さらにこれを確かめるべく、mediomycin 水酸基の絶対立体配置の Trost 法を用いた決定を試みた。*S.blastmyceticus* を TP 培地にて培養、菌体を $\text{MeOH}:\text{CHCl}_3=2:1$ で抽出、減圧蒸留ののち粗抽出物を LH20 カラムにより MeOH 溶媒を用い分離、Mediomycin A 含有フラクションを HPLC 精製することより mediomycin A を単離した。Mediomycin A 20 mg を -78°C にてオゾンを経過し、オゾン分解を試みたが、TLC 分析の結果、予想より多い断片が得られたため、mediomycin A が不安定であることが考えられた。そこで、mediomycin A の C-末端カルボン酸、N-末端アミンを保護しケトンの還元反応を行った。

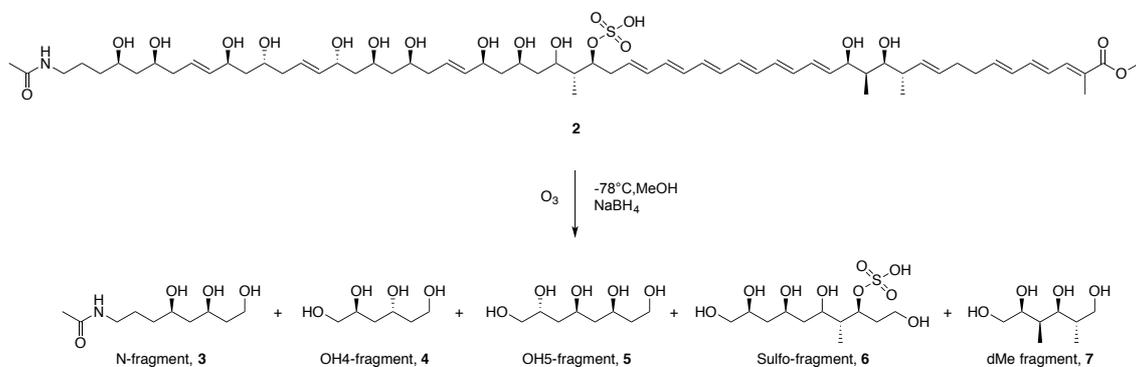


図 3-18 オゾン分解スキーム

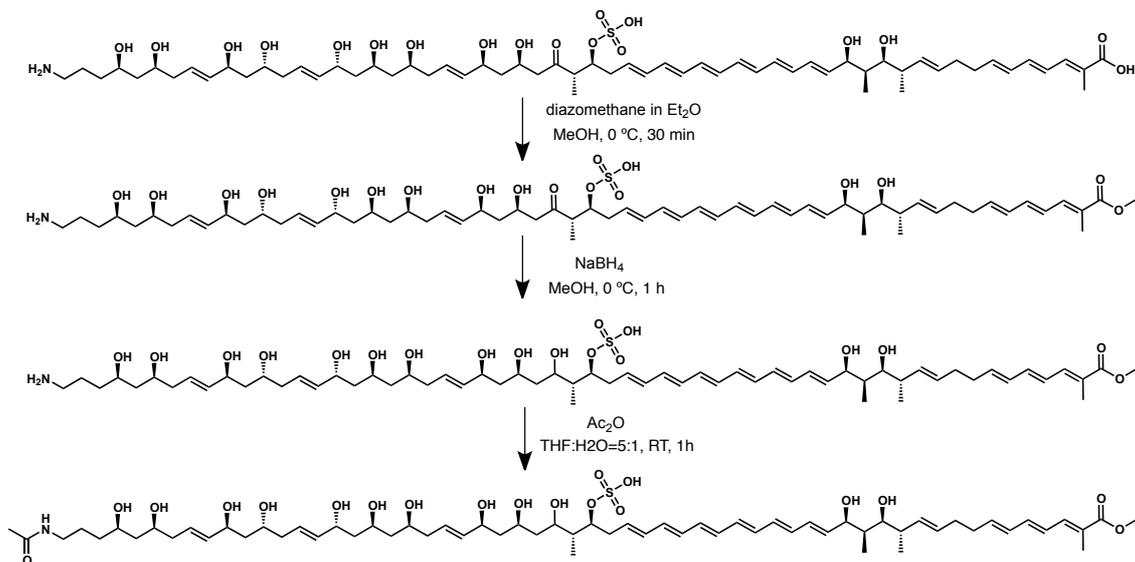


図 3-19 mediomycin の誘導体化反応

mediomycin A 50 mg を TMS-diazomethane による反応によりカルボン酸のメチル化体へ変換し、続いて Sodium borohydride を加え、ケトンの還元体を得た。続いて無水酢酸を加え N-アセチル化を行った。LC-MS による反応の確認の後(図 3-13)、HPLC 精製を行い、N-acetyl, 13-dihydropredominant mediomycin methylester (2)を 40 mg 得た。

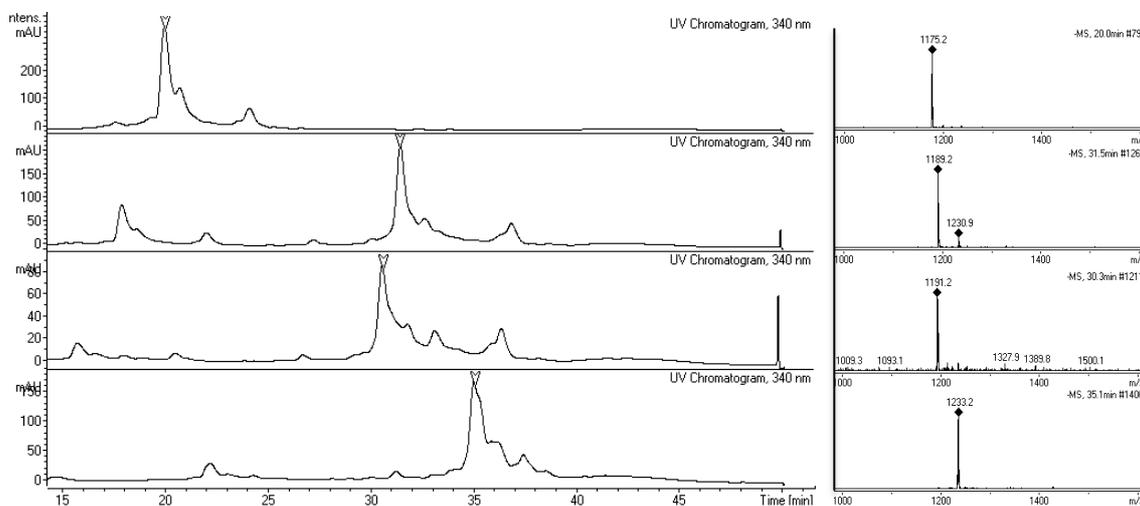


図 3-20 mediomycin 誘導体の LC-MS 分析

続いて N-acetyl,13-dihydropredominant mediomycin methylester 40 mg を MeOH 中-78 °C にて還元的オゾン分解を行った。反応液を減圧蒸留し 3 ml の CHCl_3 :MeOH = 95:5 に溶解、Silica カラムにて CHCl_3 :MeOH = 95:5 から 1:1 まで段階的に溶出し、各断片の取得を試みた。CAM(cerium ammonium molybdate)呈色試薬を用い CHCl_3 :MeOH = 9:1 で展開した TLC 検出の結果、 CHCl_3 :MeOH = 9:1 で diMe fragment (7)が、8:2 で N-fragment (3)が、6:4 で OH4 fragment (4)と OH5 fragment (5)がそれぞれ

れ得られた (収量 **3**: 5.2 mg, **4**: 2.1 mg, **5**: 3.8 mg, **7**: 2.7 mg)。なお、硫酸が含まれる中央のフラグメントは TLC 検出することができなかった。

次に得られた *N*-acetyl fragment をアセトナイド化することで相対立体配置の決定を試みた。*N*-acetyl 断片(**3**) 8.6 mg をアセトン 5 mL に溶解し 2,2-dimethoxypropane (DMP, 50 μ L) と pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS, 2.0 mg)を加え室温で 30 分攪拌、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、 CHCl_3 :MeOH = 98:2 の前半フラクションに化合物 **8**、後半フラクションに化合物 **9** をそれぞれシングルスポットで得た。 $^1\text{H-NMR}$ 、COSY により構造決定の結果を図に示す。化合物 **8** について、NOE 測定を行った結果、NOE 相関が観測されたことから、C53-C55 の相対立体を *syn* と決定した (炭素番号は図 3-15 を参照)。

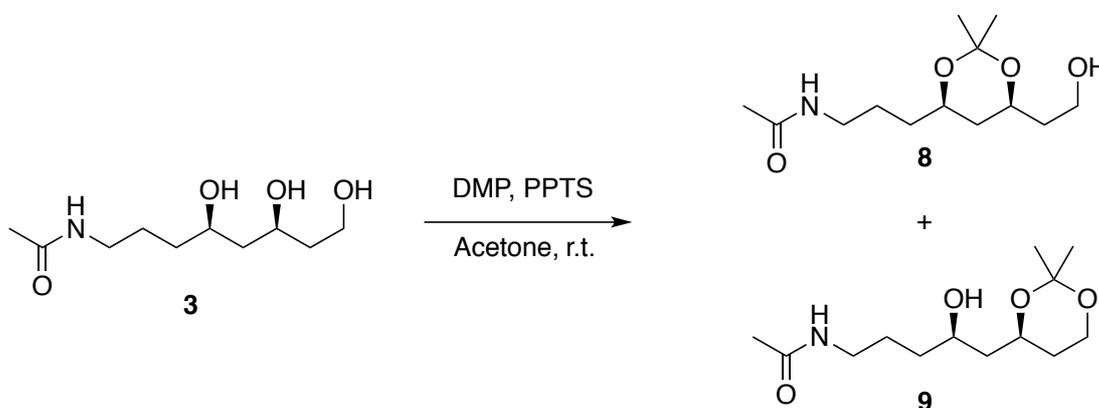


図 3-21 *N*-acetyl 断片のアセトナイド化

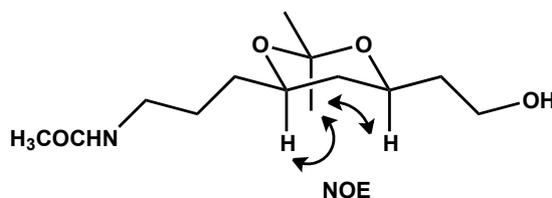


図 3-22 化合物 **8** の NOE 相関

次に *N*-fragment の絶対立体配置の決定を試みた。化合物 **9** を Trost 法を用い(*R*)-または(*S*)-MPA エステル化した誘導体の NMR スペクトルを比較することで二級水酸基の絶対立体配置が決定できる。化合物 **9** (1.2 mg)を CH_2Cl_2 1 mL に溶解し、(*R*)-(-)-MPA または(*S*)-(-)-MPA (MPA: α -methoxyphenylacetic acid, 0.8 mg)、*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.6 mg)、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 0.3 mg)を加え、室温で 1 時間攪拌ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにより精製(CHCl_3 :MeOH = 98:2~95:5)、対応する MPA エステル体 **10R** (1.1 mg)または **10S** (1.0 mg)を得た。 $^1\text{H-NMR}$ ケミカルシフトの比較より、C55 水酸基の絶対立

体配置を(R)と決定した。

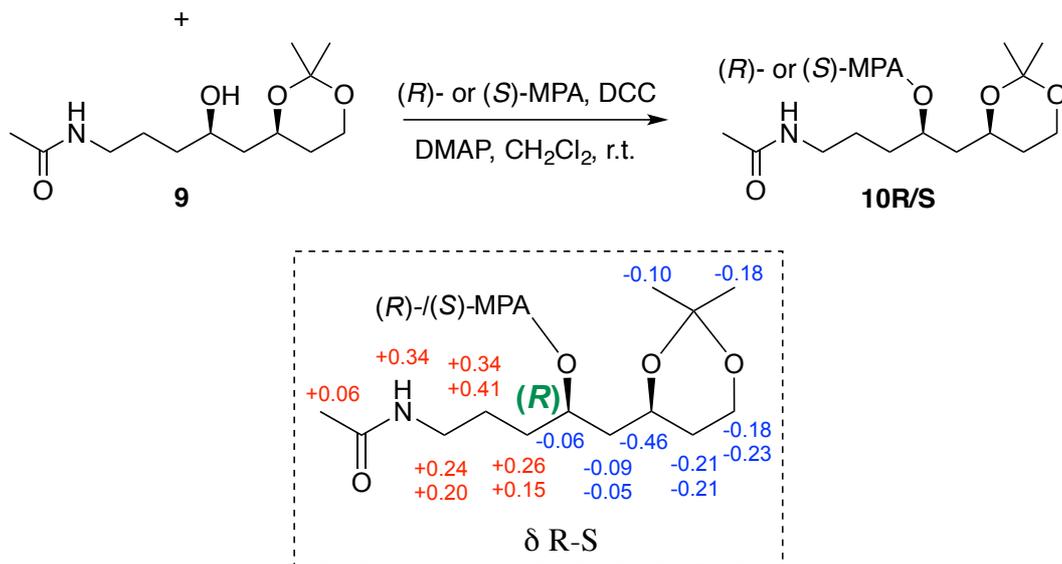


図 3-23 N-fragment の絶対立体配置

次に OH4 フラグメント(4)の絶対立体配置の決定を行った。ここでは二つの 1 級水酸基をリパーゼによりアセチル化したのちに MPA エステル化することを試みた。化合物 4 (3.2 mg)を酢酸エチル 3 mL に溶解し、80 mg のリパーゼ(from porcine pancreas (Type II), Sigma-aldrich Japan)を加え、室温 10 時間攪拌した。酵素をフィルター除去ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、CHCl₃:MeOH = 97:3 で化合物 11 を得た(3.9 mg)。

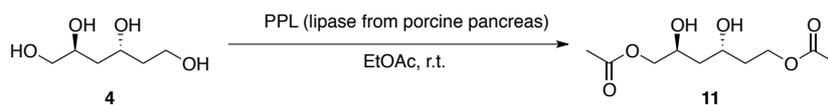
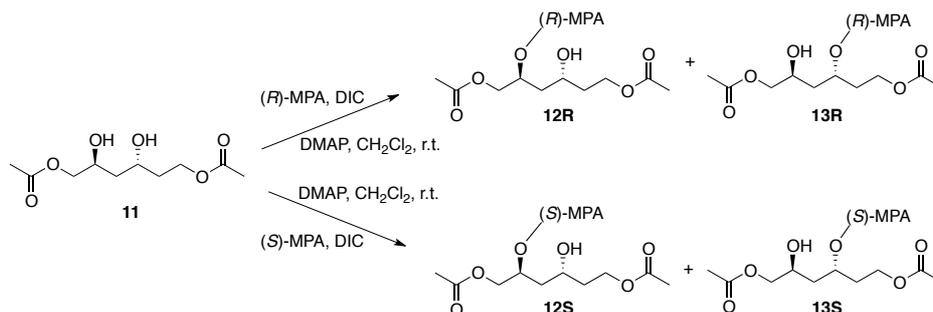


図 3-24 OH4 fragment のエステル化

化合物 11 (1.4 mg)は同様に MPA エステル体とされ、12R (0.3 mg) 13R (0.3 mg)または 12S (0.4 mg) 13S (0.4 mg)の二化合物をそれぞれ得た。¹H-NMR ケミカルシフトの比較より、C49、C47 水酸基の絶対立体配置を(S)、(R)と決定した。



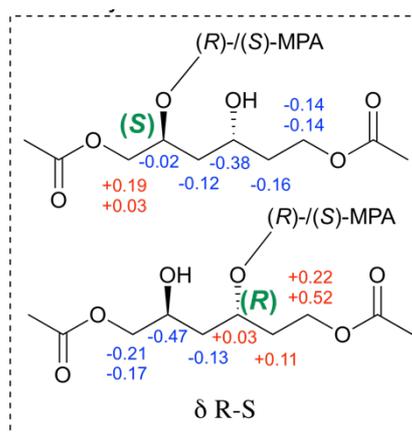


図 3-25 OH4 fragment の絶対立体配置

次に OH5 フラグメント(5)の絶対立体配置の決定を行った。OH4 フラグメントと同様に2つの1級水酸基をリパーゼによりアセチル化したのち、残る3つの二級水酸基をアセトナイド保護し、残りの1つをMPAエステル化することを試みた。上記同様にアセチル化、アセトナイド化の結果、化合物15が選択的に得られ、MPAエステル化の後、対応するMPAエステル体16R(0.7 mg)または16S(0.9 mg)を得た。¹H-NMRケミカルシフトの比較より、C43水酸基の絶対立体配置を(R)と決定した。

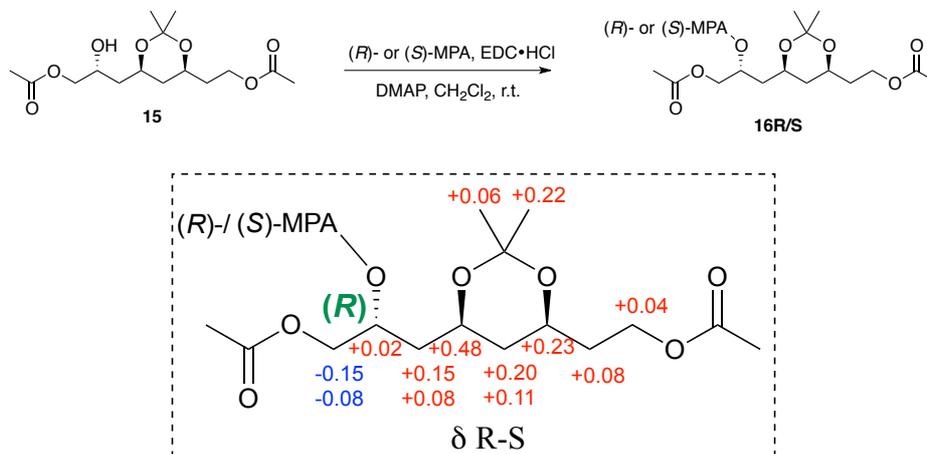


図 3-26 OH5 fragment の絶対立体配置

最後に dMe フラグメント(7)の絶対立体配置の決定のため、他のフラグメント同様にアセチル化およびMPAエステル化を行うことを試みた。上記同様、化合物7(3.9 mg)アセチル化の後、MPAエステル体へと誘導した。対応するMPAエステル体18R(0.5 mg)または18S(0.6 mg)を得た。¹H-NMRケミカルシフトの比較より、C15水酸基の絶対立体配置を(S)と決定した。

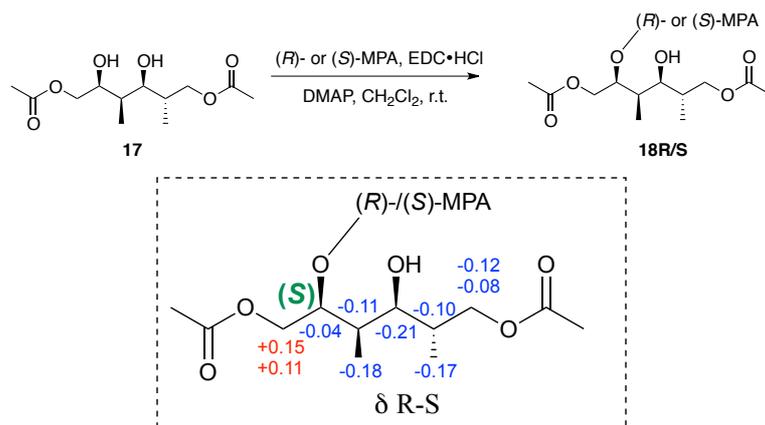


図 3-27 dMe fragment の絶対立体配置

dMe フラグメント(7)のメチル基の立体についてアセトナイド保護体の相対立体配置の決定を行った。化合物 7 (1.6 mg)をアセトン 1 mL に溶解し 2,2-dimethoxypropane (DMP, 15 μ L) と pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS, 1.0 mg)を加え室温で 1 時間攪拌、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、 CHCl_3 :MeOH = 99:1 で化合物 19 を得た。NMR 測定を行い、*J*-カップリングや NOESY スペクトルにて観測された NOE から、6 員環いす型配座の *anti*-相対立体配置を有すると決定した。

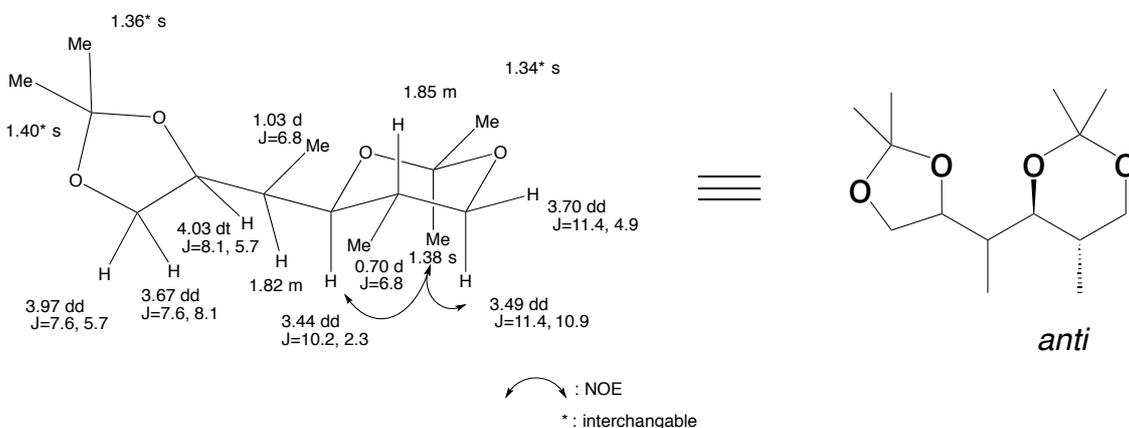


図 3-28 dMe fragment の相対立体配置

以上の結果は遺伝子配列からの立体予測と矛盾のないものであり、遺伝子配列に基づいた立体決定の *mediomycin* における正確性が確かめられた。なお、*mediomycin* の硫酸を含むフラグメントは、遺伝子配列の高い相同性から *neotetrafibricin*/*tetrafibricin* の絶対立体配置と同じであると考えられ、*mediomycin* の当該フラグメントの立体化学の遺伝子に基づく予測は実際に *tetrafibricin* で決定された絶対立体配置と一致している。これらの結果はアミノポリオール化合物における遺伝子に基づく絶対立体配置の決定が有効であることを示し、実際に *mediomycin* と

neotetrafibricin でその絶対立体配置が証明された。Neomediomycin も遺伝子配列が mediomycin や neotetrafibricin の遺伝子と高い相同性を示すことから、その絶対立体配置を高い確度で予測することができた。アミノポリオール化合物はその絶対立体配置の決定に多大な労力を必要とすることが多く、遺伝子配列に基づく決定が有用な代替策となると考えられる。

第 6 節 硫酸転位酵素 MedB の機能解析

Mediomycin A は硫酸基を有しており、遺伝子クラスター上にも硫酸転位酵素 MedB が存在していることから、MedB が mediomycin の硫酸化に関わるものと予想し、本酵素の機能解析を試みた。MedB は 47kDa であり他硫酸転位酵素とのアミノ酸配列比較より、3'-ホスホアデノシン-5'-ホスホ硫酸 (PAPS) 結合部位が保存されていたことから、PAPS を補酵素として用いることが推測された。そこで MedB 全長を DNA 合成し (DNA2.0)、pET28a にクローニング、大腸菌 *E.coli* BLR 株にて発現し Ni-affinity column にて精製を行った。得られた酵素を、前節にて単離した mediomycin B を基質に酵素活性を評価した。pH7.5 Tris バッファーを用い、PAPS を補酵素に 30 °C 2h の反応を行い LC-MS 分析にて活性評価した結果、MedB は mediomycin B を基質に受け入れ mediomycin A に変換したことが明らかとなった(図 3-29)。また、neotetrafibricin B を用いた反応においても同様に硫酸化化合物を与えたことから、MedB は基質の水酸基の位置や共役ポリエンの長さの違いに寛容であることが示された。MedB の逆反応を利用した、硫酸基の転移反応も行ったところ、MedB は Mediomycin A を硫酸ドナーとして、PAP を補酵素に、neomediomycin B を硫酸アクセプターに用いた反応においても、硫酸化 neomediomycin B を生成した (図 3-29v)。

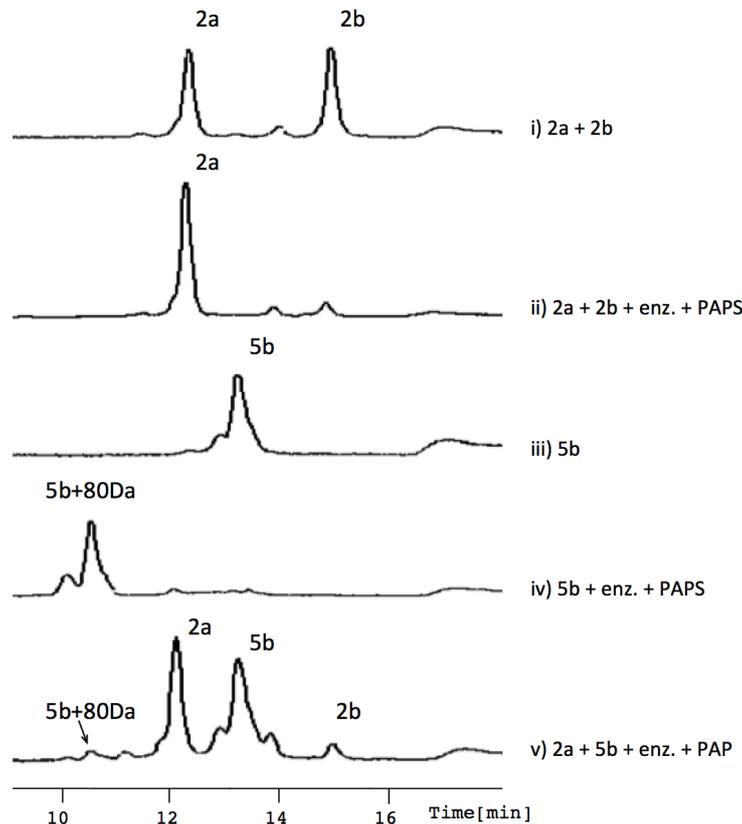


図 3-29 MedB in vitro 反応の HPLC 分析

MedB は mediomycin B に位置特異的な硫酸基付加反応を触媒するが、どのような分子認識機構が存在するかは興味深く、そのため合成基質を用い基質特異性のさらなる検討を行った。前節で合成した N-acetylmediomycin B、13-dihydromediomycin B を用いて MedB の反応を同条件で行い、LC-MS 解析を行った。LC-MS 分析の結果、基質のピークは消失または減少し、高極性側に分子量が 80 増加した新たなピークが観察されたことから、MedB はこれら基質を全て受け入れ、硫酸基を一つ導入することが判明した(図 3-30,31)。導入された位置は質量分析のみでは判断できないものの、生成物のピークは一つのみであることから酵素反応は位置特異的であることが示唆され、従って mediomycin A と同じ位置に硫酸化をしているものと推定される。これらの結果は、mediomycin の N-末端、中央のケトン、及び左側の水酸基のパターン、及びはいずれも分子認識への関与は小さいことを示しており、MedB がポリケチド化合物の普遍的な硫酸化酵素となる期待が持たれる。

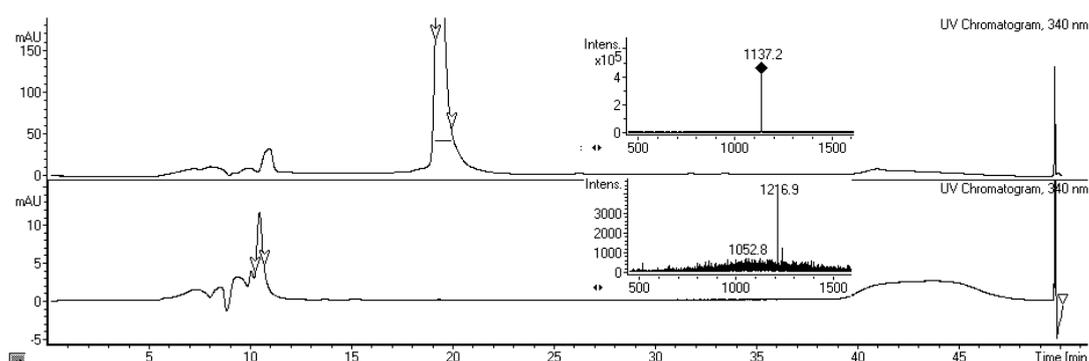


図 3-30 N-acetylmediomycin の MedB 反応

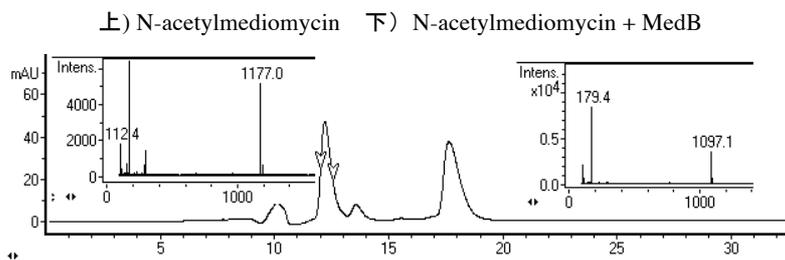


図 3-31 13-dihydromediomycin の MedB 反応

第7節 小括

本研究により遺伝子情報からゲノムマイニングにより mediomycin A およびその新規類縁体の検出と生合成遺伝子の同定に成功した。これらの発見は遺伝子情報を基盤とした新規活性化化合物の探索が有効な手法であることを示している。また、遺伝子情報の活用により、化合物の絶対立体配置や、構造多様性の進化的背景を解き明かす有益な知見を得ることができた。mediomycin A の硫酸基転位酵素の機能解析の結果、本クラスターは確かに mediomycin A を生合成していることを証明し、またその広い基質特異性を明らかにすることができた。

遺伝子の利用は有機合成に無い生合成ならではの強みである。例えば、直鎖のポリケタイド化合物の絶対立体配置の決定は容易ではなく、化学合成や分光学など様々な手段を駆使して試行錯誤をしながら決定する必要がある。本研究によって遺伝子からの絶対立体配置が予想可能であることが示唆されたことは、Type I PKS の産物の構造決定に有益な知見となり、今後単離されるアミノポリオール化合物に応用可能である。

また、モジュール型 I 型 PKS 遺伝子の自然界での組み替えメカニズムはこれまで遺伝子重複が提唱されていたに限り、化合物の構造の違いに対応した遺伝子進化の知見は得られていなかった。本研究で示されたアミノポリオール化合物の分子進化メカニズムは、モジュール型 I 型 PKS の進化を構造の違いに照らし明快に示した初めての例であり、これまでの試行錯誤による実験結果と一致する結果も多く得られた。これらの進化に基づき、実験で支持された、遺伝子組み換えの論理基盤や遺伝子配列の特徴は、PKS への理解を深め、人為的に再設計するための大きなヒントを与えるものと考えられる。PKS のモジュール構造を進化メカニズムに基づき組み替えることが実現すれば、自由自在なポリケタイド化合物の産生が可能となる。ポリケタイド化合物は多数の立体中心を含む複雑で長大な炭素骨格を有することからしばしば合成困難であるため、生合成的な供給が与える創薬上の意義は大きい。基質認識の曖昧な酵素をエンジニアリングすることにより、修飾反応において位置選択的、立体選択的な反応による構造転換が可能となれば活性に大きな変化をもたらすことが期待され、医薬科学においても大きな貢献となる。

総括

本研究では antimycin の生合成およびアミノポリオール化合物の生合成経路の解析に取り組んだ。第 2 章では antimycin の伸長基質供給酵素 AntE の構造解析を行い、触媒機構の理解とリデザインにより antimycin 生合成マシナリーの人為的な機能拡張を達成した。また第 3 章ではポリケタイド化合物が自然界でどのように分子多様性を獲得したかについて、遺伝子レベルでの進化メカニズムを明らかにすることができた。これらより得られた結果はモジュール型 PKS の合成生物学に貢献し、ポリケタイド骨格の自由自在な再設計を可能にすることが期待される。具体的には、生合成経路を人為的に設計することで 1) ポリケタイド鎖の α -位にインドールより小さい任意の置換基を持ち、2) β -位にケトンまたは水酸基もしくは α,β -不飽和または飽和結合のうち任意の官能基を有する、3) 任意の長さのポリケタイド、の産生に繋がる知見を得ることができた。PKS の自由自在な組み替えおよび再設計が可能かどうかは実証実験が必要であり、また PKS 自身の基質特異性やドメイン間の基質受け渡しや相互作用など複数ドメインにまたがる触媒メカニズムは解明されていない。しかし今回遺伝子分析から解明することができた PKS の進化メカニズムは多く実験に基づく先行研究を説明出来るものであり、アミノポリオールに限らず普遍性の高い遺伝子進化メカニズムであることが示唆される。

伸長基質の供給酵素となる AntE を用いて非天然型ポリケタイドを産生可能であることを実証した結果は、AntE の合成生物学での有用性を示すものである。AntE を用いることで天然における PKS 伸長基質の自由度を増加することができる。用いることのできる”building block”が増加することはすなわち、構造多様性が指数関数的に増加することであり、PKS は全て Claisen 縮合をその触媒反応に用いるため、AntE は普遍的な伸長基質供給酵素となり得る。留意すべき点は、AntE の基質は CoA 体であるため、CoA-ligase が必要となる点である。しかし、基質特異性の曖昧な CoA-ligase は幾つか報告例があり、AntE と共発現することで代謝経路を構築することは容易に実現可能である。

好きな位置に好きな伸長基質を導入するためには PKS の自由自在な再設計が不可欠であるが、PKS の組み替えは現在の遺伝子操作技術では困難である。PKS はモジュール構造が繰り返されるため必然的に繰り返し配列が多く、相同組み替えを用いる現在の遺伝子操作技術では狙った場所での組み替えが難しいと言う課題がある。しかし、DNA 合成技術の発達により、数十 kbp の遺伝子を手軽に合成できるようになれば、目的の組み替え遺伝子を容易に調達可能となり、PKS 組み替え理論の実証が進むと考えられる。PKS の組み替えは、均質性(=配列相

同性)の高い配列を用いることが有効とされており、今回同定したアミノポリオール化合物の遺伝子はその進化メカニズムの知見と合わせ、ポリケタイドの合成生物学にとっての格好の遺伝子テンプレートとなると考えられる。

PKS のエンジニアリングは、遺伝子の構成と産生化合物が一对一对応することが判明して以降四半世紀の間盛んに行われてきた。本研究は生化学的、構造生物学的、また遺伝学的な観点から PKS エンジニアリングに資するものであり、進化メカニズムそのものからドメインの基質特異性や立体化学の決定に至るまで幅広い知見を得ることができ、伸長基質供給能力の優れた酵素の開発と合わせ、PKS の合成生物学を加速させることが期待される。

実験項

第 2 章実験項

菌株・ベクター・酵素・機器類の概要

放線菌 *S. blastomyces* NBRC12576 株は NITE より購入、*Streptomyces* sp.NRRL 2288 株、2288*DantB* 株、2288 Δ *antBantE* は中国科学院上海有機化学研究所・劉文教授より分与いただいた。大腸菌 *E.coli* DH5 α 株, BLR 株, S17-1 株, プラスミド pET28a、各種制限酵素、Ligation Solution I は TaKaRa 社より購入した。プラスミド pTYM19ep は東京大学農学系研究科・尾仲宏康教授より分与いただいた。DNA シークエンスは Eurofin genetics 社に委託した。PCR 反応は記述が無い限り上記 Primestar を用いた。ライゲーション反応は記述が無い限り上記 Solution I を用い 16 °C、overnight で行った。DNA のクローニングなどは DH5a株を用いて DNA purification kit (Promega) を用いるなど常法に従い行った。大腸菌の培養は LB 培地を用いた。PCR は TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient を用い PrimeStar DNA polymerase (TaKaRa)を用いた。HPLC は JASCO LC2000 を、LC-ESIMS は Bruker 4000series を、NMR は JEOL ECX500 または ECA500 を用いた。LC-ESI-HRMS は JEOL JMS-T100LP system を用い測定した。HPLC カラムは記述が無い限り Nacalai tesque 5C18MSII (分析用 I.D.4.6x250 mm, 流速 1.0 ml/min で使用、分取用 I.D.10.0x250 mm, 流速 3.0ml/min で使用)を用い、LC-ESIMS用のカラムは TOSOH Tsk-gel ODS-80Ts(I.D. 2.0x150 mm, 流速 0.2 ml/min)を用いた。

プライマー配列

antE-f: AAAGAATTCATATGACCAAGGACCTCTAC

antE-r: AAAAAGCTTCTACTCGGTGGCGTTCACC

A182G-f:CTCCTGCTACATGGGTACCGCGGCGACCG

A182G-r:CGGTCGCCGCGGTACCCATGTAGCAGGAG

A182L-f:CTCCTGCTACATGCTCACCGCGGCGACCG

A182L-r:CGGTCGCCGCGGTGAGCATGTAGCAGGAG

V350G-f:CAGGGCTCGCACGGTGCCAGCGCCCGTGAG

V350G-r:CTCACGGGCGCTGGCACCGTGCGAGCCCTG

V350A-f:CAGGGCTCGCACGCTGCCAGCGCCCGTGAG

V350A-r:CTCACGGGCGCTGGCACGCTGCGAGCCCTG

V350F-f:CAGGGCTCGCACTTCGCCAGCGCCCGTG

V350F-r:CACGGGCGCTGGCGAAGTGCGAGCCCTG

Infusion-f:CACCGAGTAGAAGCTTCAGTGAATTGCAGGTCCAGGAAG

Infusion-r:GATTACGCCAAAGCTTTCAGTTGTG

培地組成

MS 培地: Mannitol 2%, Soy flour 2%, tap water

A3M 培地: 0.5% glucose, 2% glycerol, 2% soluble starch, 1.5% Pharmamedia, 0.3% yeast extract, 1%

Diaion HP-20 (Mitsubishi Chemical Co.), pH 7.0

LB 培地: tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 1%

AntE 及び AntE 点変異体発現ベクターの作成

AntE-f/r プライマーを用い、*Streptomyces* NRRL2288 株ゲノムをテンプレートに PCR を用いて AntE 遺伝子領域をクローニング、PCR 断片を制限酵素 *NdeI* と *HindIII* により切断し、同制限酵素で切断された pET-28a(+) にライゲーションし、N 末端に His₆ タグを付加した AntE の発現ベクターを得た。点変異体は上記各プライマーセットを用い、AntE 発現ベクターをテンプレートに PCR を行う事で変異を導入、発現ベクターを作成した。

AntE 及び各変異体の発現精製

各発現ベクターを *E.coli* BLR に導入、1 L の LB 培地にて培養し OD₆₀₀=0.4 時に 1mM IPTG を加え発現誘導し、23°C、150 rpm、overnight で発現を行った。菌体を遠心回収し、20 mL の buffer A (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole) に懸濁し超音波破碎を行った。15000 g で遠心後得られた上清を COSMOGEL his-accept(Nacalai) 5 ml に吸着、buffer A 100 ml で wash を行い buffer A +500 mM imidazole 10 ml で溶出した。結晶化に用いる酵素では次に Superdex200 (GE healthcare) を用いてゲル濾過精製を 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 2 mM DTT バッファーを用いて行った。AntE の含まれるフラクションを 12 mg/ml まで濃縮、タンパク純度が 95% 以上であることを SDS-PAGE で確認した。

AntE の結晶化及び結晶構造解析

AntE の結晶化スクリーニングでは蛋白溶液 0.5 µl に沈殿剤 0.5 µl (Wizard I and II, Emerald Bio

または Crystal Screen and Screen 2, Hampton Research)を加え、シッティングドロップ蒸気拡散法により 20 °C でインキュベートし結晶化を行った。条件最適化ののち、100 mM CAPS–NaOH pH 10.0, 38%(v/v) PEG 400、20 °C で結晶が得られ、X 線回折は高エネルギー加速器研究所 KEK の BL17A ビームライン (0.9800 Å)にてデータ収集を行った。蛋白結晶は、100 mM CAPS–NaOH pH 10.0, 38%(v/v) PEG 400, 20%(v/v) glycerol のクライオプロテクタントに数秒浸し、100 K の窒素ガスで冷却下 240 フレーム 0.75°の oscillation angle、2 秒の露光でデータを収集し、XDS プログラムを用い解析された。構造決定には MOLREP プログラム^[54]を用い、SWISS-MODEL (<http://expasy.ch/spdpv/>)により CinF (PDB ID:4A10)を鋳型に AntE の配列で作成したモデル構造を元に分子置換法により位相を決定、得られた構造は Coot^[55]を用い精密化され、PHENIX プログラム^[56]を用いてリファインメントを行った。リガンドのドッキングモデルは Coot を用いて作成し、PyMOL (DeLano Scientific)を用いて図の作成を行った。

In vitro 酵素反応

AntE の酵素反応には crotonyl-CoA (Sigma-Aldrich)、 cinnamoyl-CoA、 p-coumaroyl-CoA、 indolyallyl-CoA(3 基質共に教室保存試薬、合成により調達)を基質として用いた。反応は 50 ml スケールで行われ以下の組成を用いた (0.5 mM 基質, 60 mM NaHCO₃, 2 mM NADPH, 100 mM HEPES, pH 7.0, 1 μM AntE)。 反応時間は 3 時間 30 °C で行われ、等量のメタノールを加えることで反応を終結し、12,000g 5 分の遠心の後 10 ml の上清を LC-ESIMS 分析にかけた。Crotonyl-CoA の分析ではグラディエント条件 solvent A (100% acetonitrile) : solvent B (100% H₂O containing 50 mM ammonium acetate, pH 8.0) A:B=0:100 (0 min)~25:75 (20 min)、流速 0.2 ml/min で行われ、cinnamoyl-CoA、 p-coumaroyl-CoA と indolyallyl-CoA の分析では A:B = 0:100 (0 min) ~ 30:70 (20 min) に変更して行った。

AntE 変異体の放線菌発現ベクターの作成及び *Streptomyces* sp. NRRL 2288ΔantBantE 株への導入

A182L または V350G 変異体の pET28a 発現ベクターより *NdeI* と *HindIII* を用いて切り出し、得られた A182L または V350G 遺伝子は同制限酵素で切られた pTYM19ep ベクターにライゲーションすることで pTYM19ep–AntE A182L または pTYM19ep–AntE V350G を得た。CoA リガーゼである LE4CL は Eurofin genomics により *NdeI* と *HindIII* サイトを付加し放線菌での発現に合わせコドン最適化し DNA 合成された。LE4CL を同制限酵素で切断し、pTYM19ep にライゲーションすることで得られた pTYM19ep–LE4CL から Infusion プライマーを用いて PCR することで得ら

れた LE4CL に *ermE* プロモーターが付加した断片は、In-Fusion Advantage PCR kit (Clontech Laboratories)により *HindIII* で切断された pTYM19ep-AntE A182L または pTYM19ep-AntE V350G にそれぞれ導入され、pTYM19ep-AntE A182L/LE4CL または pTYM19ep-AntE V350G/LE4CL の二遺伝子共発現ベクターを作成した。得られた発現ベクターは大腸菌 S17-1 に導入され、接合伝達法により *Streptomyces* sp. NRRL 2288 Δ *antBantE* の孢子と混合、14 時間 30 °C で MS プレート上でインキュベートの後チオストレプトン 10 μ g/ml とナリジクス酸 25 μ g/ml により形質転換体を得た。

In vivo 発酵生産、分析、および単離精製

28 °C、MS Agar plate で 3 日間前培養した *Streptomyces* NRRL 2288 各種遺伝子操作株を 2x2 cm で 500 ml 三角フラスコに入れた A3M 培地 100 ml に植菌し 28 °C 200rpm 培養、非天然化合物の投与の場合は 24 時間後に培地比終濃度 1 mM で化合物を添加、さらに 48 時間培養を続けた。培養終了後遠心により菌体を回収し、上清を捨てたのち 100 ml の MeOH:CH₂Cl₂=1:1 で一晚抽出、菌体を濾過により除き抽出液を減圧濃縮し、濃縮残渣をメタノールに溶解、HPLC 分析(流速 1 mL/min、UV 230 nm、40% B (0 min) – 80% B (20 min) – 100% B (21–25 min), A: H₂O + 0.1 formic acid; B: CH₃CN + 0.1% formic acid)を行った。deacylantimycin 類の単離精製には 2L の発酵菌体から 1 L の有機溶媒を上記同様に用い抽出、濃縮残渣をまずシリカゲルクロマトグラフィーにより粗精製した。CHCl₃:MeOH=9:1 にて溶出し、deacylantimycin の含まれるフラクションを HPLC 精製 (流速 3 mL/min、上記 B55% isocratic) により単離した。

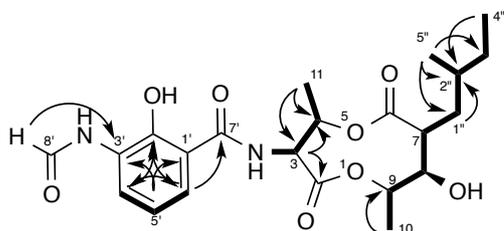
酵素のアミノ酸配列

>AntE

MTKDLYELGDAPPLGTAPKQMYASLRQERYGRPVDAFRTEVVDPVPPVPGQVLVKVMAAGV
NYNNVWAAALGEPLDVIAARQKQGATEDFHIGGSDDLGIWVAVGDGVRLKPGAEEVVLACRWD
ESAQDIRLGADPVTSSSTQRVWGYEENYGSFAQFAVVDEYMCHPKPQRLSWAAASCYMATAAT
AYRQLFGWEPHTVRPGDPVLIWGGAGGLGSIAIQLVRHVGGIPVAVVSSEERGEFCMRLGAKG
WIDRREFDHWGRLPDTTDEEAMKQWLDGARAFGRFWEVLGERRAPRIVLEHSGADTIPTSIY
MADNAGMVVICGGTTGYNGDVDLRLFLWMRQKRLQGSHVASAREAREITRLIDQGAIDPCLSR
FGFEEIGLAHQLIHDNQHPSGNMAVLVNATE

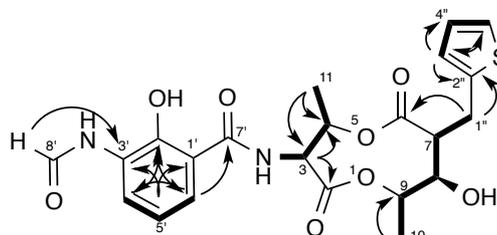
新規 deacylantimycin の構造決定

DA-15 (10)



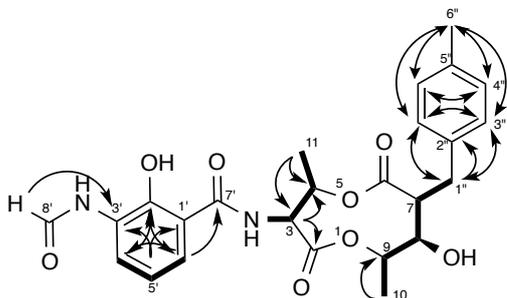
Position	δ_C	δ_H (mult., J in Hz, intensity)
2	170.2	
3	53.8	5.25 (t, 7.7, 1H)
3-NH		7.11 (d, 7.7, 1H)
4	70.7	5.70 (m, 1H)
6	174.0	
7	50.0	2.49 (m, 1H)
8	77.3	3.60 (m, 1H)
9	76.8	4.88 (m, 1H)
10	18.4	1.46 (d, 6.1, 3H)
11	15.1	1.31 (d, 6.6, 3H)
1'	112.7	
2'	150.7	
2'-OH		12.66 (s, 1H)
3'	127.5	
3'-NH		7.91 (s, 1H)
4'	124.9	8.55 (d, 8.2, 1H)
5'	119.1	6.93 (m, 1H)
6'	120.2	7.24 (m, 1H)
7'	169.5	
8'	159.0	8.50 (s, 1H)
1''a	35.8	1.82 (m, 1H)
1''b		1.46 (m, 1H)
2''	32.5	1.30 (m, 1H)
3''	30.5	1.23 (m, 2H)
4''	18.5	0.84 (m, 3H)
5''	11.3	0.86 (m, 3H)

DA-16 (12)



Position	δ_C	δ_H (mult., J in Hz, intensity)
2	170.1	
3	53.6	5.26 (t, 7.9, 1H)
3-NH		7.06 (d, 7.9, 1H)
4	70.9	5.66 (m, 1H)
6	172.9	
7	54.3	2.75 (ddd, 3.4, 9.3, 11.3, 1H)
8	77.2	3.73 (t, 9.3, 1H)
9	77.0	4.89 (m, 1H)
10	18.4	1.49 (d, 6.2, 3H)
11	14.8	1.27 (d, 6.2, 3H)
1'	112.7	
2'	150.7	
2'-OH		12.63 (s, 1H)
3'	127.4	
3'-NH		7.92 (s, 1H)
4'	124.9	8.54 (d, 7.9, 1H)
5'	119.1	6.91 (m, 1H)
6'	120.2	7.23 (d, 7.9, 1H)
7'	169.5	
8'	159.0	8.49 (s, 1H)
1''a	29.5	3.28 (dd, 11.3, 14.7, 1H)
1''b		3.40 (dd, 3.4, 14.7, 1H)
2''	140.7	
3''	125.8	6.83 (d, 2.8, 1H)
4''	127.0	6.90 (m, 1H)
5''	124.2	7.14 (d, 5.1, 1H)

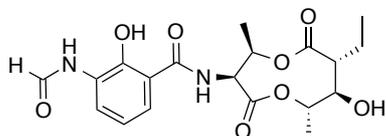
DA-17 (13)



Position	δ_C	δ_H (mult., J in Hz, intensity)
2	170.2	
3	53.6.	5.23 (t, 7.9, 1H)
3-NH		7.02 (d, 7.9, 1H)
4	70.8	5.60 (m, 1H)
6	173.1	
7	54.0	2.67 (ddd, 3.7, 9.3, 11.1, 1H)
8	77.0	3.73 (t, 9.3, 1H)
9	77.5	4.87 (m, 1H)
10	18.4	1.48 (d, 6.4, 3H)
11	14.8	1.18 (d, 6.9, 3H)
1'	112.7	
2'	150.7	
2'-OH		12.63 (s, 1H)
3'	127.5	
3'-NH		7.89 (s, 1H)
4'	124.9	8.53 (d, 7.9, 1H)
5'	119.0	6.91 (t, 7.9, 1H)
6'	120.1	7.20 (d, 7.9, 1H))
7'	169.4	
8'	159.0	8.49 (s, 1H)
1''a	34.8	3.15 (dd, 3.7, 13.7, 1H)
1''b		2.97 (dd, 11.1, 13.7, 1H)
2''	128.8	
3''	135.4	7.07 (s, 2H)
4''	136.2	7.07 (s, 2H)
5''	129.4.	
6''	21.1	2.30 (s, 3H)

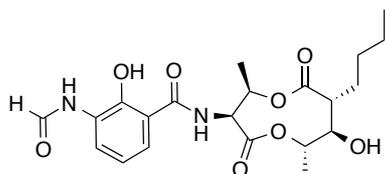
Deacylantimycin 類の NMR 及び Mass Spectroscopy 分析結果

DA-14 (5)



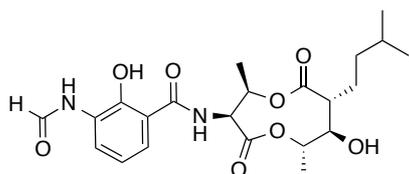
$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.65 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.24 (m*, 1H), 7.10 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 5.71 (m, 1H), 5.25 (t, $J = 7.6$ Hz, 1H), 4.87 (m, 1H), 3.61 (m, 1H), 2.35 (m, 1H), 1.90-1.70 (m, 2H), 1.46 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.31 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 173.9, 170.2, 169.5, 159.1, 150.7, 127.5, 124.9, 120.2, 119.1, 112.7, 77.2*, 77.0*, 70.8, 53.8 (2C), 22.2, 18.4, 15.1, 11.7. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI $^-$) calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8$, 407.1454; found, 407.1436 (-1.8 mmu).

DA-1 (6)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.65 (s, 1H), 8.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.25 (m*, 1H), 7.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.70 (m, 1H), 5.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.86 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 2.35 (dt, $J = 3.6$ Hz, 10.5 Hz, 1H), 2.02 (brs, 1H), 1.78 (m, 1H), 1.70 (m, 1H), 1.45 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.30 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H), 1.37-1.19 (m, 4H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 174.0, 170.2, 169.5, 159.0, 150.7, 127.5, 124.9, 120.2, 119.1, 112.7, 77.2*, 77.0*, 70.8, 53.8, 52.2, 29.5, 28.7, 22.6, 18.4, 15.1, 13.9. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI $^-$) calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_8$, 435.1767; found, 435.1780 (1.2 mmu).

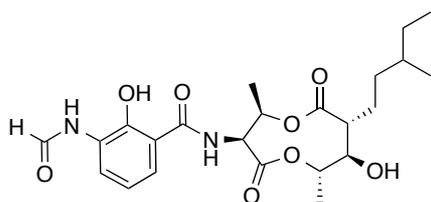
DA-2 (7)



$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.65 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.25 (m*, 1H), 7.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.92 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.70 (m, 1H), 5.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H),

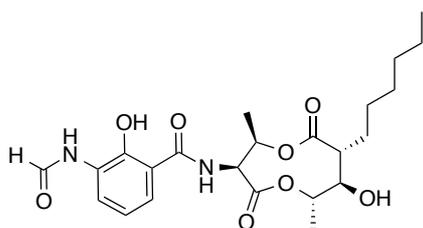
4.86 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 2.32 (m, 1H), 2.00 (brs, 1H), 1.80 (m, 1H), 1.69 (m, 1H), 1.54 (m*, 1H) 1.45 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.31 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H) 1.22–1.10 (m, 2H), 0.88 (d, 6.9 Hz, 3H), 0.87 (d, 6.4 Hz, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 174.0, 170.2, 169.5, 159.0, 150.7, 127.5, 124.9, 120.2, 119.1, 112.7, 77.2*, 77.0*, 70.9, 53.8, 52.4, 36.3, 28.1, 26.9, 22.7, 22.3, 18.5, 15.1. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI $^-$) calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_8$, 449.1924; found, 449.1929 (0.5 mmu).

DA-3 (8)

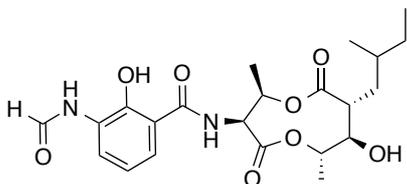


^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.65 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.90 (s, 1H), 7.25 (m*, 1H), 7.09 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J = 8.2$ Hz, 1H), 5.70 (m, 1H), 5.24 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.86 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 2.34 (dt, $J = 3.6$ Hz, 10.5 Hz, 1H), 1.98 (brs, 1H), 1.80-1.68 (m, 2H), 1.45 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.30 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 1.35–1.22 (m, 3H), 1.20–1.08 (m, 2H), 0.89-0.82 (m, 6H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 173.9, 170.2, 169.5, 159.0, 150.7, 127.5, 124.9, 120.2, 119.1, 112.7, 77.2*, 77.0*, 70.8, 53.8, 52.3, 34.4, 33.8, 29.5, 26.5, 19.0, 18.4, 15.1, 11.4. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI $^-$) calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_8$, 463.2080; found, 463.2077 (–0.3 mmu).

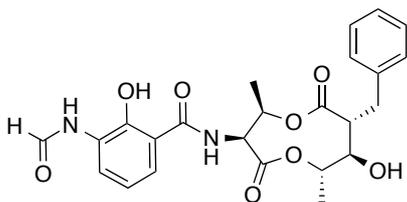
DA-4 (9)



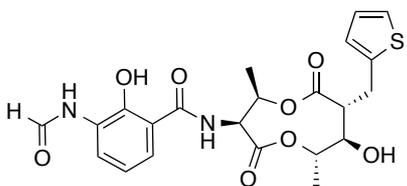
^1H -NMR (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.65 (s, 1H), 8.55 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.51 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.25 (m*, 1H), 7.10 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.93 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.70 (m, 1H), 5.25 (t, $J = 7.4$ Hz, 1H), 4.87 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 2.36 (dt, $J = 3.4$ Hz, 10.5 Hz, 1H), 1.98 (brs, 1H), 1.82-1.68 (m, 2H), 1.46 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.31 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.34–1.20 (m, 8H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 174.0, 170.2, 169.5, 158.9, 150.7, 127.5, 124.9, 120.2, 119.1, 112.7, 77.2*, 77.0*, 70.8, 53.8, 52.2, 31.6, 29.2, 29.0, 27.3, 22.6, 18.4, 15.1, 14.1. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI $^-$) calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_8$, 463.2080; found, 463.2103 (2.2 mmu).

DA-15 (10)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ 12.66 (s, 1H), 8.55 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.24 (m*, 1H), 7.11 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.93 (t, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.70 (m, 1H), 5.25 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.88 (m, 1H), 3.60 (m, 1H), 2.49 (m, 1H), 1.99 (brs, 1H), 1.82 (m, 1H), 1.46 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H), 1.31 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.50-1.20, (m, 4H), 0.90-0.82 (m, 6H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, TMS): δ 174.0, 170.2, 169.5, 159.0, 150.7, 127.5, 124.9, 120.2, 119.1, 112.7, 77.3*, 76.8*, 70.7, 53.8, 50.0, 35.8, 32.5, 30.5, 18.5, 18.4, 15.1, 11.3. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI⁻) calcd. for C₂₂H₂₉N₂O₈, 449.1924; found, 449.1945 (2.1 mmu).

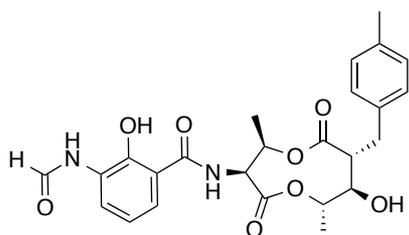
Splenocin J (11)

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃, TMS): δ 12.63 (s, 1H), 8.53 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 7.28 (d, *J* = 7.3 Hz, 2H), 7.24-7.17 (m, 4H), 7.03 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.91 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.24 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.90 (m, 1H), 3.75 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.21 (dd, *J* = 3.4 Hz, 13.5 Hz, 1H), 3.00 (dd, *J* = 11.2 Hz, 13.5 Hz, 1H), 2.71 (ddd, *J* = 3.4 Hz, 9.5 Hz, 11.2 Hz, 1H), 2.19 (brs, 1H), 1.49 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.17 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃, TMS): δ 173.0, 170.2, 169.5, 159.0, 150.7, 138.5, 128.9, 128.7, 127.5, 126.7, 124.9, 120.2, 119.1, 112.7, 77.2*, 77.0*, 70.8, 54.1, 53.6, 35.2, 18.4, 14.8. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI⁻) calcd. for C₂₄H₂₅N₂O₈, 469.1611; found, 469.1626 (1.5 mmu).

DA-16 (12)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.63 (s, 1H), 8.54 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.92 (s, 1H), 7.23 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.14 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H), 7.06 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.87-6.93 (m, 2H), 6.83 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 5.66 (m, 1H), 5.26 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.89 (m, 1H), 3.73 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.40 (dd, $J = 3.4$ Hz, 14.7 Hz, 1H), 3.28 (dd, $J = 11.3$ Hz, 14.7 Hz, 1H), 2.75 (ddd, $J = 3.4$ Hz, 9.3 Hz, 11.3 Hz, 1H), 2.22 (brs, 1H), 1.49 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H), 1.27 (d, $J = 6.2$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 172.9, 170.1, 169.5, 159.0, 150.7, 140.7, 127.4, 127.0, 125.8, 124.9, 124.2, 120.2, 119.1, 112.7, 77.2*, 77.0*, 70.9, 54.3, 53.6, 29.5, 18.4, 14.8. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI $^-$) calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$, 475.1175; found, 475.1162 (-1.3 mmu).

DA-17 (13)

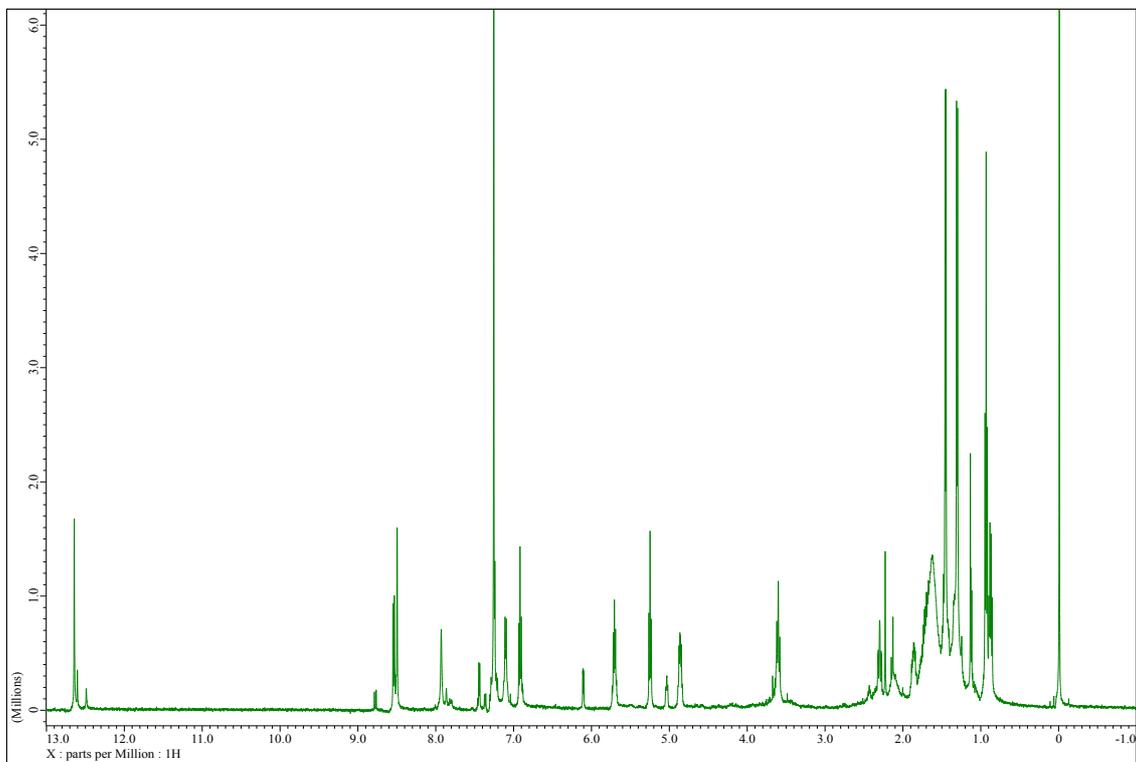


$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 12.63 (s, 1H), 8.53 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 8.49 (s, 1H), 7.89 (s, 1H), 7.20 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.07 (s, 4H), 7.02 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.91 (t, 7.9 Hz, 1H), 5.60 (m, 1H), 5.23 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 4.87 (m, 1H), 3.73 (t, $J = 9.3$ Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 3.7$ Hz, 13.7 Hz, 1H), 2.97 (dd, $J = 11.1$ Hz, 13.7 Hz, 1H), 2.67 (ddd, $J = 3.7$ Hz, 9.3 Hz, 11.1 Hz, 1H), 2.30 (s, 3H), 2.10 (brs, 1H), 1.48 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H), 1.18 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3 , TMS): δ 173.1, 170.2, 169.4, 159.0, 150.7, 136.2, 135.4, 129.4, 128.8, 127.5, 124.9, 120.1, 119.0, 112.7, 77.5*, 77.0*, 70.8, 54.0, 53.6, 34.8, 21.1, 18.4, 14.8. *Overlap with solvent peak. HRMS (ESI $^-$) calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_8$, 483.1767; found, 483.1791 (2.3 mmu).

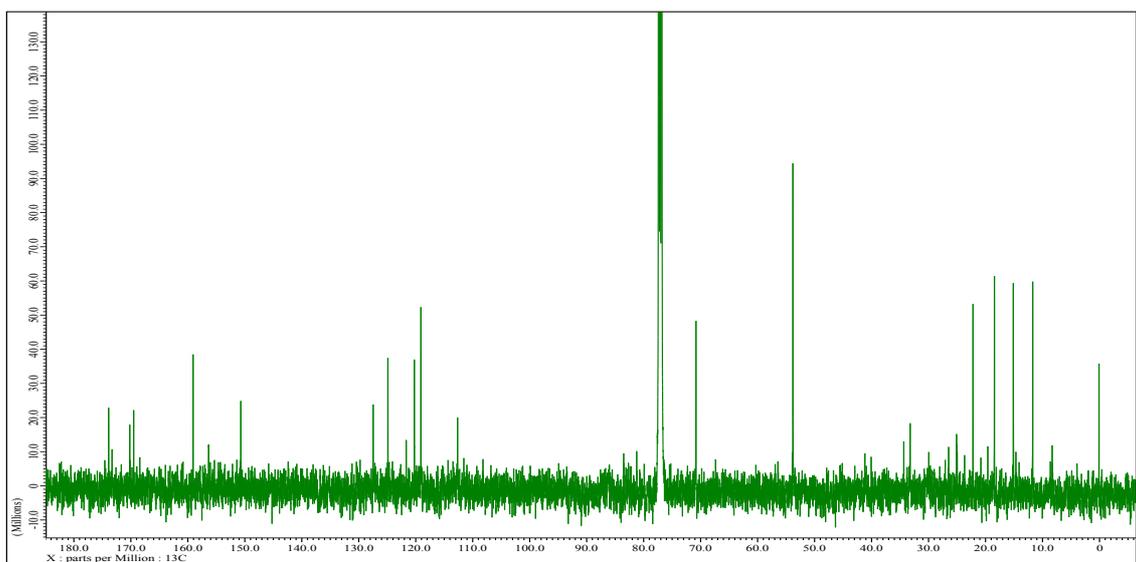
deacylantimycin 類の NMR スペクトル

(a) DA-14 (5)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)

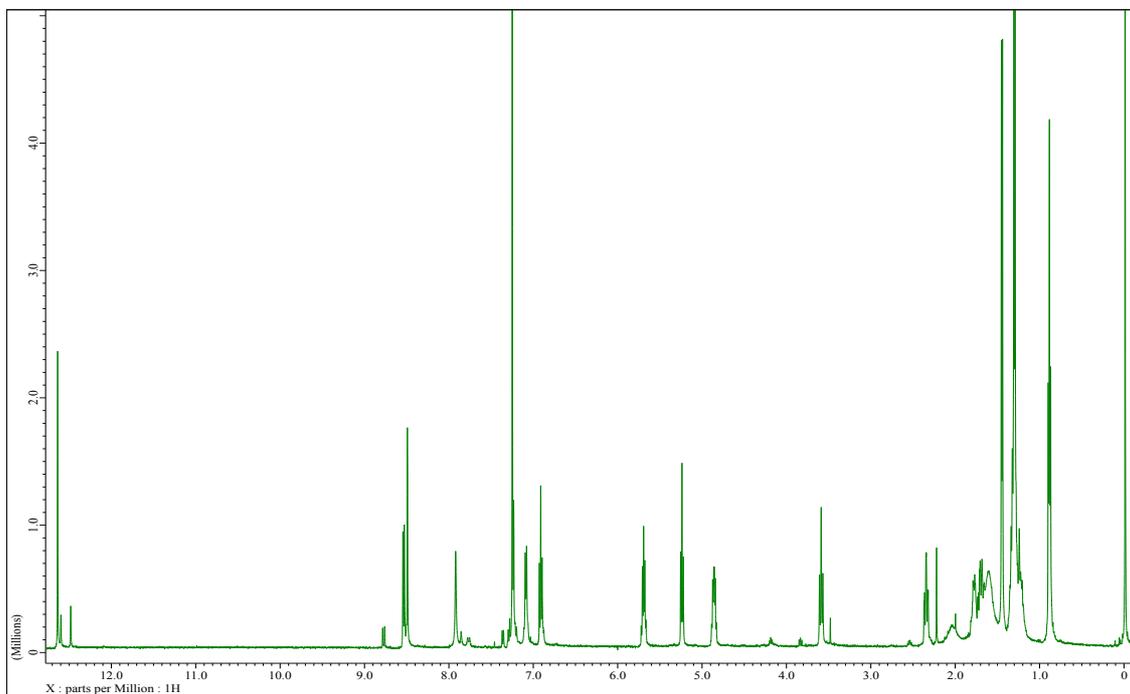


$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)

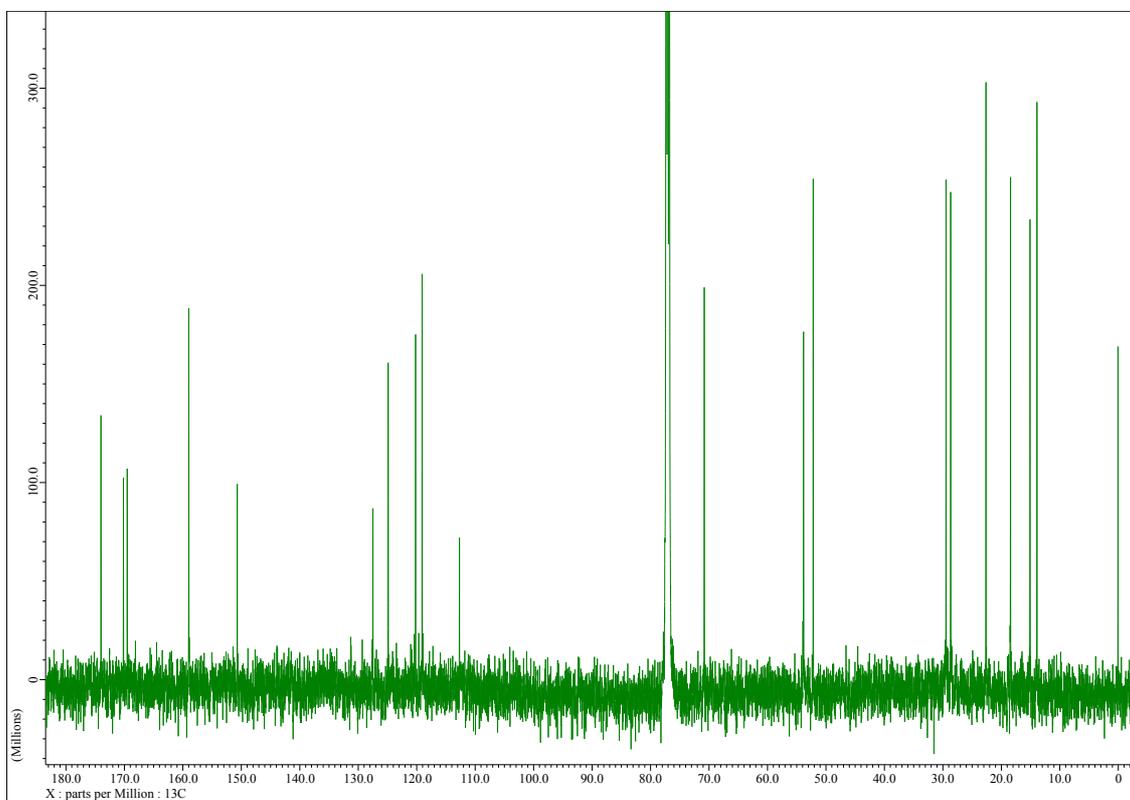


(b) DA-1 (6)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)

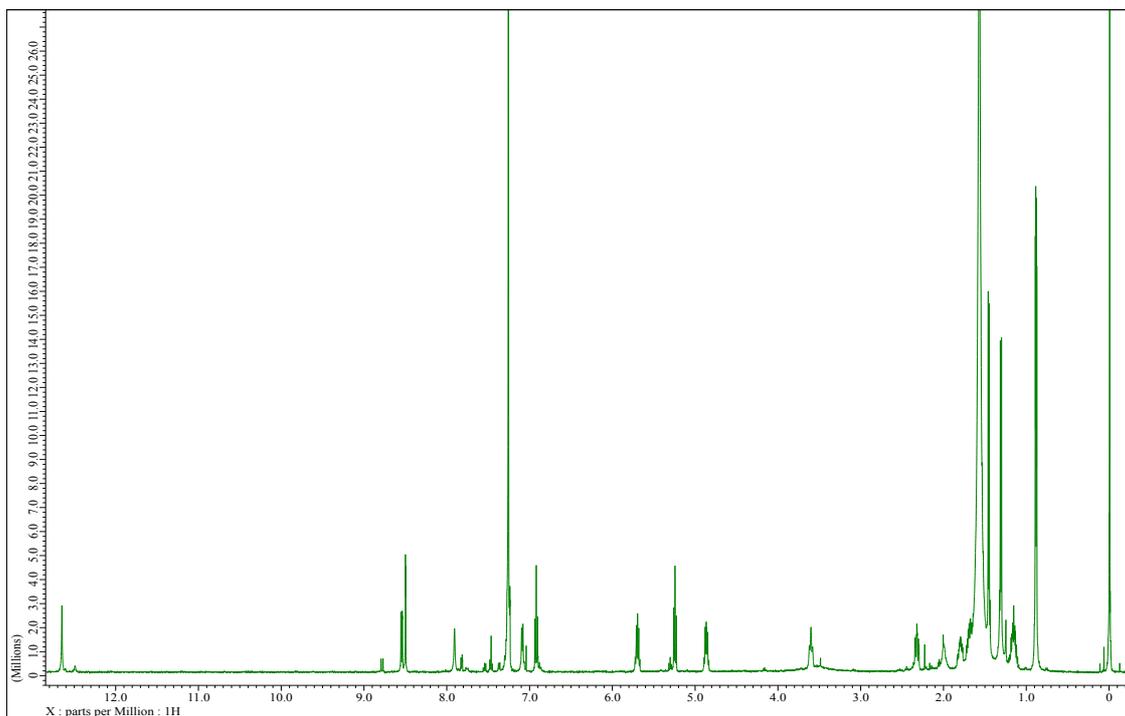


$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)

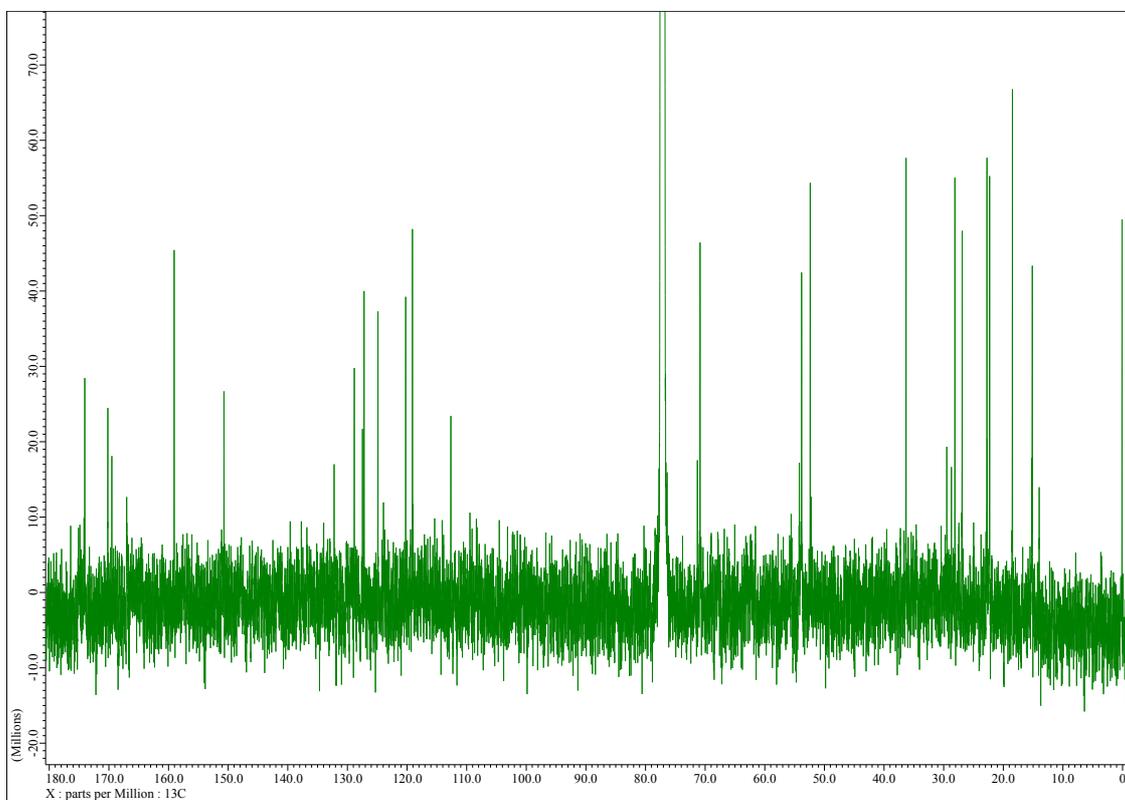


(c) DA-2 (7)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)

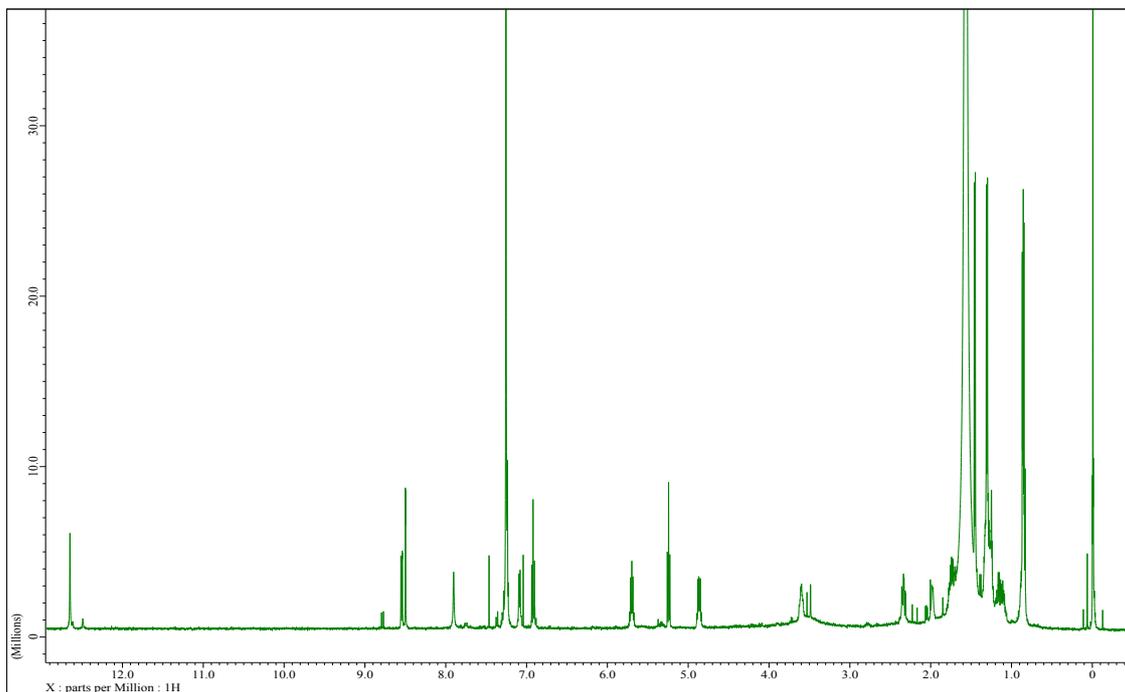


$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)

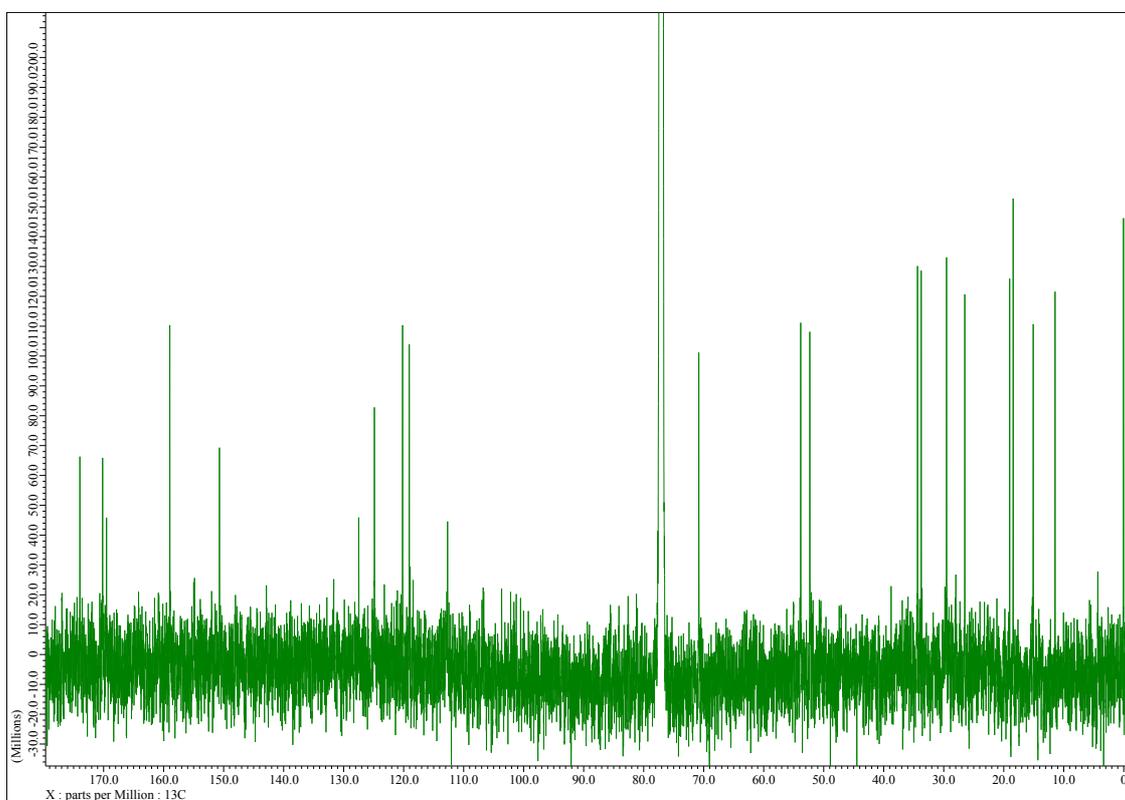


(d) DA-3 (8)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)

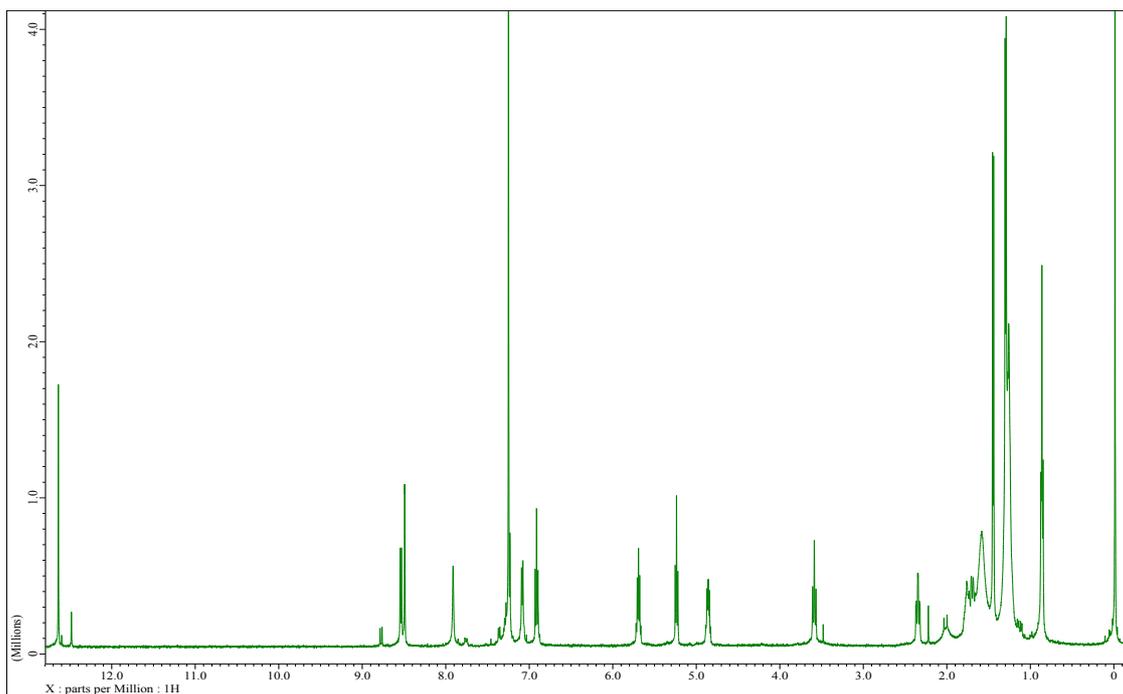


$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)

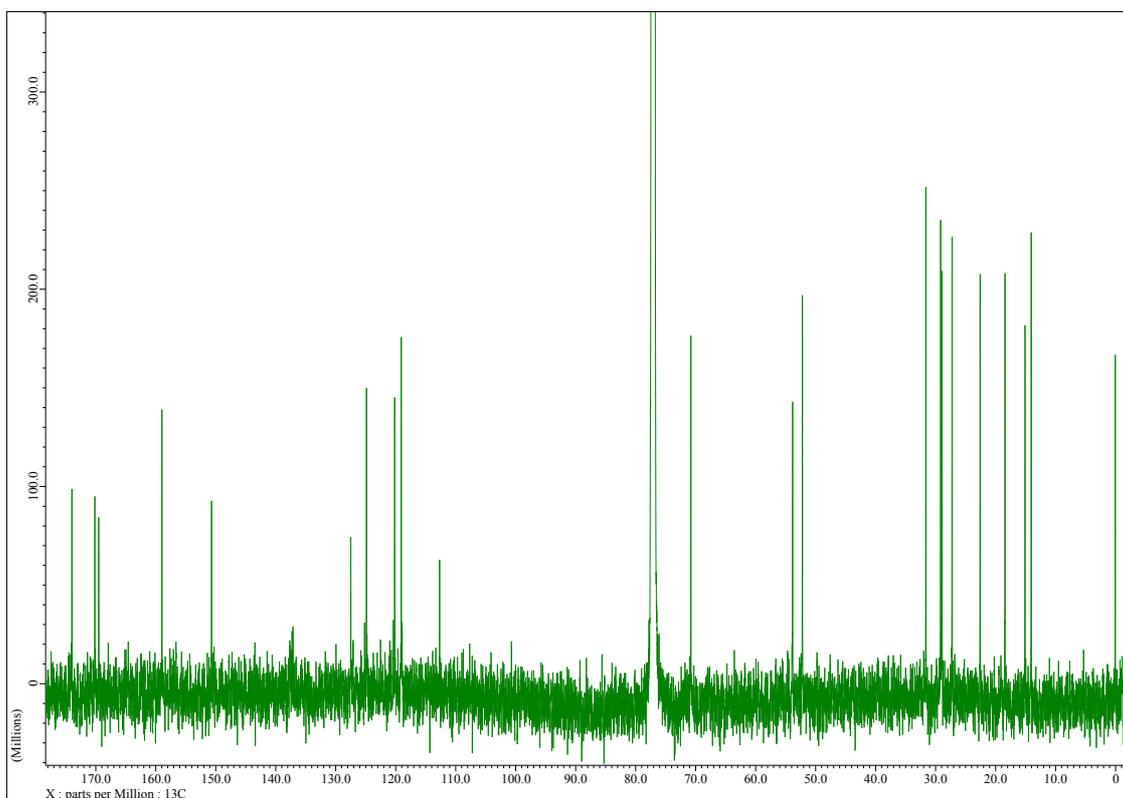


(e) DA-4 (9)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)

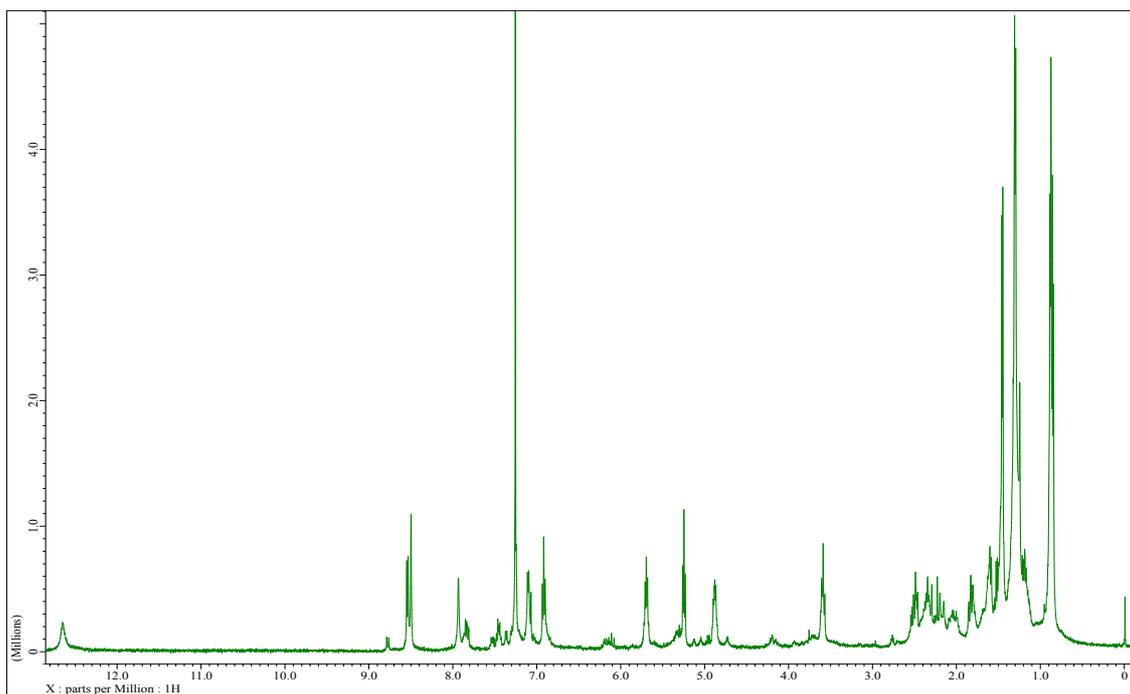


$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)

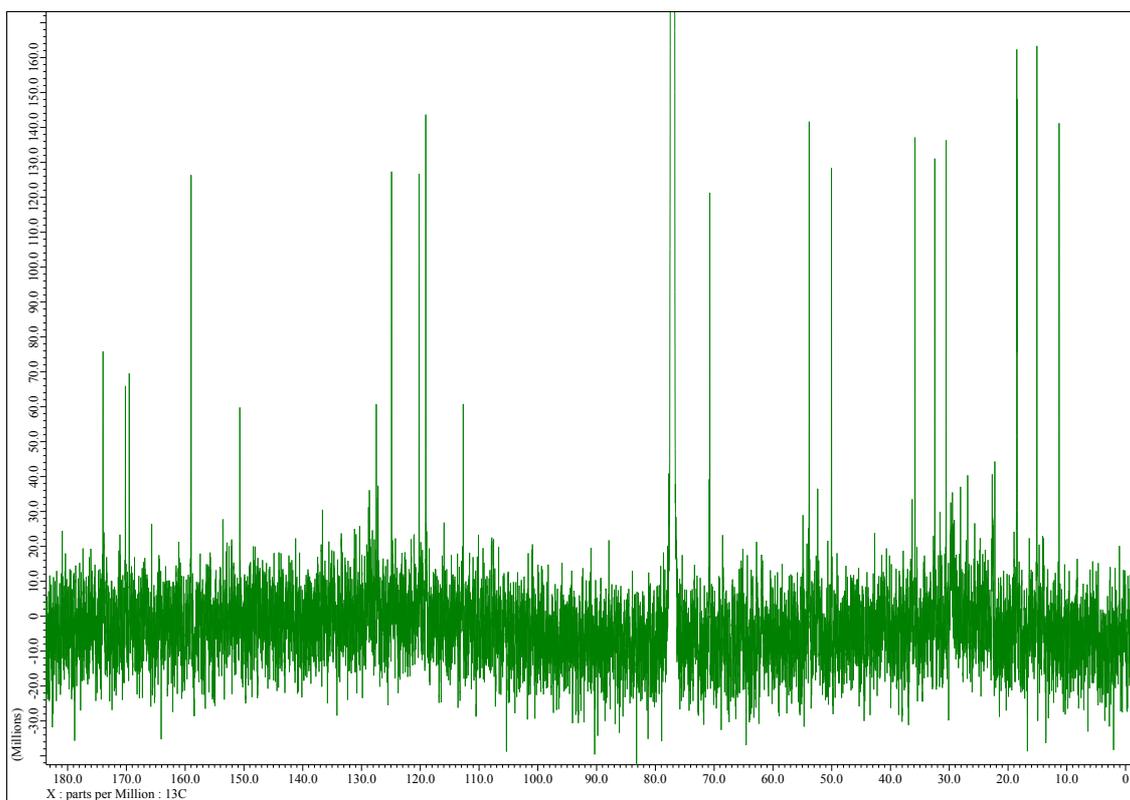


(f) **DA-15 (10)**

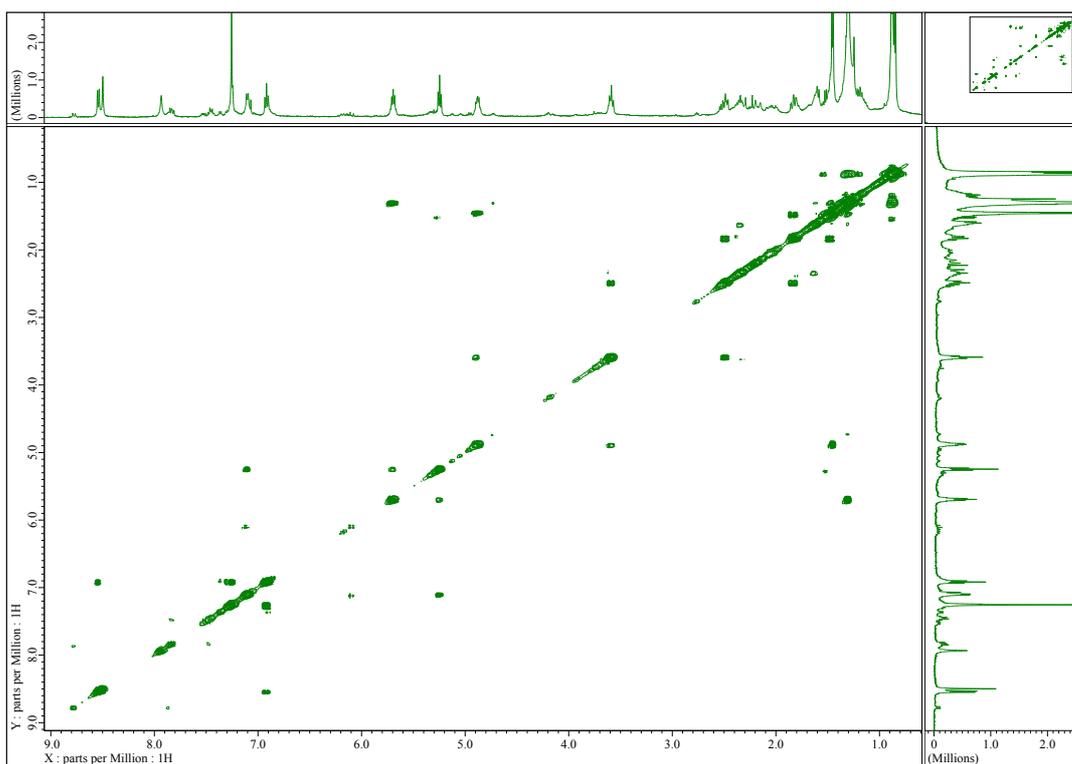
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)



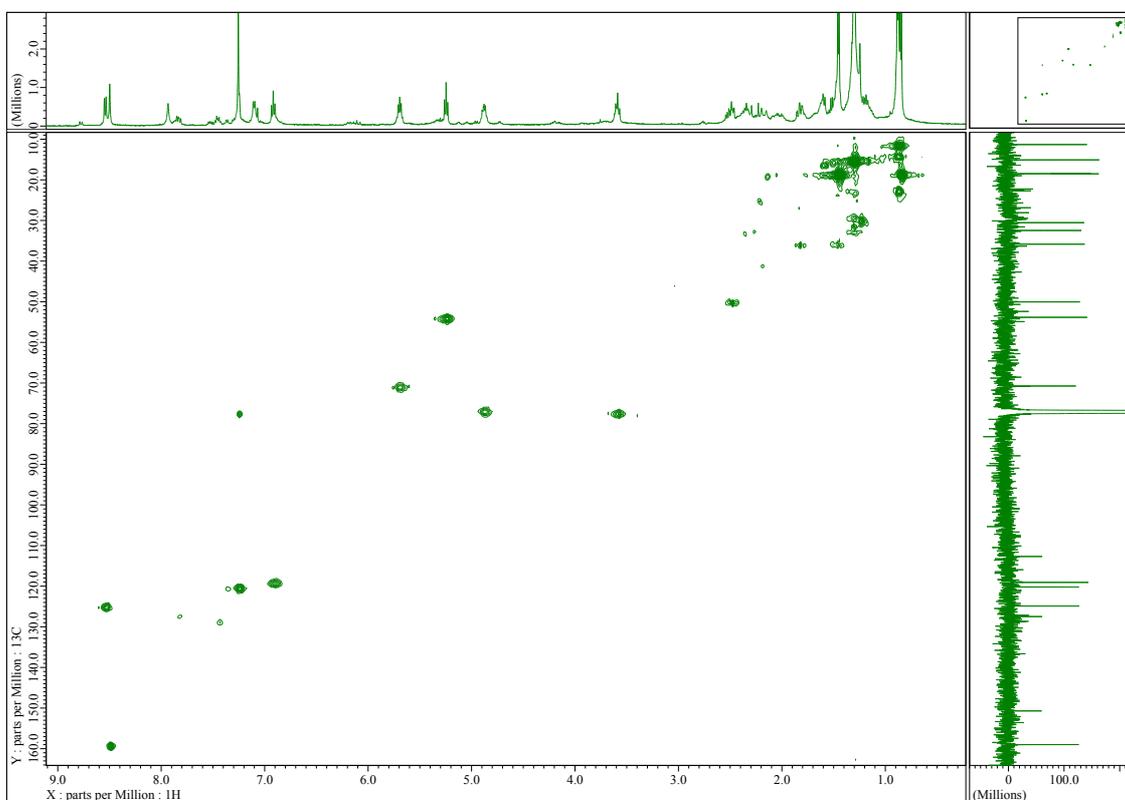
^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz)



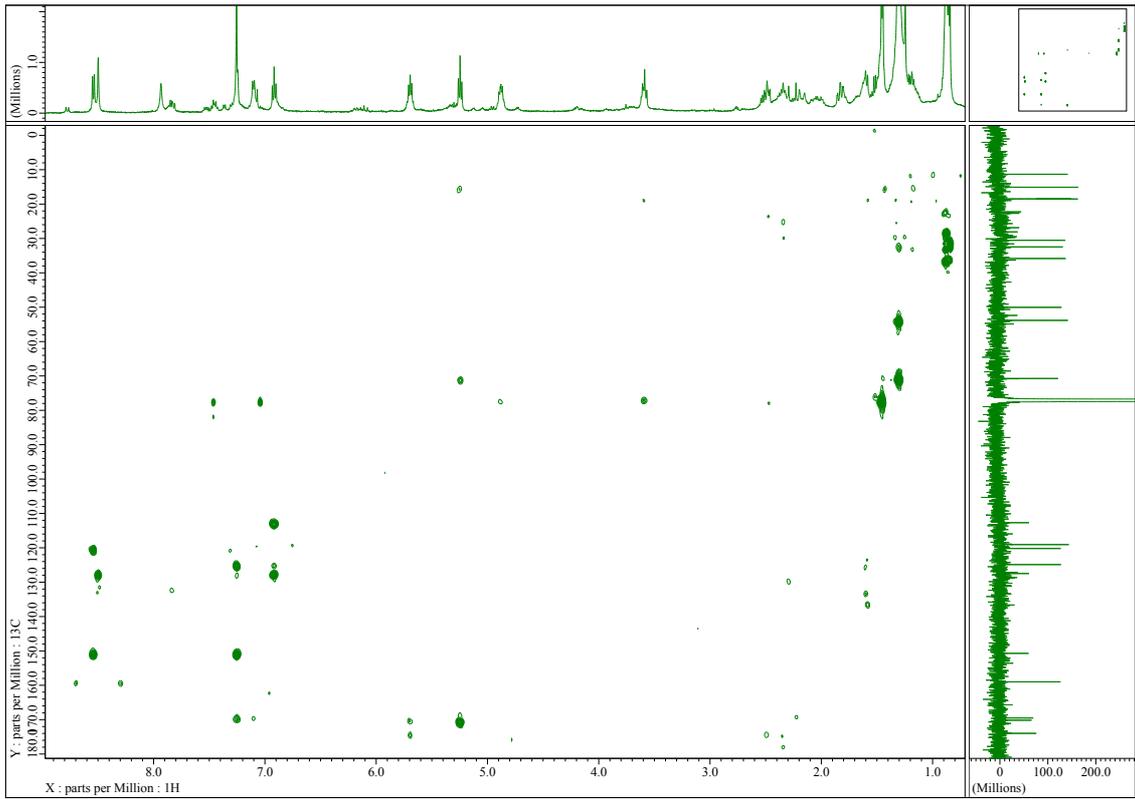
COSY (CDCl_3 , 500 MHz)



HMQC (CDCl_3 , 500MHz)

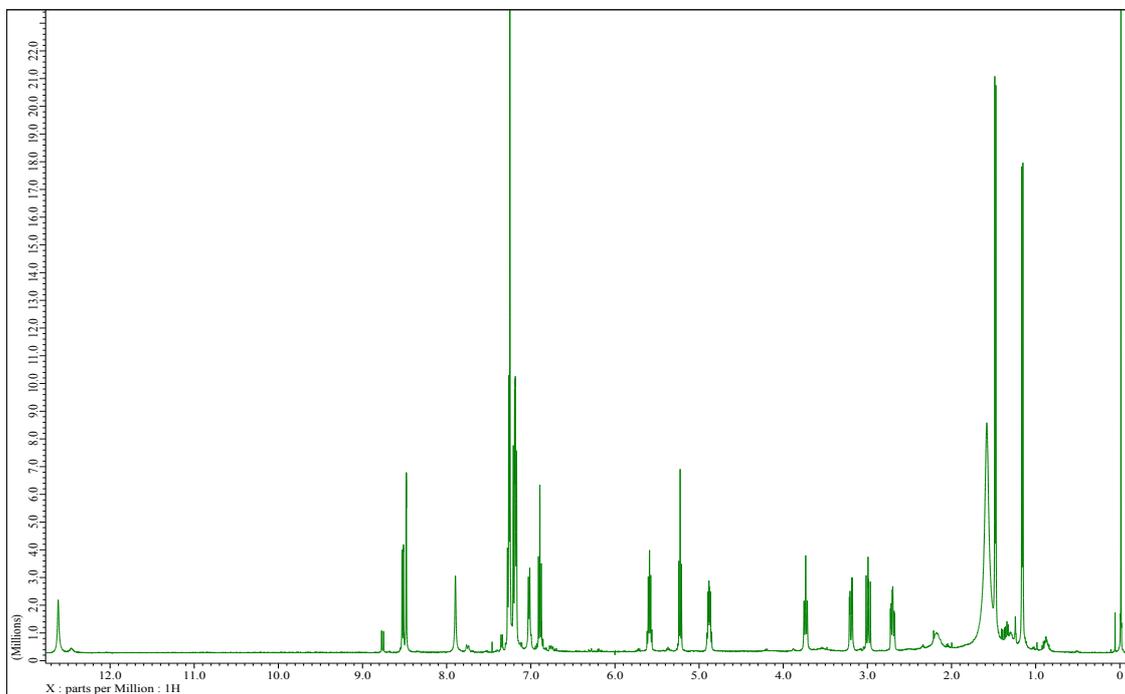


HMBC (CDCl_3 , 500 MHz)

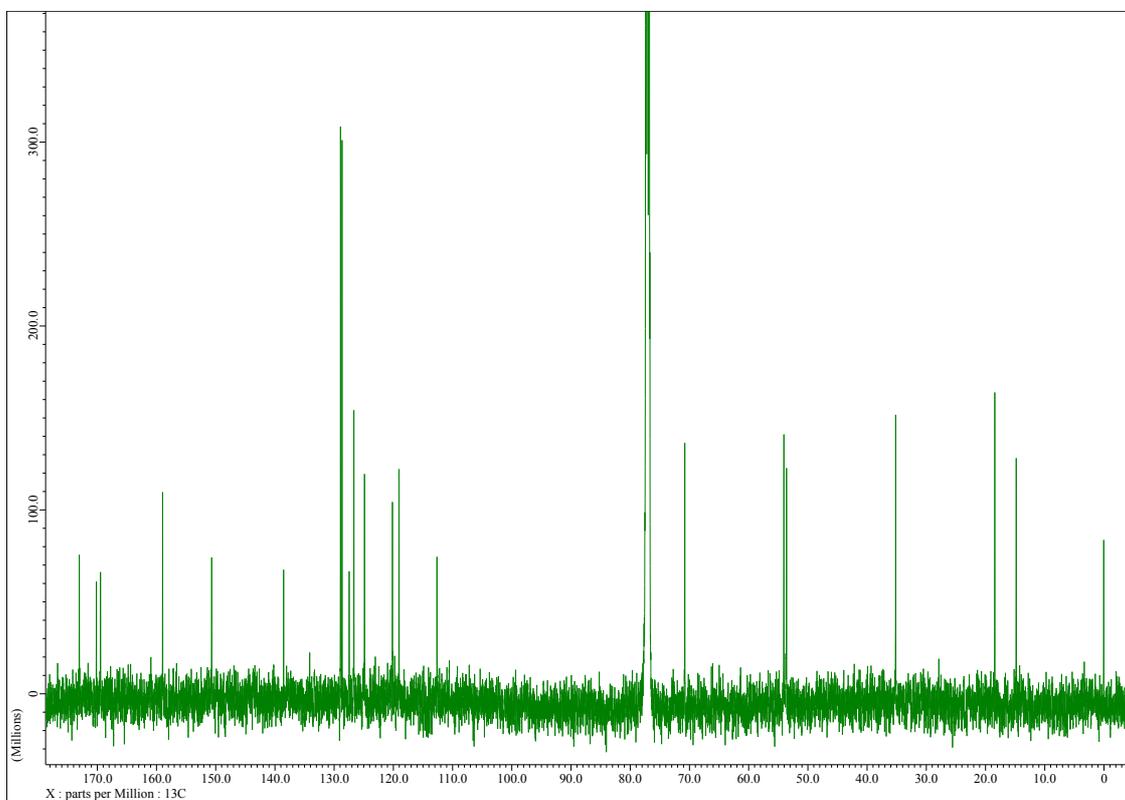


(g) Splenocin J (11)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)

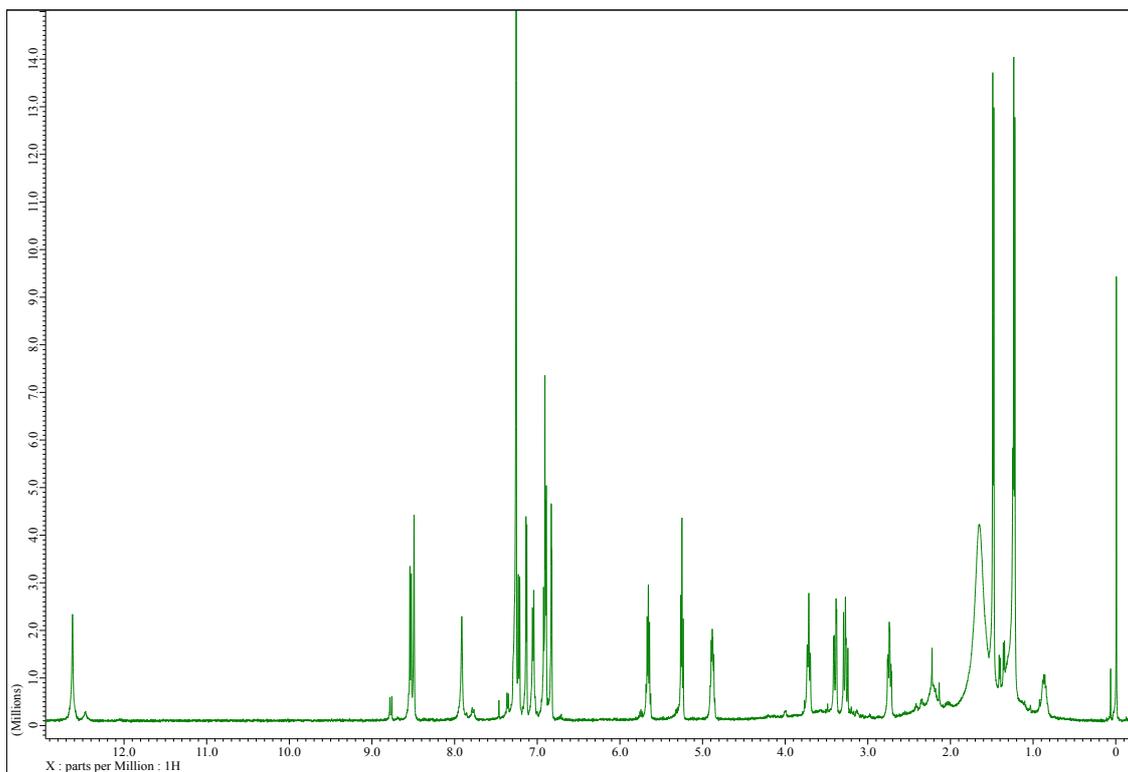


$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)

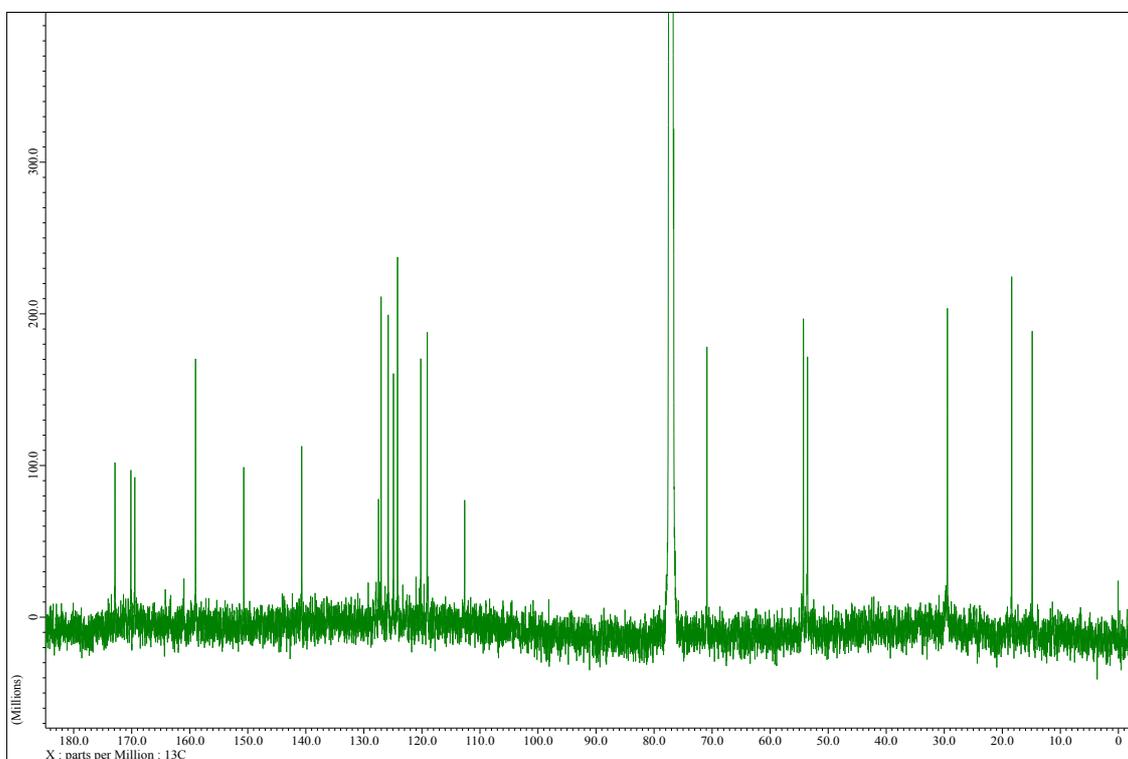


(h) DA-16 (12)

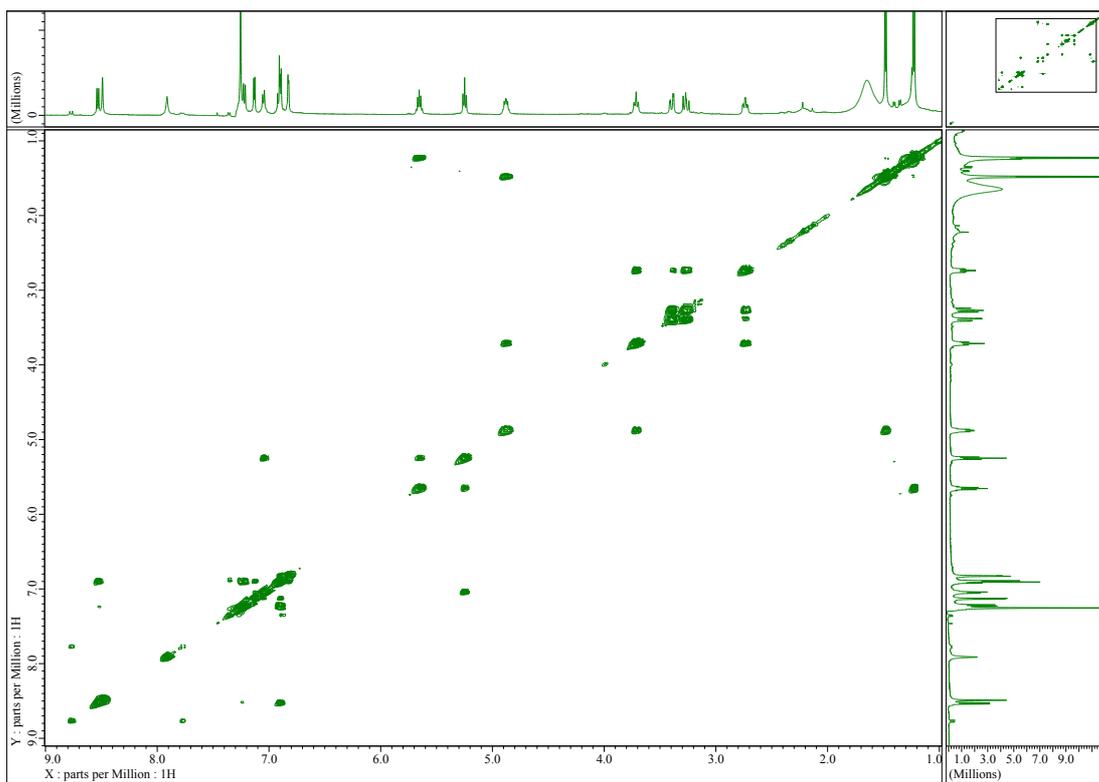
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)



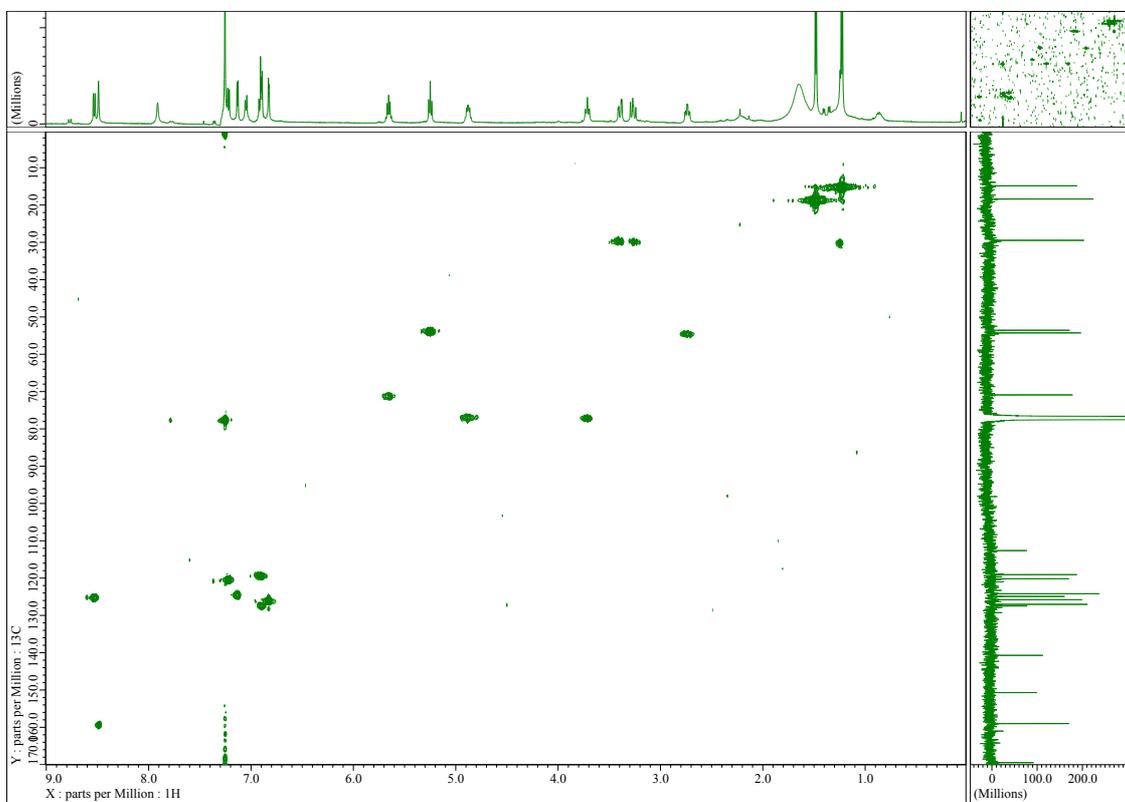
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)



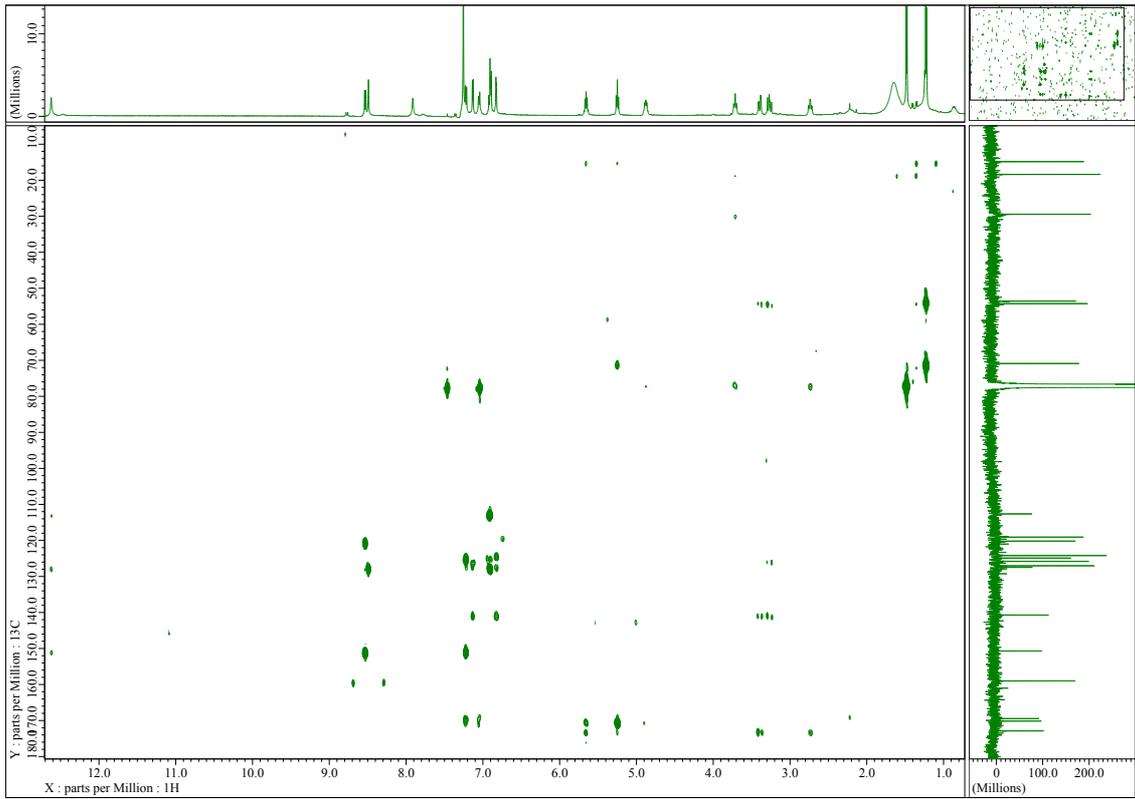
COSY (CDCl_3 , 500 MHz)



HMOC (CDCl₃, 500 MHz)

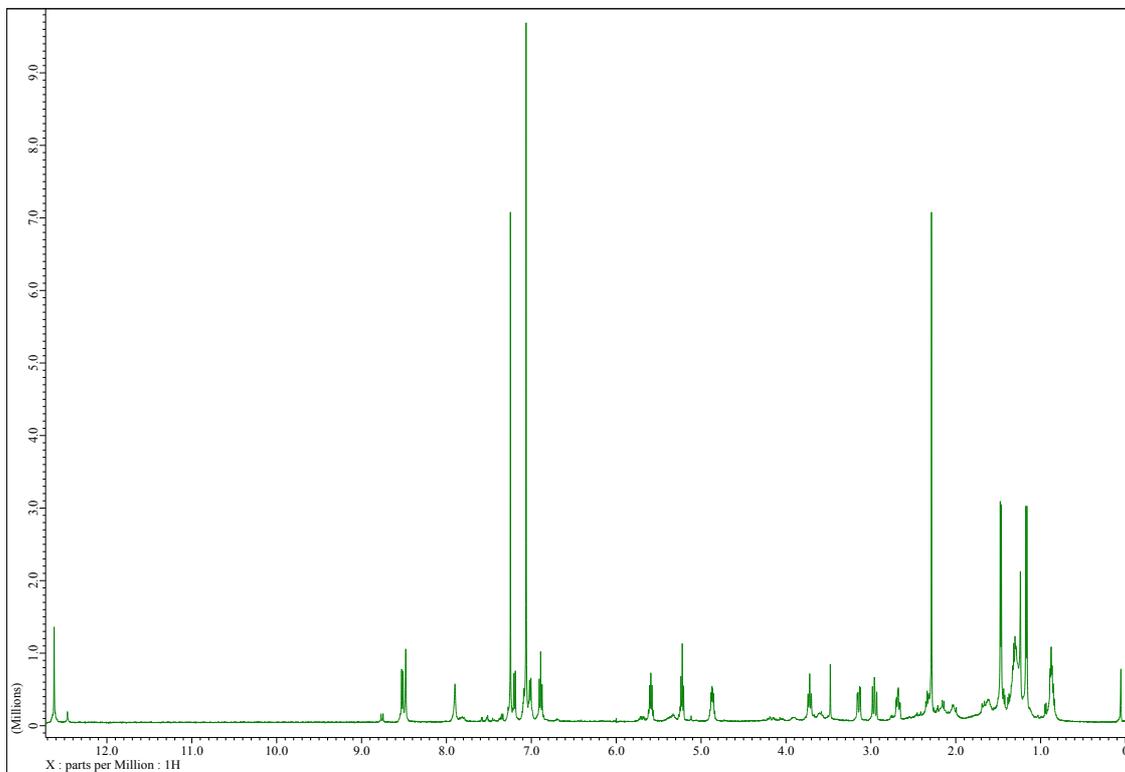


HMBC (CDCl₃, 500 MHz)

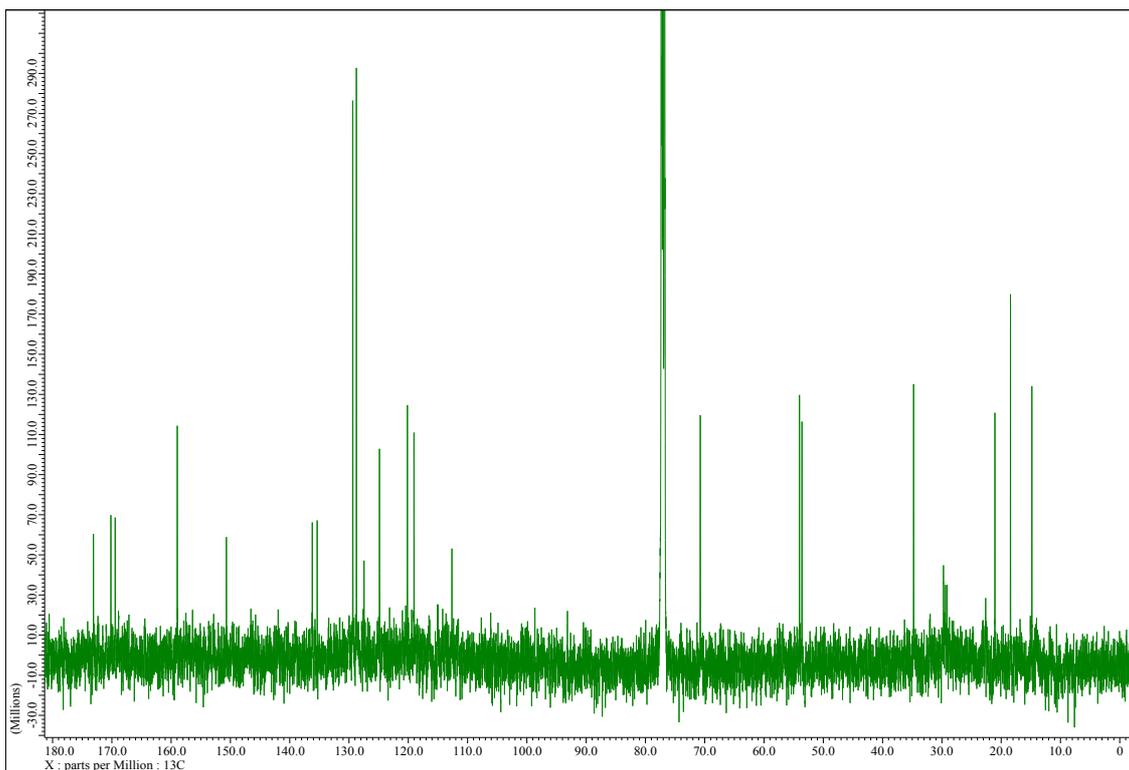


(i) DA-17 (13)

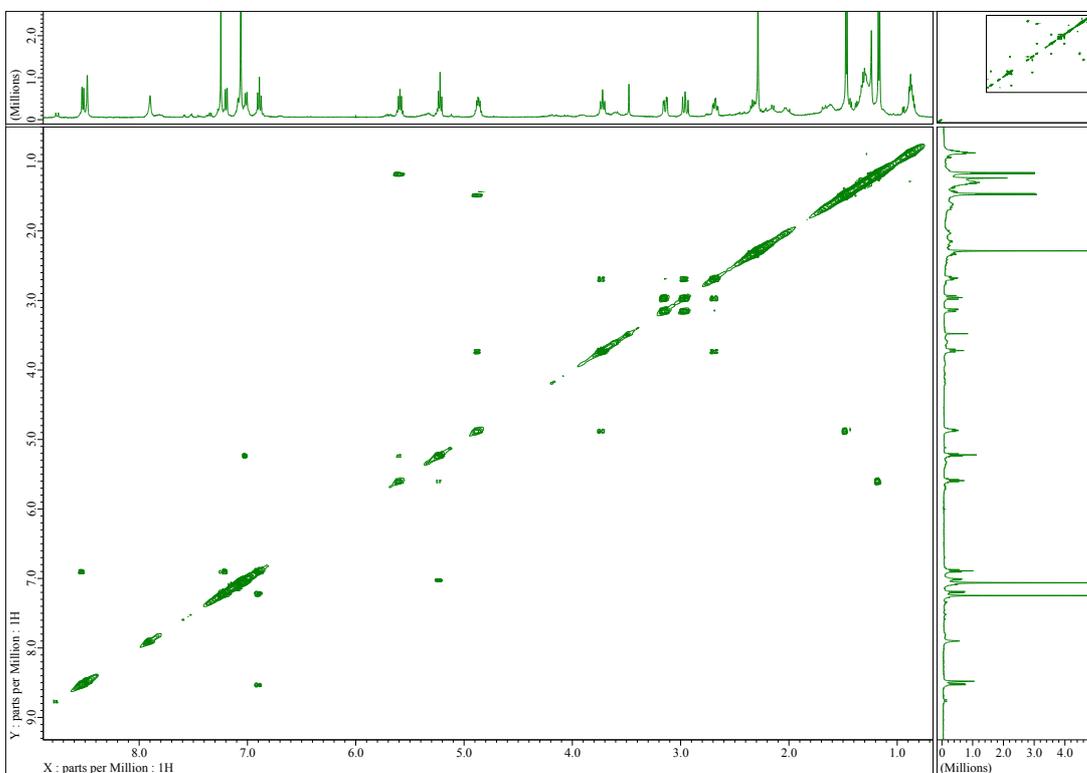
$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)



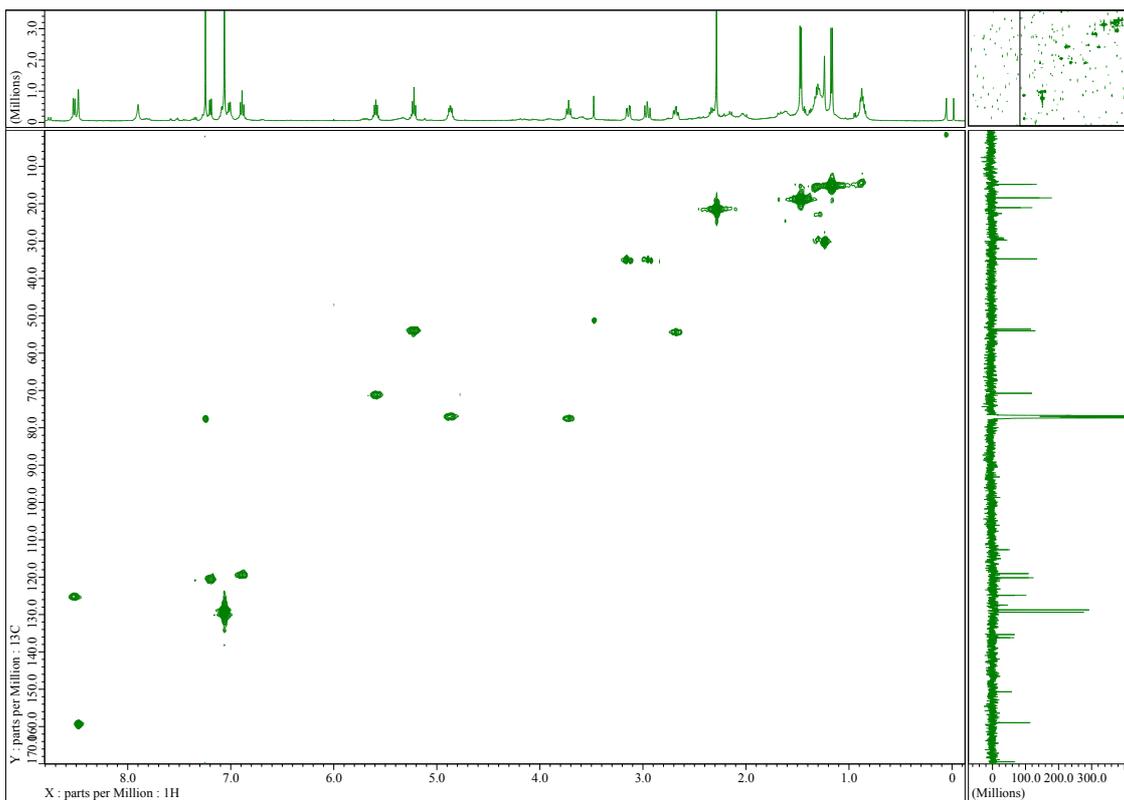
$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)



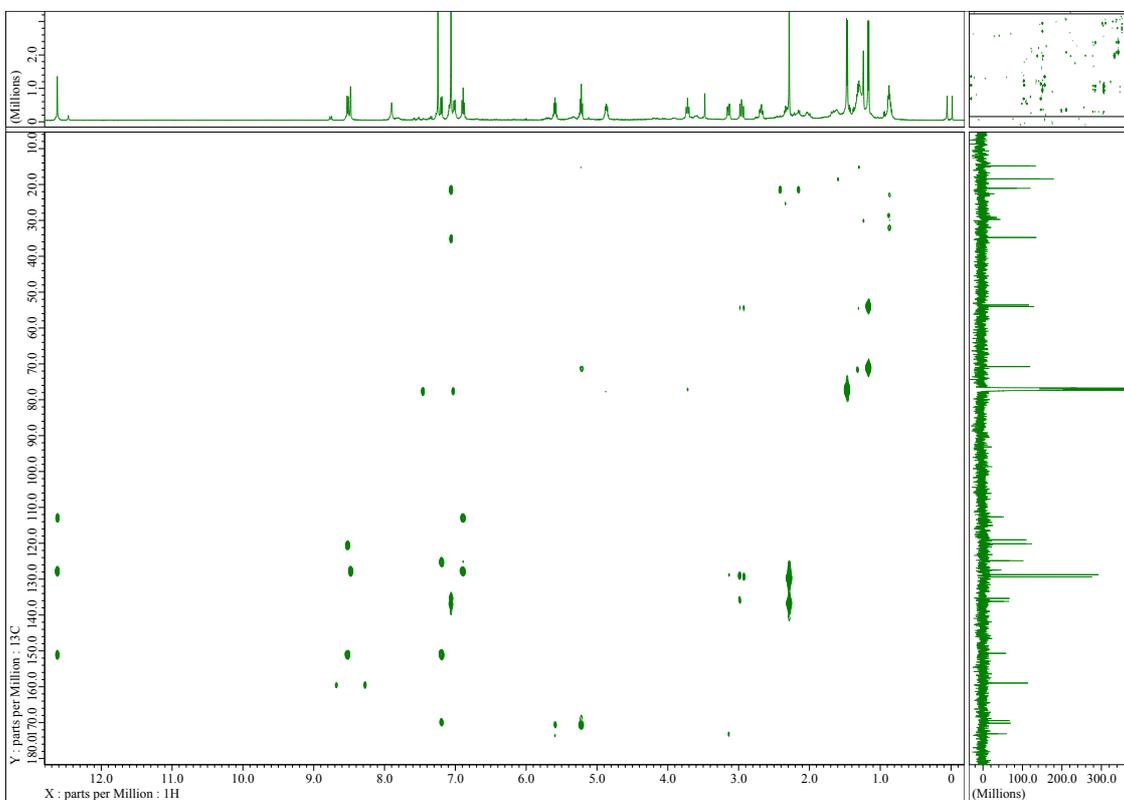
COSY (CDCl₃, 500 MHz)



HMQC (CDCl₃, 500 MHz)

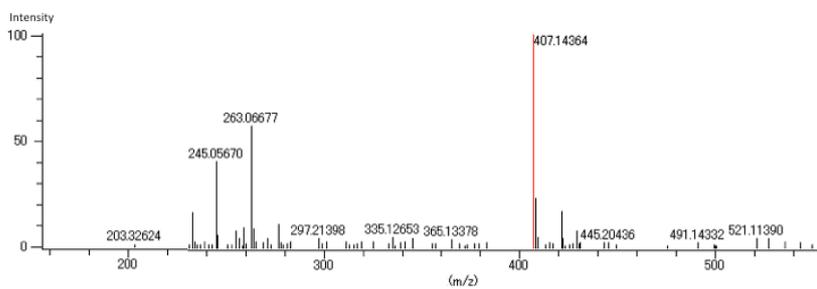


HMBC (CDCl_3 , 500 MHz)

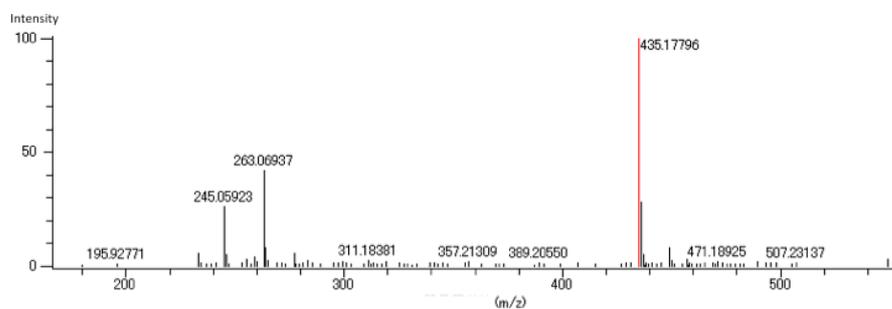


Deacylantimycin 類の Mass Spectroscopy スペクトル

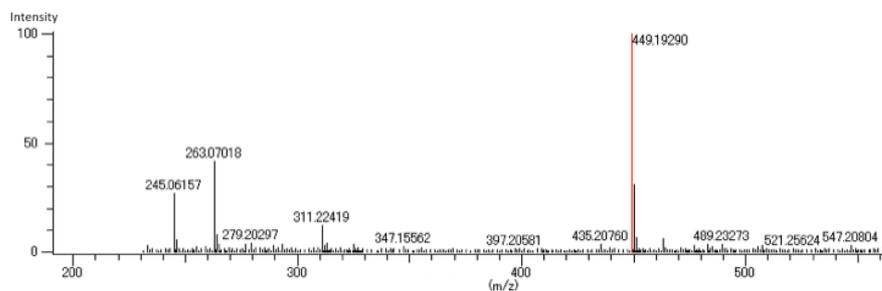
(a) DA-14 (5)



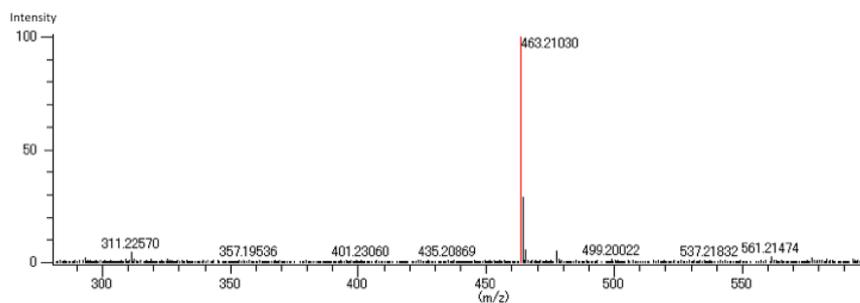
(b) DA-1 (6)



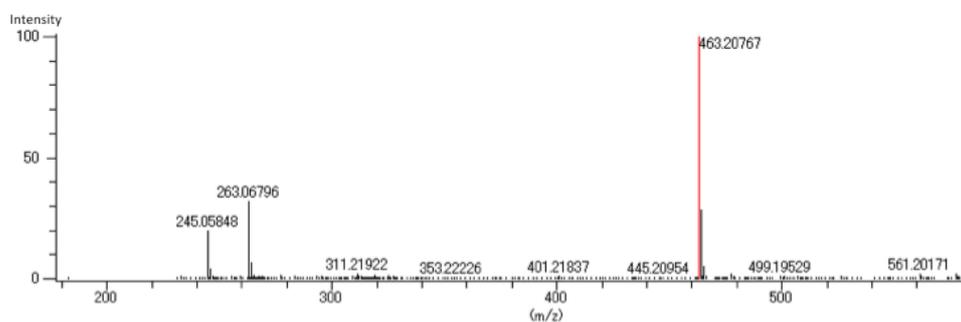
(c) DA-2 (7)



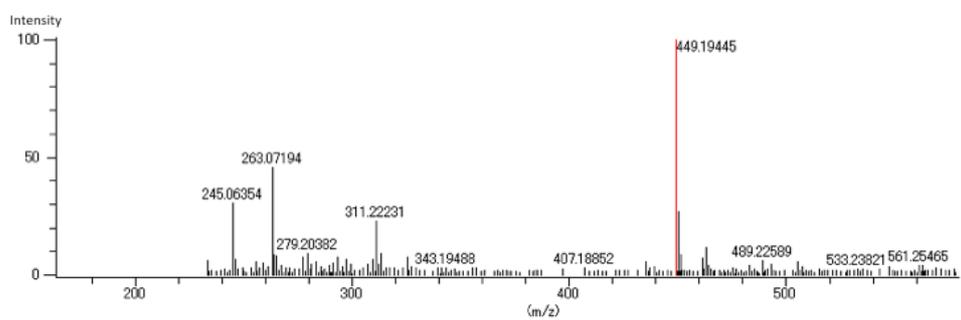
(d) DA-3 (8)



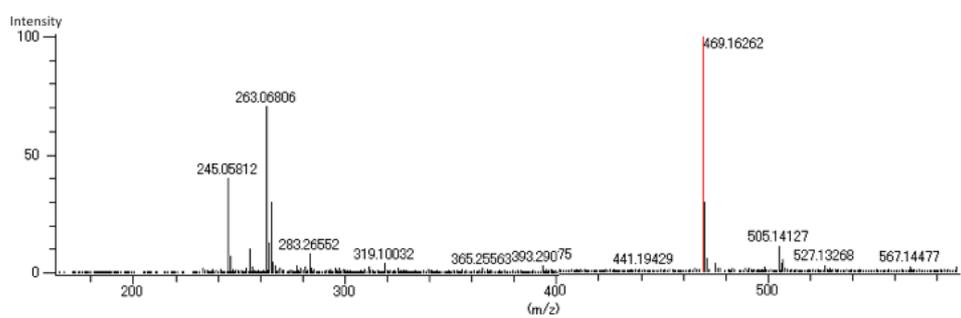
(e) DA-4 (9)



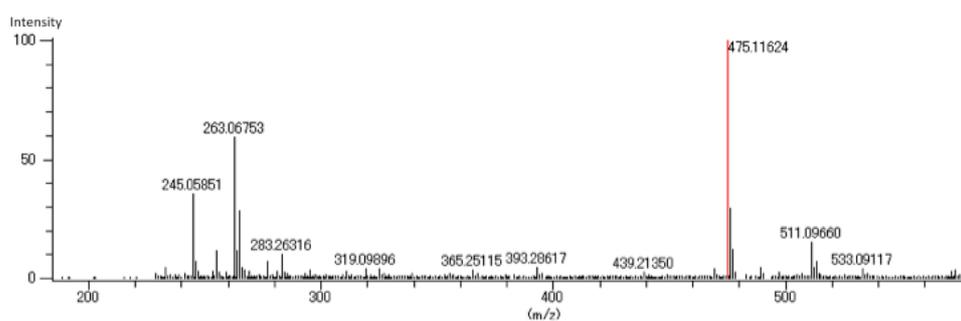
(f) DA-15 (10)



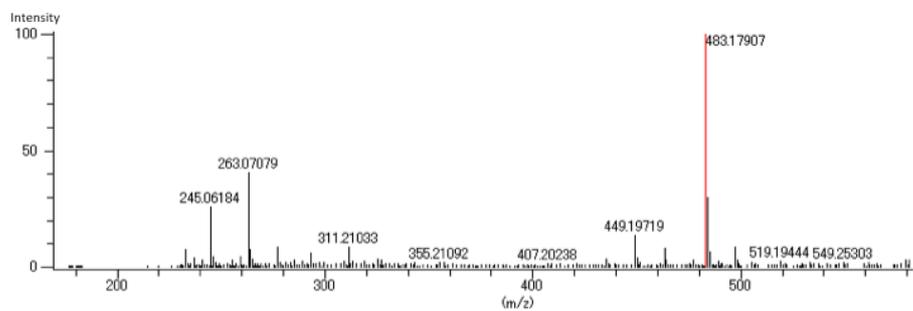
(g) Splenocin J (11)



(h) DA-16 (12)



(i) DA-17 (13)



第3章実験項

菌株・ベクター・酵素・機器類の概要

第二章第7節に記述されたものと同様に行った。なお 900 MHz NMR (^1H)、 225 MHz (^{13}C) は Bruker Biospin nd900d spectrometer を用いた。

遺伝子シーケンシング・遺伝子分析

放線菌のゲノムは lysozyme/SDS による溶菌の後フェノールクロロホルム抽出により常法に従って行った。ゲノム DNA は次世代シーケンサーでの解析のため、NEBNext Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent (New England BioLabs)を用いてプロトコルに従い断片化し、Ion PGM Sequencing 400 kits を用いプロトコルに従い Ion 318 chips (Life Technologies) にサンプルを調整した。調整されたサンプルは Ion Torrent PGM platform を用いて分析されゲノムシーケンシングを行った。遺伝子の ORF 予測は FramePlot 4.0beta (<http://nocardia.nih.gov/fp4/>)を用い、ORF の機能予測は BLAST search により行った。アライメントは Geneious platform^[57]を用い MUSTLE 法^[58]により行い、系統樹作成は近隣結合法および最尤法を用い Geneious platform の Geneious tree builder および RAxML 7.2.8 plugin^[59]によりそれぞれ作成した。

アミノポリオール類の発酵生産・単離精製

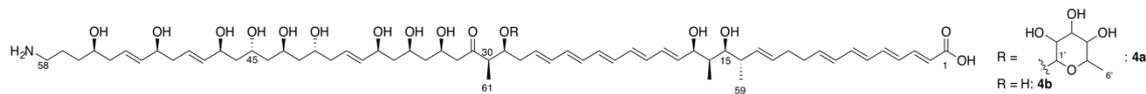
S.blastmyceticus を 2 L 三角フラスコに入れた TP 培地(2.0% glucose, 1.5% hipolypeptone (Nihon Seiyaku), 0.5% casamino acids (Difco), 0.5% NaCl, 0.6% meat extract (Kyokuto) and 1.0% tuna extract (Kyokuto), pH = 7.0) 1 L に孢子より植菌し、30 °C, 150 rpm, で 5 日培養後、4500 rpm で集菌し、菌体を 500 mL の $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=1:1$ で一晩抽出、減圧蒸留し MeOH 5 ml に溶解、これを LH20 カラム(3 x75 cm)により MeOH 溶媒を用い分離、0.8 ml/min で4時間後に溶出されるフラクションから HPLC 分取により(A:ddH₂O + 50 mM AcONH₄, B:MeCN; 0 min B 35% - 30 min B 45%) mediomycin A を単離した。

中外製薬(株)より分与いただいた *S.neyagawaensis* NR55 を 2 L 三角フラスコに入れた TP 培地 1 L に孢子より植菌し、30 °C, 150 rpm, で 5 日培養後、4500 rpm で集菌し、菌体を 500 mL の $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=1:1$ で一晩抽出、減圧蒸留し MeOH 5 ml に溶解、これを LH20 カラム(3 x75 cm)により MeOH 溶媒を用い分離、0.8 ml/min で4時間後に溶出されるフラクションから HPLC 分取により(A:ddH₂O + 50 mM AcONH₄, B:MeCN; B 45% isocratic)単離した。(mediomycin A: 35 mg, mediomycin B: 2 mg, neotetrafabricin A: 28 mg, neotetrafabricin B: 6 mg)

¹H NMR of mediomycin A (500 MHz, CD₃OD) δ 7.15 (d, *J* = 10.3 Hz, 1H), 6.53–6.41 (m, 2H), 6.32–6.15 (m, 11H), 5.90 (dt, *J* = 15.2, 6.8 Hz, 1H), 5.77–5.65 (m, 5H), 5.60–5.41 (m, 5H), 4.67 (q, *J* = 6.0 Hz, 1H), 4.29–4.23 (m, 3H), 4.21 (q, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.13 (33, m, 1H), 3.99 (13, m, 1H), 3.86–3.78 (m, 4H), 3.39 (dd, *J* = 6.2, 4.9 Hz, 1H), 2.95 (m, 2H), 2.77 (dd, *J* = 17.3, 7.8 Hz, 1H), 2.72 (dd, *J* = 17.3, 4.5 Hz, 1H), 2.61–2.51 (m, 2H), 2.34 (m, 1H), 2.26 – 2.22 (m, 8H), 2.16 (m, 2H), 1.91 (s, 3H), 1.81–1.68 (m, 3H), 1.68–1.52 (m, 12H), 1.46 (m, 1H), 1.12 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); UV (MeCN/H₂O, 1:1) I_{max} 307, 323, 338, 359, 379 nm; HRMS *m/z* 1174.6394 [M][−] (calcd. for C₆₂H₉₆NO₁₈S 1174.6348).

¹H NMR of mediomycin B (500 MHz, CD₃OD) δ 7.08 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 6.46–6.42 (m, 2H), 6.31–6.15 (m, 11H), 5.87 (dt, *J* = 15.2, 6.8 Hz, 1H), 5.77–5.66 (m, 5H), 5.60–5.42 (m, 5H), 4.31–4.21 (m, 3H), 4.14 (m, 1H), 4.00 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.87–3.77 (m, 5H), 3.39 (m, 1H), 2.95 (m, 2H), 2.73 (dd, *J* = 17.3, 4.5 Hz, 1H), 2.66–2.60 (m, 3H), 2.34 (m, 1H), 2.31 – 2.18 (m, 8H), 2.16 (m, 2H), 1.92 (s, 3H), 1.83–1.68 (m, 3H), 1.68–1.51 (m, 12H), 1.47 (m, 1H), 1.10 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.97 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H), 0.94 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H); UV (MeCN/H₂O, 1:1) I_{max} 307, 323, 338, 359, 379 nm; HRMS *m/z* 1094.6787 [M][−] (calcd. for C₆₂H₉₆NO₁₈S 1094.6779).

Neotetrafibricin A/B の NMR スペクトル表



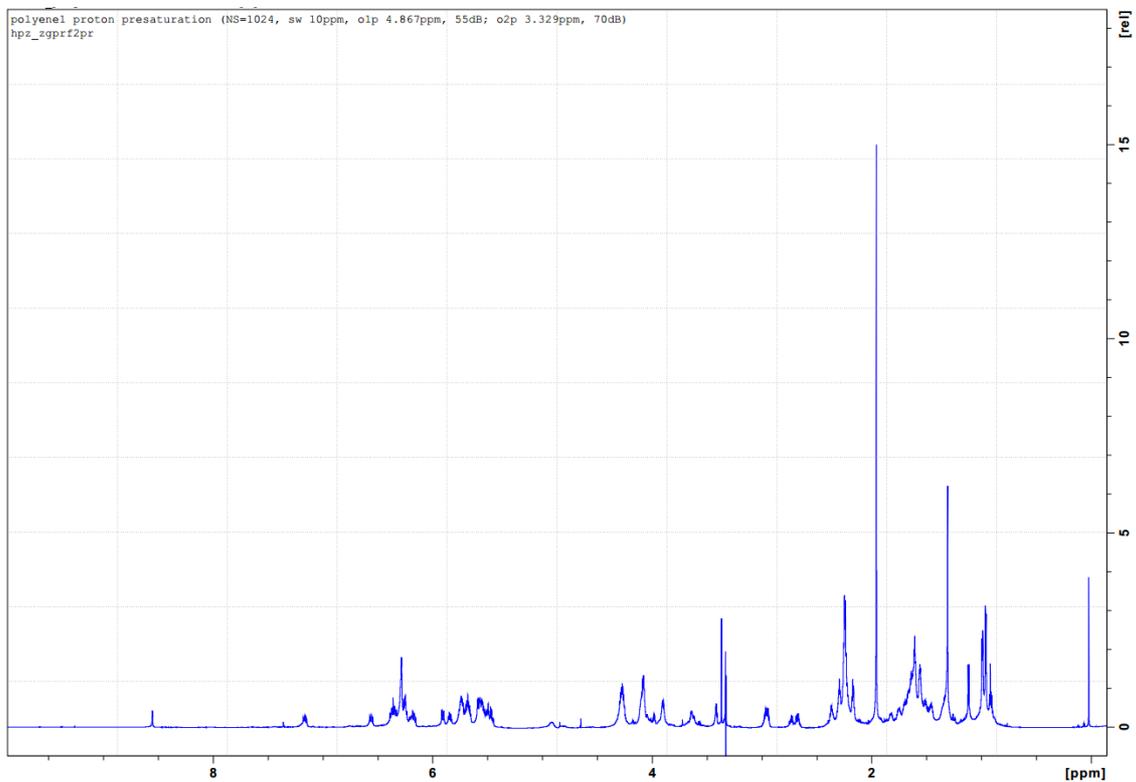
4a			4b		
No.	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	
1	174.1	—	174.2	—	
2	126.6	5.86 (d, 14.9)	126.7	5.87 (d, 15.1)	
3	143.2	7.12 (dd, 14.9, 10.9)	143.2	7.12 (dd, 15.1, 11.3)	
4	131.3	6.31 (m)	131.4	6.31 (dd, 14.8, 11.3)	
5	140.3	6.52 (dd, 14.8, 11.0)	140.3	6.52 (dd, 14.8, 11.2)	
6	131.5	6.21 (m)	131.6	6.21 (dd, 14.8, 11.2)	
7	137.5	6.33 (dd, 14.6, 10.7)	137.5	6.33 (dd, 14.8, 10.9)	
8	132.2	6.13 (dd, 14.9, 10.7)	132.3	6.13 (dd, 15.1, 10.9)	
9	137.8	5.80 (dt, 14.9, 7.1)	137.8	5.80 (dt, 15.1, 7.0)	
10	34.1	2.20 (m)	34.1	2.20 (m)	
11	33.4	2.12 (m)	33.5	2.12 (m)	
12	131.3	5.44 (m)	131.4	5.45 (m)	
13	134.5	5.43 (m)	134.7	5.42 (dd, 15.2, 8.5)	
14	41.7	2.33 (m)	41.7	2.32 (m)	
15	77.8	3.37 (m)	77.8	3.37 (t, 5.6)	
16	42.5	1.64 (m)	42.6	1.63 (m)	
17	75.2	4.23 (m)	75.2	4.24 (m)	
18	137.3	5.69 (m)	137.3	5.69 (m)	
19	131.9	6.24 (m)	132.0	6.25 (m)	
20	133.7	6.24 (m)	133.7	6.25 (m)	
21	133.4	6.24 (m)	133.1	6.25 (m)	
22	134.0	6.24 (m)	134.0	6.25 (m)	
23	134.0	6.24 (m)	134.1	6.25 (m)	
24	134.1	6.24 (m)	134.1	6.25 (m)	
25	134.2	6.24 (m)	134.3	6.25 (m)	
26	134.6	6.15 (m)	134.6	6.16 (m)	
27	131.4	5.68 (m)	132.2	5.72 (m)	
28	38.0	2.38 (m)	40.0	2.25 (dt, 6.4)	
29	80.7	3.98 (m)	72.7	3.94 (dt, 6.4, 5.5)	
30	51.3	2.77 (m)	53.3	2.63 (m)	
31	213.6	—	214.4	—	
32	50.5	2.69 (dd, 16.7, 7.6), 2.62 (dd, 16.7, 4.6)	50.3	2.70 (dd, 16.8, 8.5), 2.63 (m)	
33	67.3	4.19 (m)	67.3	4.22 (m)	
34	45.2	1.57 (m), 1.47 (m)	45.5	1.60 (m), 1.47 (m)	
35	69.3	3.86 (m)	69.3	3.85 (m)	
36	45.3	1.66 (m)	45.5	1.66 (m)	
37	72.0	4.22 (m)	72.1	4.22 (m)	
38	136.6	5.49 (m)	136.6	5.50 (m)	
39	129.1	5.70 (m)	129.2	5.69 (m)	
40	41.4	2.21 (m)	41.7	2.20 (m)	
41	69.0	3.87 (m)	69.2	3.86 (m)	
42	45.4	1.47 (m)	45.6	1.46 (m)	
43	66.4	4.06 (m)	66.6	4.06 (m)	
44	46.6	1.52 (m)	46.8	1.51 (m)	
45	66.3	4.05 (m)	66.4	4.04 (m)	
46	46.2	1.56 (m)	46.3	1.56 (m)	
47	70.4	4.25 (m)	70.4	4.24 (m)	
48	137.1	5.52 (m)	137.3	5.54 (m)	
49	127.6	5.64 (m)	127.6	5.63 (m)	
50	42.0	2.24 (m), 2.20 (m)	42.1	2.25 (m), 2.20 (m)	
51	73.3	4.04 (m)	73.3	4.04 (m)	
52	136.6	5.51 (m)	136.7	5.51 (m)	
53	128.6	5.65 (m)	128.6	5.65 (m)	
54	41.5	2.20 (m)	41.7	2.19 (m)	
55	71.6	3.60 (m)	71.6	3.64 (m)	
56	33.5	1.58 (m), 1.43 (m)	34.3	1.58 (m), 1.43 (m)	
57	25.2	1.78 (m), 1.71 (m)	25.3	1.78 (m), 1.71 (m)	
58	40.9	2.90 (m)	41.0	2.92 (m)	
59	18.5	0.95 (d, 6.7)	18.6	0.94 (d, 6.8)	
60	8.8	0.92 (d, 6.7)	8.9	0.92 (d, 6.8)	
61	11.4	1.08 (d, 6.7)	11.1	1.08 (d, 6.8)	
1'	102.6	4.75 (brs)	—	—	
2'	72.4	3.76 (brs)	—	—	
3'	72.4	3.59 (m)	—	—	
4'	73.9	3.36 (m)	—	—	
5'	70.3	3.64 (m)	—	—	
6'	18.0	1.21 (d, 6.0)	—	—	

5a: in CD₃OD, 500 MHz

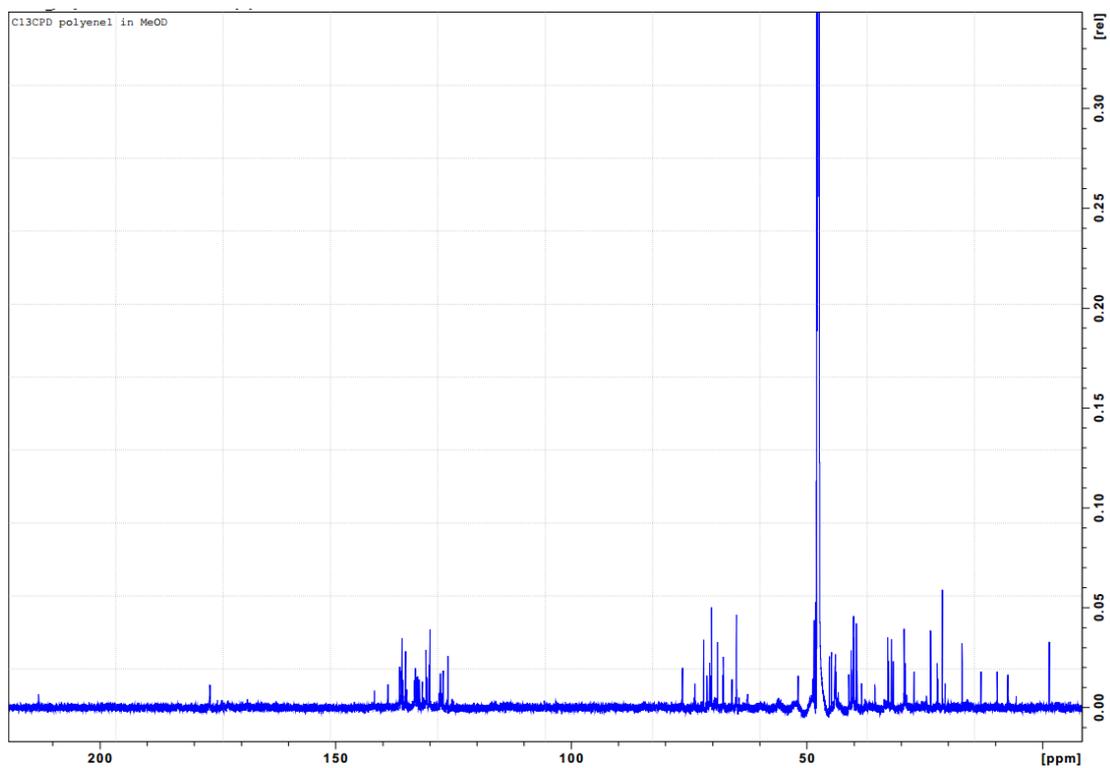
5b: in CD₃OD, 900 MHz

Neotetrafibricin B の NMR スペクトル

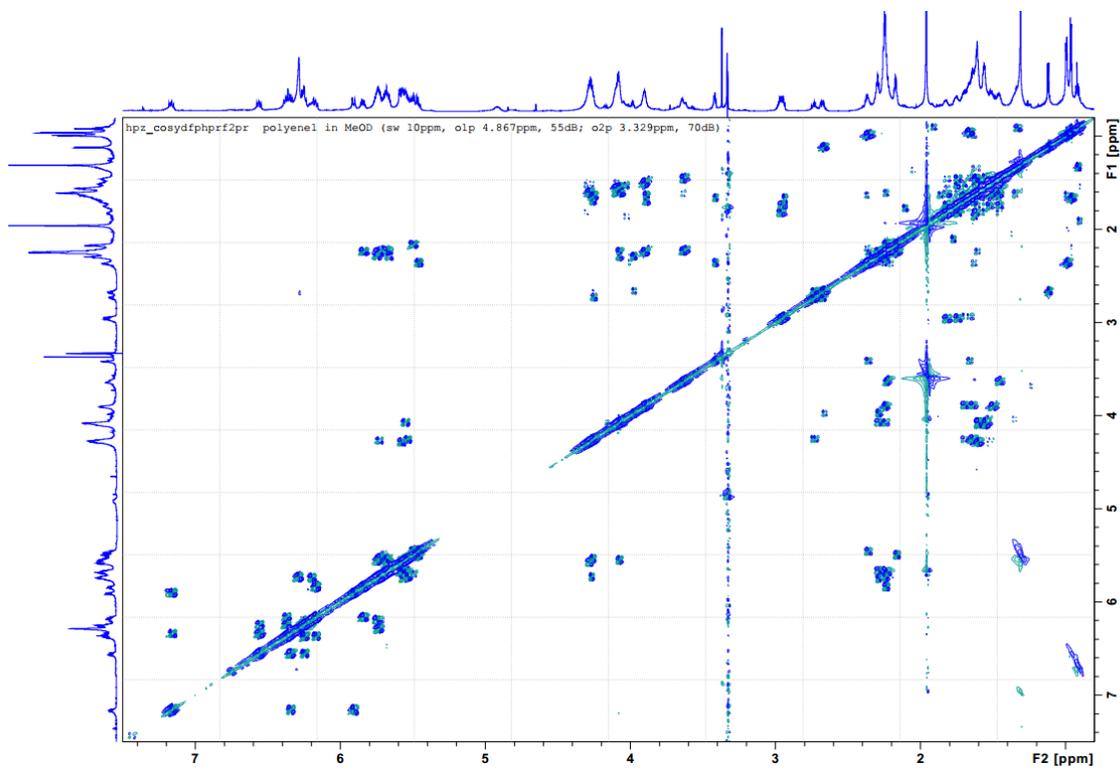
$^1\text{H-NMR}$ of neotetrafibricin B (CD_3OD , 900 MHz, presaturation for water and methanol)



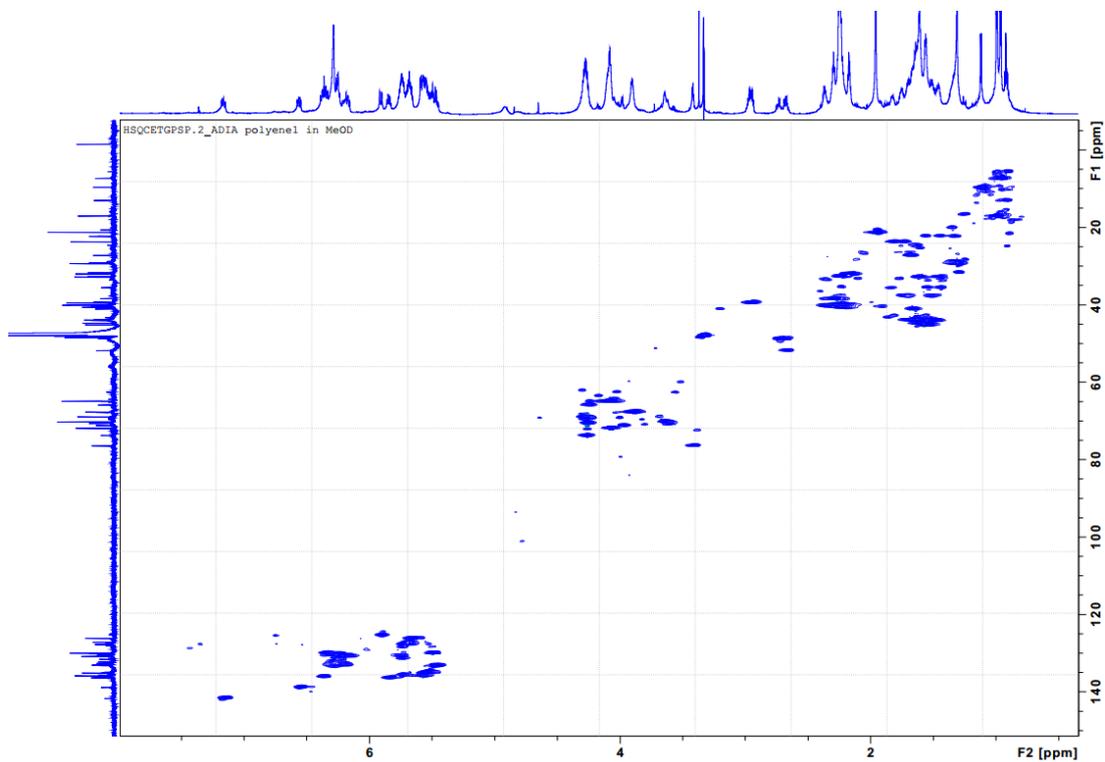
$^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 225 MHz)



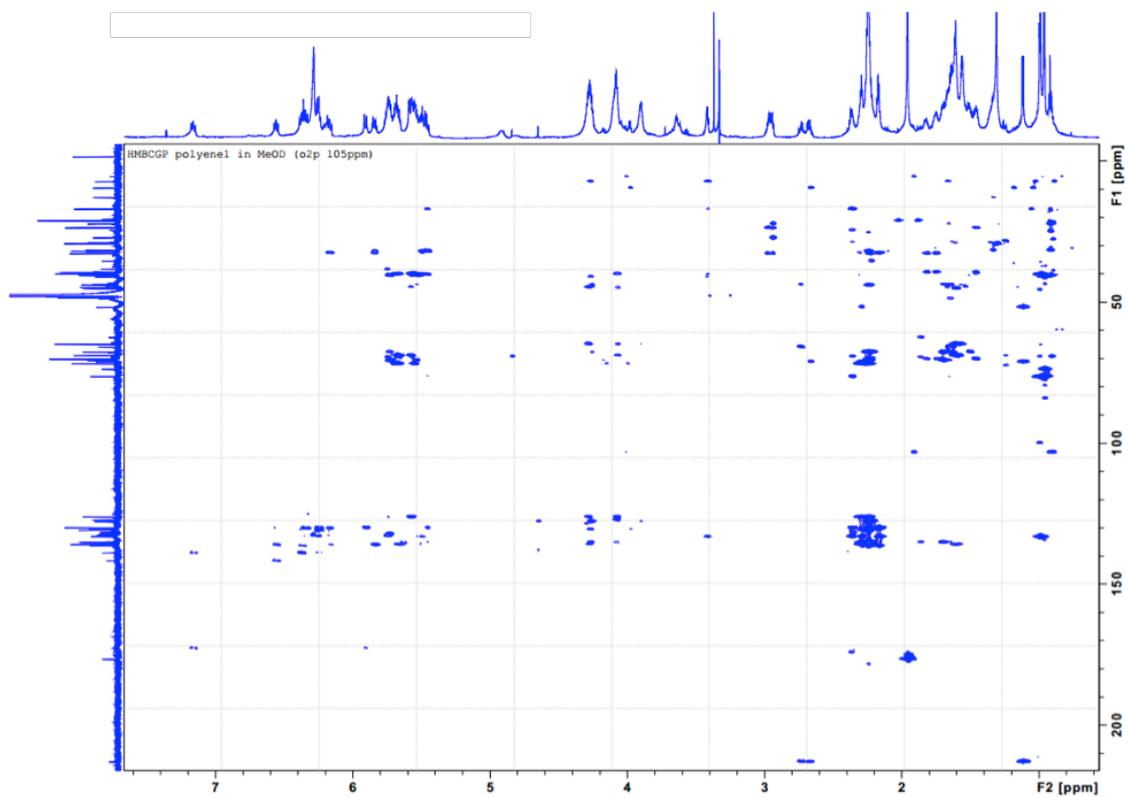
DQF-COSY (CD₃OD, 900 MHz)



HSQC (CD₃OD, 900 MHz)

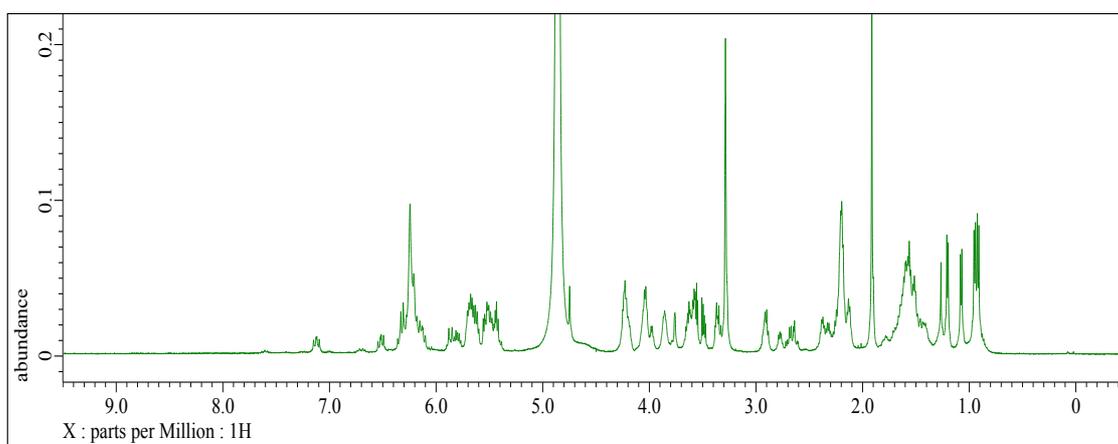


HMBC (CD₃OD, 900 MHz)

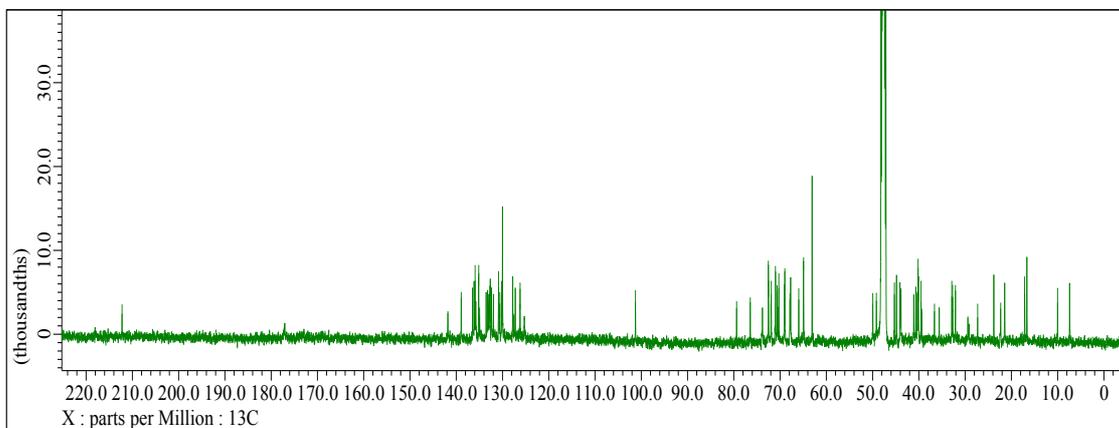


Neotetrafibricin A の NMR スペクトル

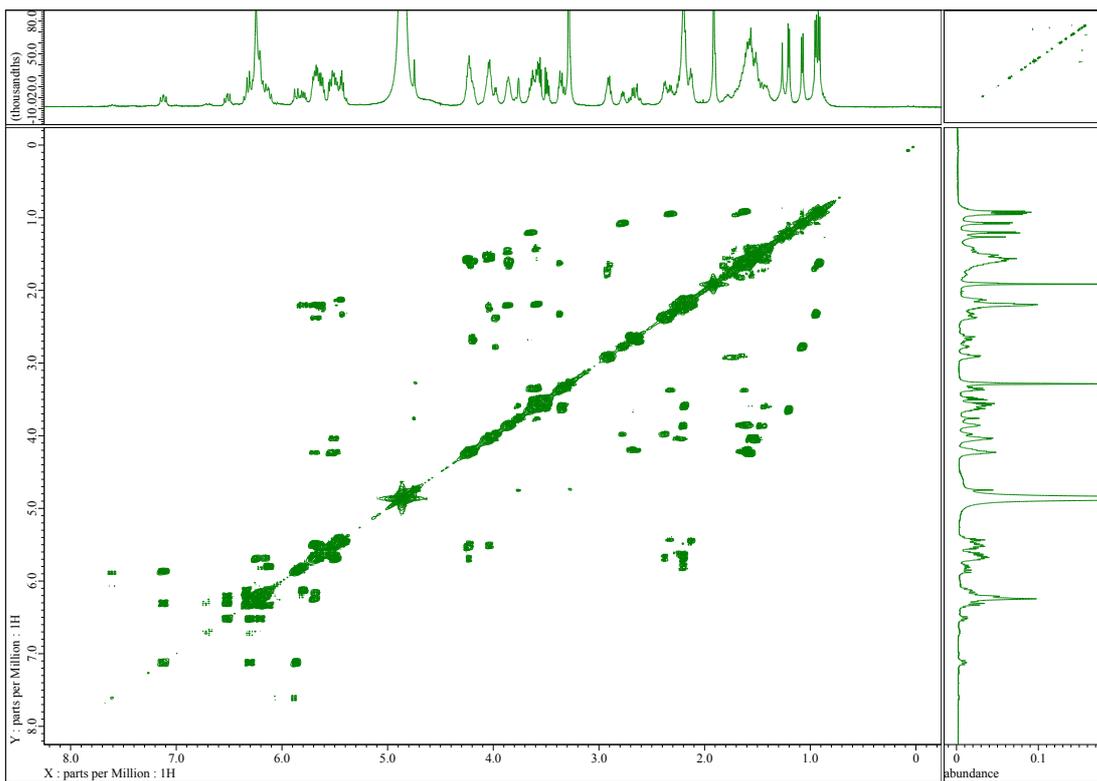
¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz)



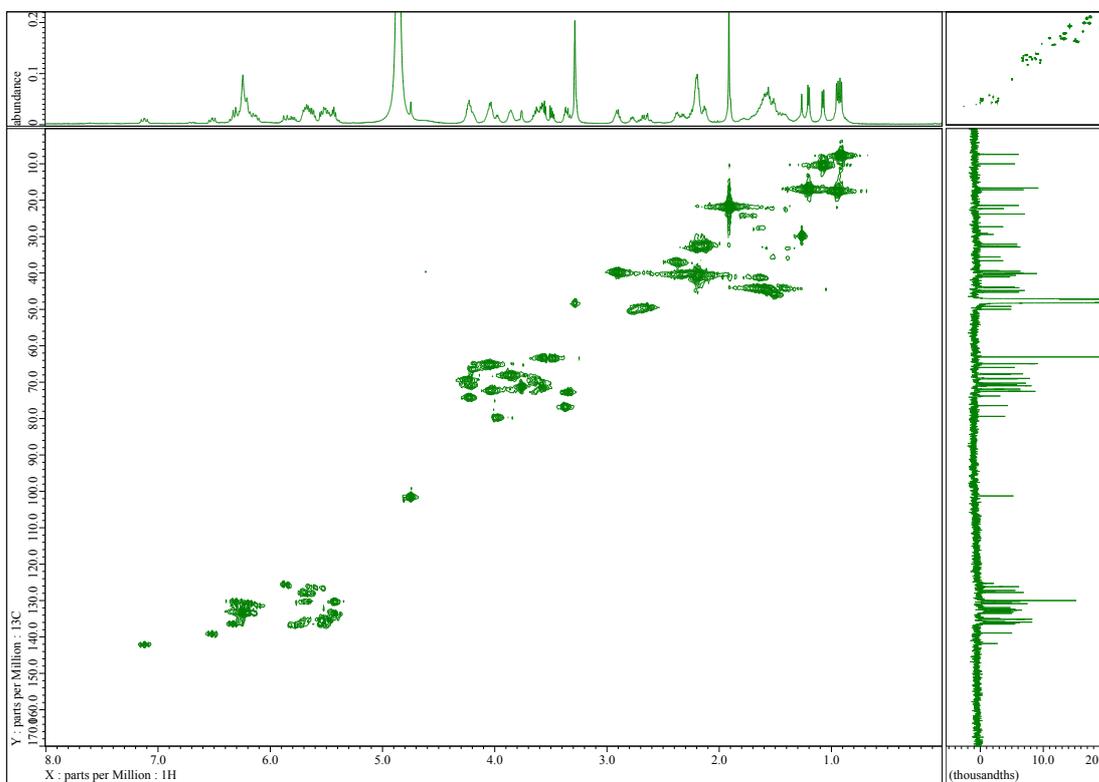
^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz)



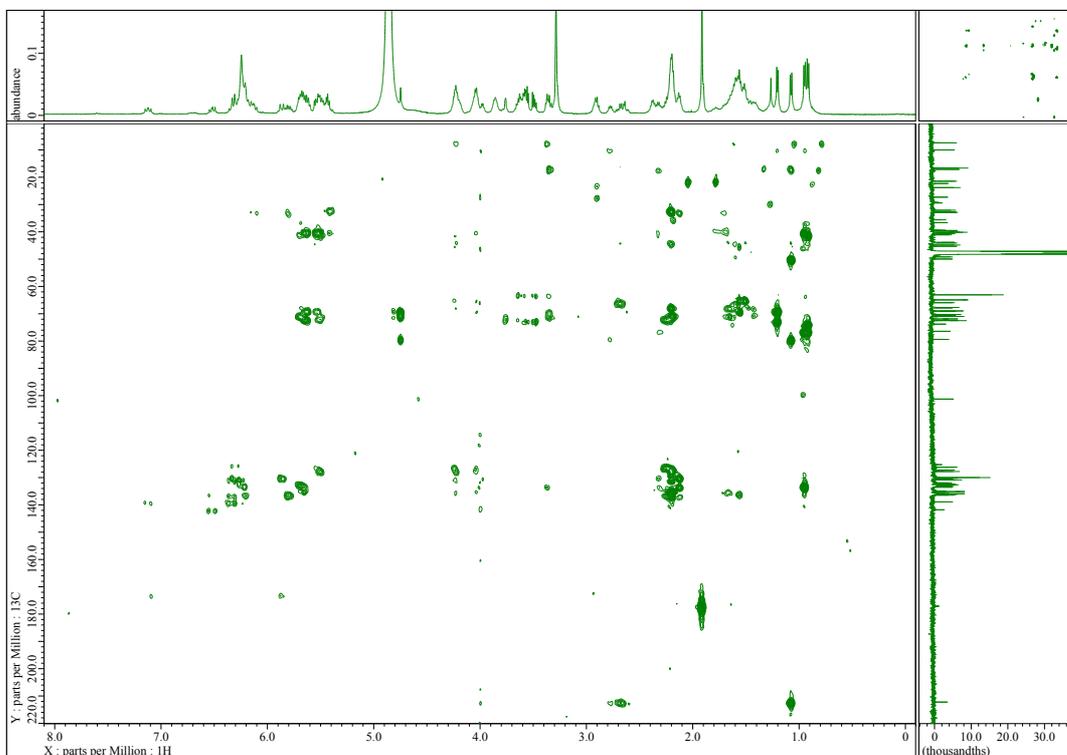
COSY (CD_3OD , 500 MHz)



HSQC (CD₃OD, 500 MHz)



HMBC (CD₃OD, 500 MHz)



Mediomycin A methylester の合成

mediomycin A の LH20 フラクション濃縮液 2 ml (in MeOH, mediomycin A 約 50 mg 相当) に対し、0.6 mol/L TMS diazomethane in hexane を 500 μ l 加え、アルゴン条件下 0 °C で 30 分攪拌した。反応後減圧蒸留により溶媒を除去、mediomycin A methylester を含む混合物を得た。

13-dihydroxymedimycin A methylester の合成

上記合成にて得られた mediomycin A methylester 混合物を 2 ml の MeOH に溶解し、sodium borohydride 50 mg を加え、アルゴン条件下 4 °C で 1 時間攪拌した。反応後、蒸留水を 10 ml 加え 1 M 塩酸により pH 8 に中和、ODS-flash column chromatography にかけて 10% MeOH で脱塩し、100 %MeOH で溶出、13-dihydroxymedimycin A methylester を含む混合物を得た。

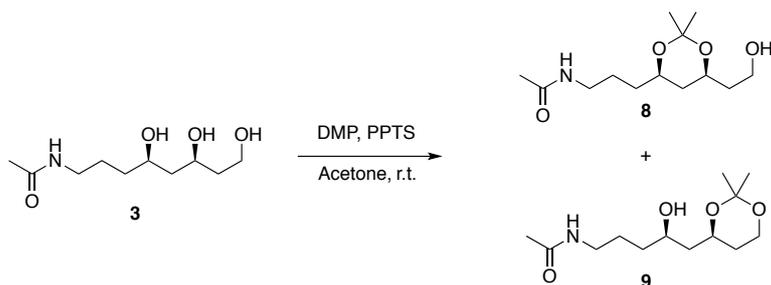
N-acetyl,13-dihydroxymedimycin A methylester の合成

上記合成にて得られた 13-dihydroxymedimycin A methylester 混合物を 2 ml の 1,4-dioxane:H₂O=5:1 に溶解し、無水酢酸 50 μ l を加え、アルゴン条件下 4°C で 1 時間攪拌した。反応後、HPLC 精製(55% MeCNaq + 50 mM CH₃COONH₄ isocratic, 3.0ml/min, 20 min)を行い N-acetyl,13-dihydroxymedimycin A methylester を得た(40 mg)。

mediomycin A 類のオゾン分解

mediomycin A および N-acetyl,13-dihydroxymedimycin A methylester 30 mg を 10 ml MeOH に溶解、-78°C にてオゾン を 2 min 通気した。酸素を通気し残留オゾン を除去したのち、sodium borohydride を 100 mg 加え攪拌し-78°C から室温まで自然加温し 1 h 攪拌した。反応液を減圧蒸留後、2 ml の CHCl₃:MeOH = 95:5 に溶解し、シリカゲルカラム(1 cm id, x 2 cm)にて CHCl₃:MeOH = 95:5 から 1:1 まで段階的に溶出し、各断片の取得を試みた。CAM(cerium ammonium molybdate) 呈色試薬を用い CHCl₃:MeOH = 9:1 で展開した TLC 検出の結果、CHCl₃:MeOH = 9:1 で diMe fragment (7)が、8:2 で N-fragment (3)が、6:4 で OH4 fragment (4)と OH5 fragment (5)がそれぞれ得られた (収量 3: 5.2 mg, 4: 2.1 mg, 5: 3.8 mg, 7: 2.7 mg)。

N-acetyl 断片のアセトナイド化

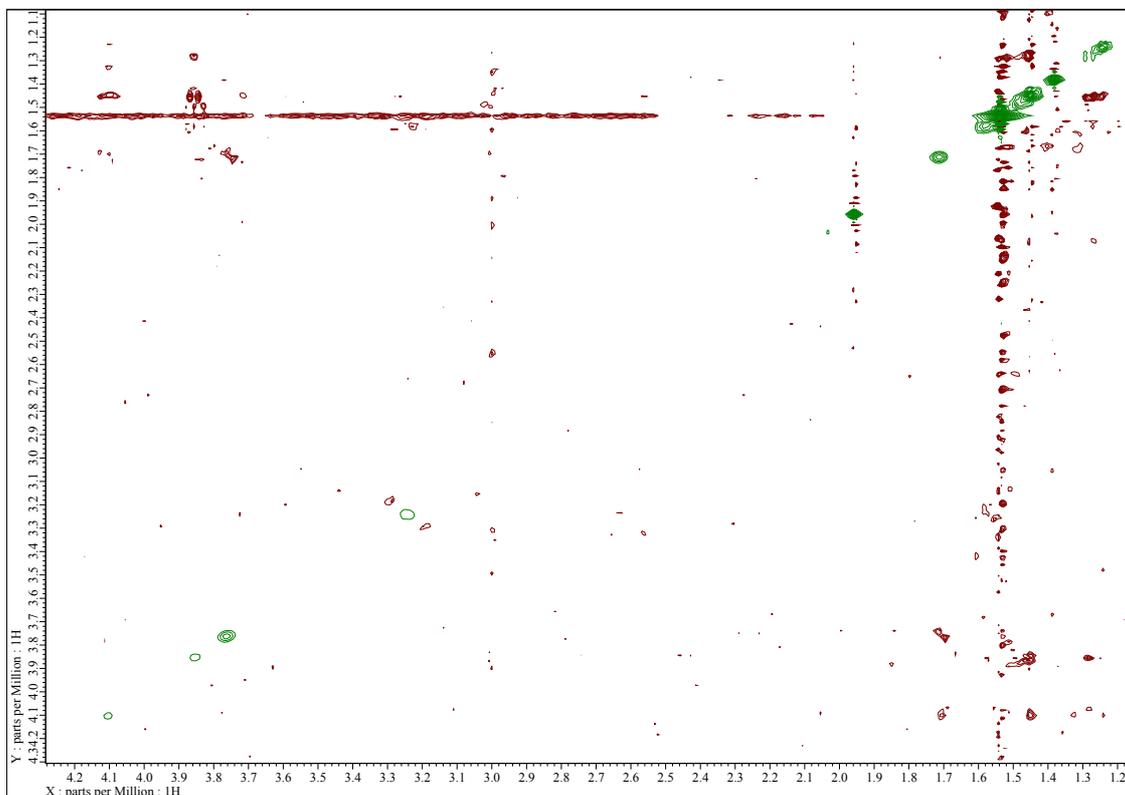


N-acetyl 断片(3) 8.6 mg をアセトン 5 mL に溶解し 2,2-dimethoxypropane (DMP, 50 μ L) と pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS, 2.0 mg)を加え室温で 30 分攪拌、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、CHCl₃:MeOH = 98:2 の前半フラクションに化合物 8、後半フラクションに化合物 9 をそれぞれシングルスポットで得た。

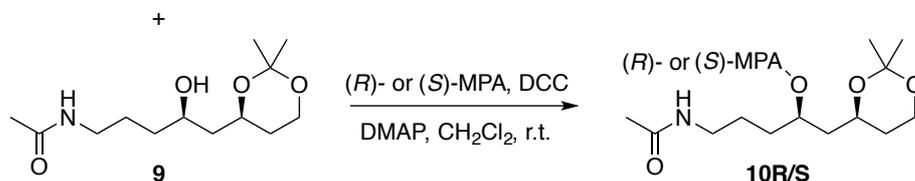
compound 8: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.26 (s, 3H), 1.40 (s, 3H), 1.42-1.52 (m, 4H), 1.58-1.68 (m, 4H), 1.97 (s, 3H), 3.28 (m, 2H), 3.84 (m, 2H), 3.98 (m, 1H), 4.15 (m, 1H)

compound 9: ¹H NMR (500 MHz, CD₃OD) δ 1.24 (m, 1H), 1.38 (s, 3H), 1.43 (m, 1H), 1.46 (s, 3H), 1.48 (m, 2H), 1.60 (m, 2H), 1.72 (m, 2H), 1.97 (s, 3H), 3.25 (m, 2H), 3.76 (m, 2H), 3.86 (m, 1H), 4.11 (m, 1H)

NOESY spectrum of 9



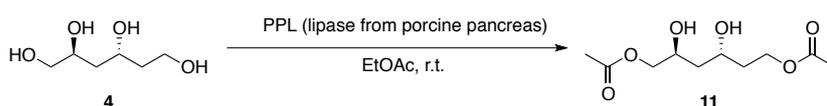
N-fragment の MPA エステル化



化合物 **9** (1.2 mg) を CH₂Cl₂ 1 mL に溶解し、(R)-(-)または(S)-(-)- α -methoxyphenylacetic acid (0.8 mg)、N,N'-Dicyclohexylcarbodiimide (DCC, 1.6 mg)、N,N-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 0.3 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにより精製 (CHCl₃:MeOH = 98:2~95:5)、対応する MPA エステル体 **10R** (1.1 mg) または **10S** (1.0 mg) を得た。
¹H NMR of **10R** (500 MHz, chloroform-d) δ 7.47 – 7.43 (m, 2H), 7.41 – 7.34 (m, 3H), 5.49 (brs, 1H), 5.01 (m, 1H), 4.74 (s, 1H), 3.63 (m, 1H), 3.52 (dt, $J = 12.2, 2.6$ Hz, 1H), 3.39 (s, 3H), 3.36 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 3.18 (m, 1H), 1.97 (s, 3H), 1.75 (m, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.60 (m, 1H), 1.47 (m, 1H), 1.46 (m, 2H), 1.31 (m, 1H), 1.27 (s, 3H), 1.16 (s, 3H), 1.08 (m, 1H).

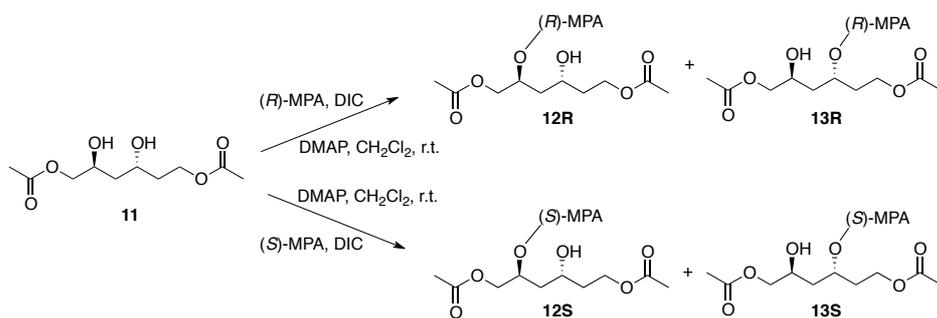
¹H NMR of **10S** (500 MHz, chloroform-d) δ 7.49 – 7.44 (m, 2H), 7.41 – 7.33 (m, 3H), 5.15 (brs, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.75 (s, 1H), 3.82 (m, 1H), 3.81 (m, 1H), 3.75 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.01 (m, 1H), 2.98 (m, 1H), 1.91 (s, 3H), 1.84 (m, 1H), 1.52 (m, 2H), 1.45 (m, 2H), 1.39 (m, 1H), 1.37 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.12 (m, 1H), 1.05 (m, 1H).

OH4-fragment のアセチル化



化合物 **4** (3.2 mg) を酢酸エチル 3 mL に溶解し、80 mg のリパーゼ (from porcine pancreas (Type II), Sigma-aldrich Japan) を加え、室温 10 時間攪拌した。酵素をフィルター除去ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、CHCl₃:MeOH = 97:3 で化合物 **11** を得た (3.9 mg)。
¹H NMR of **11** (500 MHz, chloroform-d) δ 4.41 (ddd, $J = 11.4, 8.6, 5.0$ Hz, 1H), 4.22 – 4.09 (m, 3H), 4.06 – 3.97 (m, 2H), 2.11 (s, 3H), 2.08 (s, 3H), 1.86 – 1.73 (m, 2H), 1.71 – 1.60 (m, 2H).

OH4-fragment の MPA エステル化



化合物 **11** (1.4 mg) を CH_2Cl_2 1 mL に溶解し、 (R) -(-)または (S) -(-)- α -methoxyphenylacetic acid (1.2 mg)、diisopropylcarbodiimide (DIC, 2.0 mg)、 N,N -dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 0.3 mg) を加え、室温で 2 時間攪拌ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにより精製(CHCl_3 :MeOH = 95:5、Hexane:EtOAc=1:1)、対応する MPA エステル体 **12R** (0.3 mg) **13R** (0.3 mg) または **12S** (0.4 mg) **13S** (0.4 mg) を得た。

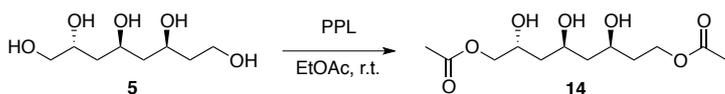
^1H NMR of **12R** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.48 – 7.41 (m, 2H), 7.40 – 7.33 (m, 3H), 5.38 – 5.28 (m, 1H), 4.80 (s, 1H), 4.28 – 4.21 (m, 1H), 4.13 – 4.05 (m, 2H), 3.98 (dt, J = 11.2, 5.9 Hz, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.23 – 3.16 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 2.00 (s, 3H), 1.60 – 1.52 (m, 4H).

^1H NMR of **13R** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.48 – 7.42 (m, 2H), 7.39 – 7.34 (m, 3H), 5.32 – 5.24 (m, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.07 (m, 1H) 4.05 (m, 1H), 3.86 (dd, J = 11.4, 3.5 Hz, 1H), 3.76 (dd, J = 11.4, 6.6 Hz, 1H), 3.41 (s, 3H), 3.21 – 3.12 (m, 1H), 2.05 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.96 – 1.91 (m, 2H), 1.57 – 1.47 (m, 2H).

^1H NMR of **12S** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.49 – 7.40 (m, 2H), 7.39 – 7.33 (m, 3H), 5.35 – 5.28 (m, 1H), 4.81 (s, 1H), 4.28 – 4.19 (m, 1H), 4.16 – 4.02 (m, 3H), 3.62 – 3.52 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.78 (s, 3H), 1.75 – 1.70 (m, 2H), 1.72 – 1.64 (m, 2H).

^1H NMR of **13S** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.44 – 7.41 (m, 2H), 7.39 – 7.35 (m, 3H), 5.27 – 5.18 (m, 1H), 4.79 (s, 1H), 4.07 (dd, J = 11.5, 3.5 Hz, 1H), 3.93 (dd, J = 11.5, 6.7 Hz, 1H), 3.75 – 3.70 (m, 1H), 3.68 – 3.61 (m, 1H), 3.55 – 3.49 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.85 – 1.78 (m, 2H), 1.68 – 1.62 (m, 2H).

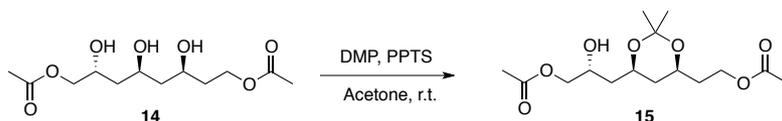
OH5-fragment のアセチル化



化合物 **5** (5.6 mg) を酢酸エチル 4 mL に溶解し、100 mg のリパーゼを加え、室温 10 時間攪拌した。酵素をフィルター除去ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、 CHCl_3 :MeOH = 85:15 で化合物 **14** を得た(6.4 mg)。

^1H NMR of **14** (500 MHz, chloroform- d) δ 4.45 (m, 1H), 4.26 – 4.00 (m, 5H), 3.93 (m, 1H), 2.10 (s, 3H), 2.09 (s, 3H), 1.87 – 1.55 (m, 6H).

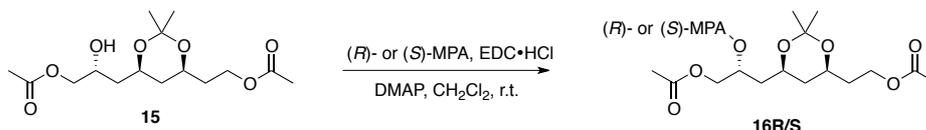
OH5-fragment のアセトナイド化



化合物 **14** (3.2 mg) をアセトン 3 mL に溶解し 2,2-dimethoxypropane (DMP, 30 μL) と pyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS, 2.0 mg) を加え室温で 1 時間攪拌、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 99:1$ で化合物 **15** を選択的に得た。

^1H NMR of **15** (500 MHz, chloroform- d) δ 4.19 – 4.08 (m, 4H), 4.03 – 3.93 (m, 3H), 2.09 (s, 3H), 2.04 (s, 3H), 1.83 – 1.72 (m, 3H), 1.68 – 1.59 (m, 3H), 1.43 (s, 3H), 1.36 (s, 3H).

OH5-fragment の MPA エステル化

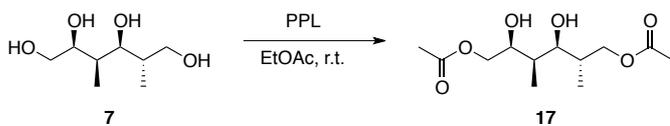


化合物 **15** (1.0 mg) を CH_2Cl_2 1 mL に溶解し、(*R*)-(-)または(*S*)-(-)- α -methoxyphenylacetic acid (1.0 mg)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC \cdot HCl, 2.3 mg)、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 0.3 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌のち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにより精製($\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 200:1$)、対応する MPA エステル体 **16R** (0.7 mg) または **16S** (0.9 mg) を得た。

^1H NMR of **16R** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.47 – 7.44 (m, 2H), 7.37 – 7.33 (m, 3H), 5.35 (ddd, $J = 11.7, 7.3, 3.5$ Hz, 1H), 4.78 (s, 1H), 4.14 (m, 2H), 4.13 (m, 1H), 3.95 (m, 1H), 3.83 (m, 1H), 3.73 (m, 1H), 3.42 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 1.80 (s, 3H), 1.75 (m, 2H), 1.69 (m, 1H), 1.62 (m, 1H), 1.31 (s, 3H), 1.30 (m, 1H), 1.20 (s, 3H), 1.14 (m, 1H).

^1H NMR of **16S** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.48 – 7.45 (m, 2H), 7.38 – 7.33 (m, 3H), 5.33 (ddd, $J = 12.6, 6.8, 3.0$ Hz, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.28 (m, 1H), 4.10 (m, 2H), 4.03 (dd, $J = 12.0, 6.7$ Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 3.25 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 2.02 (s, 3H), 1.75 (m, 2H), 1.54 (m, 2H), 1.31 (s, 3H), 1.20 (s, 3H), 1.10 (m, 1H), 1.03 (m, 1H), 0.98 (s, 3H).

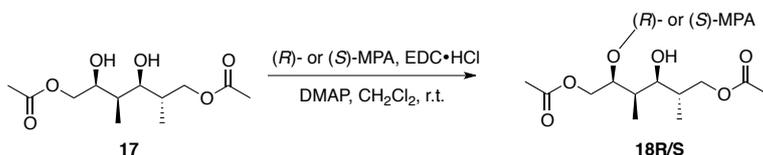
dMe-fragment のアセチル化



化合物 **7** (3.9 mg) を酢酸エチル 3 mL に溶解し、80 mg のリパーゼを加え、室温 10 時間攪拌した。酵素をフィルター除去ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 99:1\sim 98:2$ で化合物 **17** を得た (3.3 mg)。

^1H NMR of **17** (500 MHz, Chloroform- d) δ 4.47 (dd, $J = 11.4, 3.8$ Hz, 1H), 4.21 – 4.10 (m, 2H), 4.00 (dd, $J = 11.4, 3.5$ Hz, 1H), 3.60 (m, 1H), 3.53 (d, $J = 9.6$ Hz, 1H), 2.11 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.94 – 1.86 (m, 1H), 1.80 – 1.73 (m, 1H), 0.95 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H), 0.91 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H).

dMe-fragment の MPA エステル化

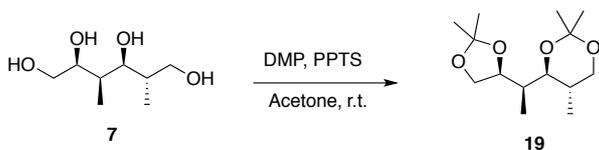


化合物 **17** (1.1 mg) を CH_2Cl_2 1 mL に溶解し、(*R*)-(-)または(*S*)-(-) α -methoxyphenylacetic acid (1.3 mg)、1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (EDC · HCl, 3.1 mg)、*N,N*-dimethyl-4-aminopyridine (DMAP, 0.4 mg) を加え、室温で 1 時間攪拌ののち、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにより精製 ($\text{hexane}:\text{EtOAc} = 2:1\sim 1:1$)、対応する MPA エステル体 **18R** (0.5 mg) または **18S** (0.6 mg) を得た。

^1H NMR of **18R** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.48 – 7.42 (m, 2H), 7.37 – 7.33 (m, 3H), 5.18 (m, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.34 (m, 1H), 4.23 (m, 2H), 3.92 (dd, $J = 10.7, 5.3$ Hz, 1H), 3.42 (s, 3H), 3.18 (m, 1H), 2.07 (s, 3H), 1.99 (s, 3H), 1.86 (m, 1H), 1.74 (m, 1H), 0.74 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.65 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H)

^1H NMR of **18S** (500 MHz, chloroform- d) δ 7.50 – 7.31 (m, 5H), 5.22 (m, 1H), 4.79 (s, 1H), 4.35 (dd, $J = 11.3, 4.3$ Hz, 1H), 4.19 (dd, $J = 12.1, 2.8$ Hz, 1H), 4.10 (m, 1H), 4.00 (dd, $J = 11.3, 4.6$ Hz, 1H), 3.44 (s, 3H), 3.39 (m, 1H), 2.09 (s, 3H), 1.97 (m, 1H), 1.84 (m, 1H), 1.77 (s, 3H), 0.92 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H), 0.82 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H).

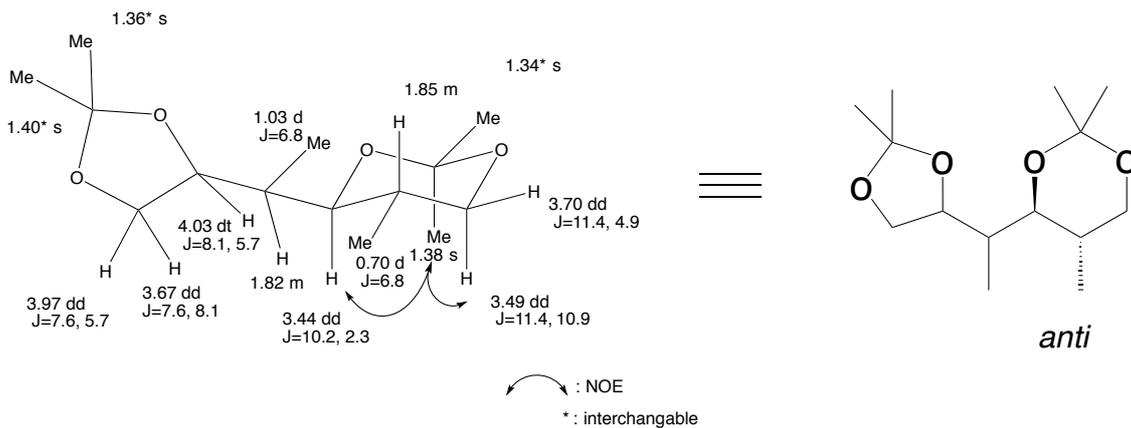
dMe-fragment のアセトナイド化



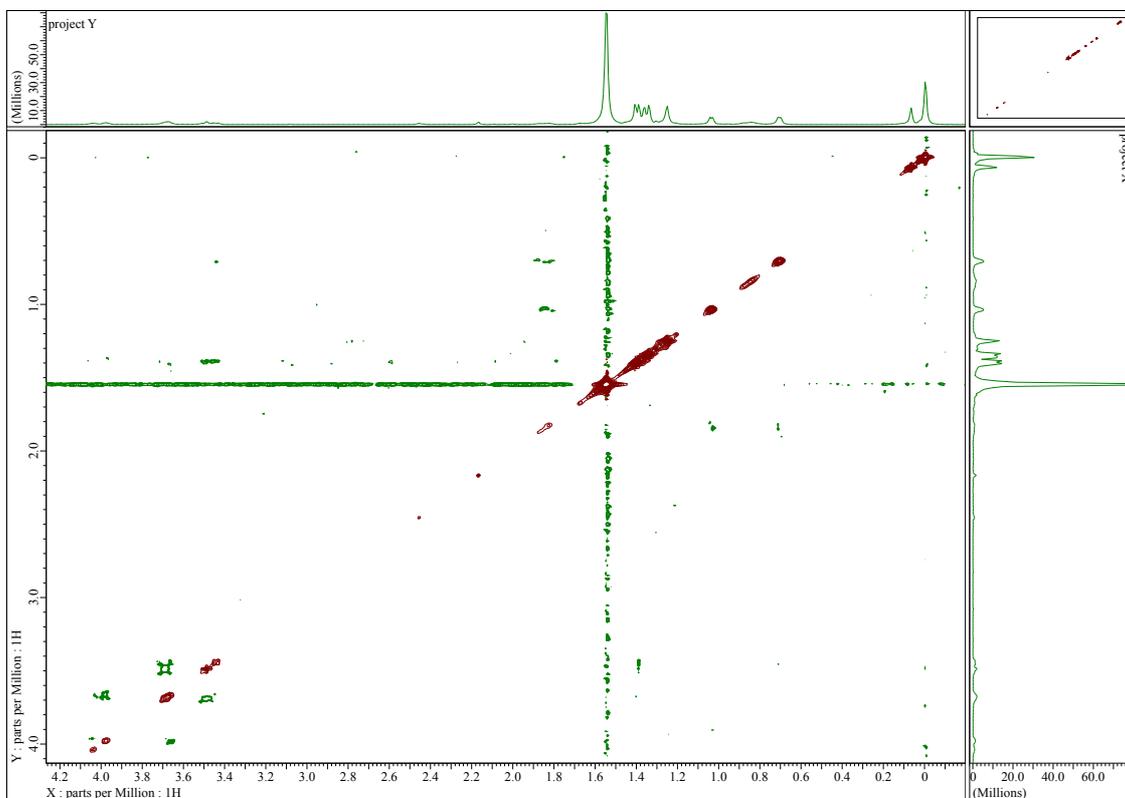
化合物 **7** (1.6 mg) をアセトン 1 mL に溶解し 2,2-dimethoxypropane (DMP, 15 μL) と pyridinium

p-toluenesulfonate (PPTS, 1.0 mg)を加え室温で1時間攪拌、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィにて精製を行い、CHCl₃:MeOH = 99:1 で化合物 **19** を得た。

¹H NMR of **19** (500 MHz, chloroform-d) δ 4.03 (dt, 1H, *J* = 8.1, 5.7 Hz), 3.97 (dd, 1H, *J* = 7.6, 5.7 Hz), 3.70 (dd, 1H, *J* = 11.4, 4.9 Hz), 3.67 (dd, 1H, *J* = 8.1, 7.6 Hz), 3.49 (dd, *J* = 11.4, 10.9, 1H), 3.44 (dd, *J* = 10.2, 2.3 Hz, 1H), 1.85 (m, 1H), 1.82 (m, 1H), 1.40 (s, 3H), 1.38 (s, 3H), 1.36 (s, 3H), 1.34 (s, 3H), 1.03 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H), 0.70 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H).



NOESY spectrum of **19**



MedB の発現精製

MetB 全長を DNA2.0 にて大腸菌内での発現用にコドン最適化し合成、pT7blue に TA クローニングを行った。得られた pT7blue-antB を *EcoRI/HindIII* で切り出し、同制限酵素サイトで切り出した pET28a ベクターにライゲーションを行い His₆tag- recombinant enzyme として発現するベクター-pMED1 を得た。pMED1 を *E.coli* BLR に導入、2 L の LB 培地にて培養し OD₆₀₀=0.4 時に 1mM IPTG を加え発現誘導し、23°C、150 rpm、overnight で発現を行った。菌体を遠心回収し、20 mL の buffer A (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 10% glycerol, 5 mM imidazole) に懸濁し超音波破碎を行った。15,000 g で遠心後得られた上清を COSMOGEL his-accept(Nacalai tesque) 5 ml に吸着、buffer A 100 ml で wash を行い buffer A +500 mM imidazole 10 ml で溶出した。続いて Superdex200 (GE healthcare)を用いてゲル濾過精製を buffer A により 0.2ml/min で行った。MedB の含まれるフラクションを 20 mg/ml まで濃縮、タンパク純度が95%以上であることを SDS-PAGE で確認した。

MedB の *in vitro* 反応

50 µl スケールにて反応を行った。50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM substrates, 0.2 mM PAPS の反応液に終濃度 10 uM MedB となるように加え反応を開始、30°C, 2 hr 後に等量の MeOH を加え、15,000 g で遠心しタンパクを沈殿、上清 10 µl を用い LC-MS 分析を行った(A:ddH₂O + 50 mM CH₃COONH₄, B:MeCN ; 0 min 35% B -30 min 50% B)。

参考文献

- [1] A. L. Harvey, R. Edrada-Ebel, R. J. Quinn, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2015**, *14*, 111-129.
- [2] K. Lewis, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 371-387.
- [3] D. J. Newman, G. M. Cragg, *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629-661.
- [4] M. J. Smanski, H. Zhou, J. Claesen, B. Shen, M. A. Fischbach, C. A. Voigt, *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 135-149.
- [5] C. J. Paddon, P. J. Westfall, D. J. Pitera, K. Benjamin, K. Fisher, D. McPhee, M. D. Leavell, A. Tai, A. Main, D. Eng, D. R. Polichuk, K. H. Teoh, D. W. Reed, T. Treynor, J. Lenihan, H. Jiang, M. Fleck, S. Bajad, G. Dang, D. Dengrove, D. Diola, G. Dorin, K. W. Ellens, S. Fickes, J. Galazzo, S. P. Gaucher, T. Geistlinger, R. Henry, M. Hepp, T. Horning, T. Iqbal, L. Kizer, B. Lieu, D. Melis, N. Moss, R. Regentin, S. Secrest, H. Tsuruta, R. Vazquez, L. F. Westblade, L. Xu, M. Yu, Y. Zhang, L. Zhao, J. Lievense, P. S. Covello, J. D. Keasling, K. K. Reiling, N. S. Renninger, J. D. Newman, *Nature* **2013**, *496*, 528-532.
- [6] a) C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 4688-4716; b) M. A. Fischbach, C. T. Walsh, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3468-3496.
- [7] a) C. Khosla, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 2577-2590; b) P. F. Leadlay, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1997**, *1*, 162-168; c) R. H. Baltz, *Nat. Biotechnol.* **2006**, *24*, 1533-1540; d) C. Hertweck, *Trends Biochem. Sci.* **2015**, *40*, 189-199.
- [8] K. J. Weissman, *Trends Biotechnol.* **2007**, *25*, 139-142.
- [9] M. C. Wilson, B. S. Moore, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 72-86.
- [10] C. Olano, C. Mendez, J. A. Salas, *Nat. Prod. Rep.* **2010**, *27*, 571-616.
- [11] L. Ray, B. S. Moore, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 150-161.
- [12] C. T. Walsh, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 127-135.
- [13] G. H. Hur, C. R. Vickery, M. D. Burkart, *Nat. Prod. Rep.* **2012**, *29*, 1074-1098.
- [14] a) K. J. Weissman, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 203-230; b) M. Winn, J. K. Fyans, Y. Zhuo, J. Micklefield, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 317-347.
- [15] a) S. Dutta, J. R. Whicher, D. A. Hansen, W. A. Hale, J. A. Chemler, G. R. Congdon, A. R. Narayan, K. Hakansson, D. H. Sherman, J. L. Smith, G. Skiniotis, *Nature* **2014**, *510*, 512-517; b) J. M. Reimer, M. N. Aloise, P. M. Harrison, T. M. Schmeing, *Nature* **2016**, *529*, 239-242; c) E. J. Drake, B. R. Miller, C. Shi, J. T. Tarrasch, J. A. Sundlov, C. L. Allen, G. Skiniotis, C. C. Aldrich,

- A. M. Gulick, *Nature* **2016**, 529, 235-238.
- [16] a) J. R. Jacobsen, C. R. Hutchinson, D. E. Cane, C. Khosla, *Science* **1997**, 277, 367-369; b) D. E. Cane, F. Kudo, K. Kinoshita, C. Khosla, *Chem. Biol.* **2002**, 9, 131-142.
- [17] H. Y. Lee, C. J. B. Harvey, D. E. Cane, C. Khosla, *J Antibiot* **2011**, 64, 59-64.
- [18] J. Kennedy, *Nat. Prod. Rep.* **2008**, 25, 25-34.
- [19] I. Koryakina, C. Kasey, J. B. McArthur, A. N. Lowell, J. A. Chemler, S. Li, D. A. Hansen, D. H. Sherman, G. J. Williams, *ACS Chem. Biol.* **2016**.
- [20] a) M. C. Walker, B. W. Thuronyi, L. K. Charkoudian, B. Lowry, C. Khosla, M. C. Y. Chang, *Science* **2013**, 341, 1089-1094; b) O. Ad, B. W. Thuronyi, M. C. Y. Chang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, 114, E660-E668.
- [21] a) Y. Sugimoto, L. Ding, K. Ishida, C. Hertweck, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, 53, 1560-1564; b) Y. Sugimoto, K. Ishida, N. Traitcheva, B. Busch, H. M. Dahse, C. Hertweck, *Chem. Biol.* **2015**, 22, 229-240.
- [22] a) T. J. Erb, I. A. Berg, V. Brecht, M. Muller, G. Fuchs, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2007**, 104, 10631-10636; b) T. J. Erb, V. Brecht, G. Fuchs, M. Muller, B. E. Alber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, 106, 8871-8876.
- [23] B. R. Dunshee, C. Leben, G. W. Keitt, F. M. Strong, *J. Am. Chem. Soc.* **1949**, 71, 2436-2437.
- [24] J. Liu, X. Zhu, S. J. Kim, W. Zhang, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 1146-1165.
- [25] E. C. Slater, *Biochim. Biophys. Acta* **1973**, 301, 129-154.
- [26] S. P. Tzung, K. M. Kim, G. Basanez, C. D. Giedt, J. Simon, J. Zimmerberg, K. Y. Zhang, D. M. Hockenbery, *Nat. Cell Biol.* **2001**, 3, 183-191.
- [27] R. Riclea, B. Aigle, P. Leblond, I. Schoenian, D. Spiteller, J. S. Dickschat, *Chembiochem* **2012**, 13, 1635-1644.
- [28] a) R. F. Seipke, J. Barke, C. Brearley, L. Hill, D. W. Yu, R. J. Goss, M. I. Hutchings, *PLoS One* **2011**, 6, e22028; b) M. Sandy, Z. Rui, J. Gallagher, W. Zhang, *ACS Chem. Biol.* **2012**, 7, 1956-1961; c) Y. Yan, L. Zhang, T. Ito, X. Qu, Y. Asakawa, T. Awakawa, I. Abe, W. Liu, *Org. Lett.* **2012**, 14, 4142-4145.
- [29] Y. Yan, J. Chen, L. Zhang, Q. Zheng, Y. Han, H. Zhang, D. Zhang, T. Awakawa, I. Abe, W. Liu, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 12308-12312.
- [30] N. Quade, L. Huo, S. Rachid, D. W. Heinz, R. Müller, *Nat. Chem. Biol.* **2012**, 8, 117-124.
- [31] L. Schada von Borzyskowski, R. G. Rosenthal, T. J. Erb, *J. Biotechnol.* **2013**, 168, 243-251.
- [32] C. Pandya, J. D. Farelli, D. Dunaway-Mariano, K. N. Allen, *J. Biol. Chem.* **2014**, 289,

- 30229-30236.
- [33] K. Yazaki, A. Ogawa, M. Tabata, *Plant Cell Physiol.* **1995**, *36*, 1319-1329.
- [34] C. T. Walsh, M. A. Fischbach, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 2469-2493.
- [35] J. B. McAlpine, B. O. Bachmann, M. Pirae, S. Tremblay, A. M. Alarco, E. Zazopoulos, C. M. Farnet, *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 493-496.
- [36] a) H. Jenke-Kodama, A. Sandmann, R. Müller, E. Dittmann, *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *22*, 2027-2039; b) C. P. Ridley, H. Y. Lee, C. Khosla, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 4595-4600; c) M. H. Medema, P. Cimermancic, A. Sali, E. Takano, M. A. Fischbach, *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, e1004016.
- [37] a) H. Hong, M. Samborsky, F. Lindner, P. F. Leadlay, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 1118-1123; b) H. Hong, T. Fill, P. F. Leadlay, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 13096-13099.
- [38] P. Cai, F. Kong, P. Fink, M. E. Ruppen, R. T. Williamson, T. Keiko, *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 215-219.
- [39] Y. Igarashi, T. Iwashita, T. Fujita, H. Naoki, T. Yamakawa, R. Yoshida, T. Furuma, *J. Antibiot. (Tokyo)* **2003**, *56*, 705-708.
- [40] J. Uri, R. Bognar, I. Bekesi, B. Varga, *Nature* **1958**, *182*, 401.
- [41] T. Kamiyama, Y. Itezono, T. Umino, T. Satoh, N. Nakayama, K. Yokose, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1993**, *46*, 1047-1054.
- [42] S. Sakuda, U. Guce-Bigol, M. Itoh, T. Nishimura, Y. Yamada, *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36*, 2777-2780.
- [43] J. Pawlak, J. Zielinski, J. Golik, E. Jereczek, E. Borowski, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1980**, *33*, 998-1004.
- [44] T. Kamiyama, T. Umino, N. Fujisaki, K. Fujimori, T. Satoh, Y. Yamashita, S. Ohshima, J. Watanabe, K. Yokose, *J. Antibiot. (Tokyo)* **1993**, *46*, 1039-1046.
- [45] a) G. Santoyo, D. Romero, *FEMS Microbiol. Rev.* **2005**, *29*, 169-183; b) D. Liao, *Am. J. Hum. Genet.* **1999**, *64*, 24-30.
- [46] S. Yuzawa, K. Deng, G. Wang, E. E. K. Baidoo, T. R. Northen, P. D. Adams, L. Katz, J. D. Keasling, *ACS Synth. Biol.* **2016**.
- [47] a) K. M. Fisch, C. Gurgui, N. Heycke, S. A. van der Sar, S. A. Anderson, V. L. Webb, S. Taudien, M. Platzer, B. K. Rubio, S. J. Robinson, P. Crews, J. Piel, *Nat. Chem. Biol.* **2009**, *5*, 494-501; b) R. Ueoka, A. R. Uria, S. Reiter, T. Mori, P. Karbaum, E. E. Peters, E. J. Helfrich, B. I. Morinaka, M. Gugger, H. Takeyama, S. Matsunaga, J. Piel, *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11*,

705-712.

- [48] T. Nguyen, K. Ishida, H. Jenke-Kodama, E. Dittmann, C. Gurgui, T. Hochmuth, S. Taudien, M. Platzer, C. Hertweck, J. Piel, *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 225-233.
- [49] A. C. Murphy, H. Hong, S. Vance, R. W. Broadhurst, P. F. Leadlay, *Chem. Commun.* **2016**, *52*, 8373-8376.
- [50] A. Y. Chen, N. A. Schnarr, C.-Y. Kim, D. E. Cane, C. Khosla, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 3067-3074.
- [51] A. T. Keatinge-Clay, *Nat. Prod. Rep.* **2016**, *33*, 141-149.
- [52] Y. Kobayashi, C. H. Tan, Y. Kishi, *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 2562-2571.
- [53] Y. Kobayashi, W. Czechtizky, Y. Kishi, *Org. Lett.* **2003**, *5*, 93-96.
- [54] A. Vagin, A. Teplyakov, *Journal of Applied Crystallography* **1997**, *30*, 1022-1025.
- [55] P. Emsley, B. Lohkamp, W. G. Scott, K. Cowtan, *Acta Crystallographica Section D* **2010**, *66*, 486--501.
- [56] P. D. Adams, P. V. Afonine, G. Bunkczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, A. J. McCoy, N. W. Moriarty, R. Oeffner, R. J. Read, D. C. Richardson, J. S. Richardson, T. C. Terwilliger, P. H. Zwart, *Acta Crystallographica Section D* **2010**, *66*, 213--221.
- [57] M. Kearse, R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647-1649.
- [58] R. C. Edgar, *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792-1797.
- [59] A. Stamatakis, *Bioinformatics* **2006**, *22*, 2688-2690.

第 2 章发表論文

Zhang, L., Chen, J., Mori, T., Yan, Y., Liu, W., Abe, I. "Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of AntE, a crotonyl-CoA carboxylase/reductase from *Streptomyces* sp. NRRL 2288" *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.*, **2014**, *70*, 734-737.

Zhang, L., Mori, T., Zheng, Q., Awakawa, T., Yan, Y., Liu, W., Abe, I., "Rational control of polyketide extender units by structure-based engineering of a crotonyl-CoA carboxylase/ reductase in antimycin biosynthesis" *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 13462–13465.

第 3 章 发表论文

Zhang, L., Hashimoto, T., Qin, B., Hashimoto, J., Kozono, I., Kawahara, T., Okada, M., Awakawa, T., Ito, T., Asakawa, Y., Ueki, M., Takahashi, S., Osada, H., Wakimoto, T., Ikeda, H., Shin-ya, K., Abe, I. “Characterization of Giant Modular PKSs Provides Insight into Genetic Mechanism for Structural Diversification of Aminopolyol Polyketides” *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, *56*, 1740-1745.

謝辞

学生の身分は不安定であり、研究生活は孤独であり、将来の保障もない中、本研究を無事に遂行できたのはこの上ない幸運でありました。それは自然の神秘が導いたおかげとも言えますが、自然の神秘を垣間見ることができたのは先人の知の蓄積ゆえであり、本研究の方向性を示し、多くの構想を与え新たな発見を可能とした、膨大な先行研究に敬意を示します。

博士課程での勉学にあたり、指導教官の阿部郁朗先生には叱咤激励をいただき、また多くの共同研究の機会をいただき、研究を広げる重要性や研究を完遂し、注目に値する公表を行う重要性を学びました。心より感謝の意を表します。また、天然物化学教室の先生方にも多くお世話になりました。淡川孝義先生には実験の操作に始まり研究手法の多くを学び、また研究内容内外についてご討論を頂きました。岡田正弘先生には有機合成や進化についてご指導や討論を頂きました。森貴裕先生には X 線結晶解析や酵素反応などのご助言ご討論を頂きました。北海道大学薬学系研究院の脇本敏幸先生には当教室在籍時より化合物の立体決定のご指導のほか様々なご助言と励ましを頂きました。先生方のご指導に御礼申し上げます。

教室メンバーの皆様にも大変お世話になりました。秦斌さんとは立体決定に取り組み多大な貢献を頂きました。星野翔太郎さんとは化合物の単離などに取り組み、議論を深めました。藤岡拓真さんとは生合成エンジニアリングに取り組みご協力頂きました。中村仁美さんとは研究発表や進路など様々な議論を交わすことができました。その他、全智揚さんや在籍したすべての皆様により良い研究環境が形成され、励まし合い研究が遂行できたことを感謝いたします。

共同研究にあたり、上海有機化学研究所の劉文教授には研究室への訪問を受け入れくださりアンチマイシン生合成について数々のご助言を頂き、研究に真摯に取り組む姿勢を学ばせて頂きました。また、徳島文理大学薬学部の浅川義範先生および富山大学和漢医薬学総合研究所の伊藤卓也先生には *S.blastmyceticus* のゲノム解析と遺伝子分析をご協力頂きました。産業総合技術研究所の新家一男先生、橋本拓哉先生、橋本絢子先生、小曾根郁子先生、北里大学感染制御科学府の池田治生先生には放線菌の遺伝子操作や BAC ライブラリ作成およびアミノポリオール生合成遺伝子の配列データのご提供や配列分析など、多くのご支援を頂きました。東京大学農学系研究科の尾仲宏康先生には放線菌での発現ベクターを分与頂きました。また中外製薬株式会社より菌株の分与頂きました。共同研究の先生方のご尽力に厚く御礼申し上げます。

本研究の期間に必要な不可欠なご支援いただいた日本学術振興会ならびに国民の皆様には感謝の意を表します。

最後に常に支援いただき、暖かく見守って頂いた父母および妹に心より感謝いたします。

平成 29 年 3 月

張 驪驛