

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	マクロラクタム配糖体抗生物質クレミマイシンの生合成に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	天貝啓太
Author(English)	Keita Amagai
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9255号, 授与年月日:2013年9月25日, 学位の種別:課程博士, 審査員:江口 正,藤本 善徳,植草 秀裕,工藤 史貴,大森 建
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9255号, Conferred date:2013/9/25, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

マクロラクタム配糖体抗生物質クレミマイシンの 生合成に関する研究

東京工業大学 大学院理工学研究科
物質科学専攻 博士後期課程
09D05019 天貝 啓太
江口研究室

目次

第 1 章	序論	4
第 2 章	投与実験による生合成前駆体の解明	15
2.1	序	15
2.2	培養条件の検討	17
2.3	安定同位体基質を用いた投与実験	18
2.4	まとめ	32
第 3 章	生合成遺伝子の探索と同定	34
3.1	序	34
3.2	クレマイシン生合成遺伝子クラスターの取得	34
3.3	クレマイシン生合成遺伝子クラスターの解析	42
3.4	遺伝子情報を基としたクレマイシン生合成経路の推定	61
3.5	遺伝子破壊実験	67
3.6	まとめ	79
第 4 章	開始基質におけるアミノ基導入機構の解明	81
4.1	序	81
4.2	酵素発現系の構築	82
4.3	グリシン酸化活性の検出	85
4.4	酵素反応基質の合成	86
4.5	酵素反応生成物解析時における HPLC 標準物質の合成	87
4.6	3-ケトノナン酸 NAC チオエステルを用いたアミノ基導入反応の検討	88
4.7	2-ノネン酸 NAC チオエステルを用いたアミノ基導入反応の検討	93
4.8	酵素反応生成物の構造決定	98
4.9	アミノ基導入酵素群の生化学的性質	106
4.10	まとめ	111
第 5 章	総括	117
	実験の部	124
	参考文献	137
	謝辞	141

略語表

ATP	adenosine-5'-triphosphate
CFE	cell-free extract
DAO	D-amino acid oxidase
DCC	<i>N,N'</i> -dicyclohexylcarbodiimide
DMAP	dimethylaminopyridine
DNPH	dinitrophenylhydrazine
DTH	sodium dithionite (sodium hydrosulphite, Na ₂ S ₂ O ₄)
EDCI	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
FAD	flavin adenine dinucleotide
FcoT	fatty acyl-CoA thioesterase
GOX	glycine oxidase
HEPES	<i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine <i>N'</i> -ethanesulfonic acid
IMAC	immobilized metal affinity chromatography
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
MOPS	3-morpholinopropanesulfonic acid
NAD(P)	nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate)
NBHA	<i>O</i> -(<i>p</i> -nitrobenzyl) hydroxylamine
OD₆₀₀	optical density at 600 nm
ORF	open reading flame
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PTC	phenylthiocarbamate
PTH	phenylthiohydantoin
PITC	phenylisothiocyanate
PLP	pyridoxal 5'-phosphate
SAM	<i>S</i> -adenosyl-L-methionine
SDS	sodium dodecylsulfate
SSC	saline-sodium citrate
TDP (dTDP)	thymidine 5'-diphosphate
Tris	2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (tris-(hydroxymethyl) aminomethane)
UDP	uridine 5'-diphosphate

第1章 序論

天然に存在する有機化合物は多様性に富み、様々な生理活性を有するものがある。これら生理活性物質はアルカロイド、テルペノイド等の低分子化合物群からホルモンといったポリペプチド、さらには巨大なタンパク質であるサイトカイン、ケモカインなど多岐にわたっている。抗生物質はこれら生理活性物質の中でも「微生物の二次代謝産物であり、原核細胞に対して選択的毒性を有する物質」と Waksman により定義・位置づけられている物質である。二次代謝とは生産する生物にとって必須では無い代謝経路であり、ここから産み出されるものが二次代謝産物と言われているが、微生物の二次代謝産物の構造は β -ラクタム、アミノグリコシド、ポリエーテル、マクロライド、リポペプチドなど多岐にわたることが知られている (Fig. 1)。またこの多様な構造が時として思わぬ生理活性を発現していることがある。例えばストレプトマイシン (streptomycin)、カナマイシン (kanamycin) に代表されるようなアミノグリコシド抗生物質は、一見糖が複数個繋がっているアミノ糖鎖のようにも見えるが、その中心には疑似糖骨格を有する 2-デオキシストレプタミン (DOS) やストレプタミンが配置されており、細菌のリボソーム 30S サブユニットの 16SrRNA に強く相互作用することでその活性が発現するとされている [1]。またバンコマイシン (vancomycin) に代表されるグリコペプチド抗生物質は、その構造が直接細胞壁のペプチドと相互作用することでその合成阻害活性を示すとされている。このような化合物がなぜ自然界で産出されてきたのか、その疑問もさることながら、このような特異構造を有する化合物が如何にして構築されてきたのかを探るのは、非常に興味深い研究対象である。

一般にこれらの化合物は糖やアミノ酸など、一次代謝産物から生合成されていることが知られている。そこで二次代謝産物の構築機序を調べるために、古くから安定同位体で標識した化合物や予想生合成中間体を用いた投与実験などを行って、その生合成経路の推定などが行われてきた。一方、最近 20 年の遺伝子工学技術の発展を背景に、数多くの抗生物質生合成遺伝子が決定されてきた。二次代謝産物も一次代謝産物と同様、染色体 DNA 上にコードされた遺伝子から転写・翻訳されることによって産み出される種々の酵素の触媒反応によって形成される。また、一般に微生物の二次代謝産物の生合成に関わる遺伝子は染色体ゲノム DNA 上で局在し、一つのクラスターを形成しているため、ある一部の二次代謝産物生合成遺伝子を得られることが出来れば、遺伝子クラスター全体を取得することが可能となる。この前提をもとに現在まで抗生物質生産菌から様々な二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの取得報告がなされ、これらの情報は抗生物質に代表される二次代謝産物生合成機構の解明に大きく貢献してきた。

更に近年、遺伝子解読に関する技術は飛躍的に向上してきており、一部の遺伝子配列を解読するのみならず、全ゲノム DNA 配列を完全に解読し、得られた情報から遺伝子機能、酵素機能を網羅的に解析するポストゲノム研究が精力的に行われている。これらの技術は生物学への貢献だ

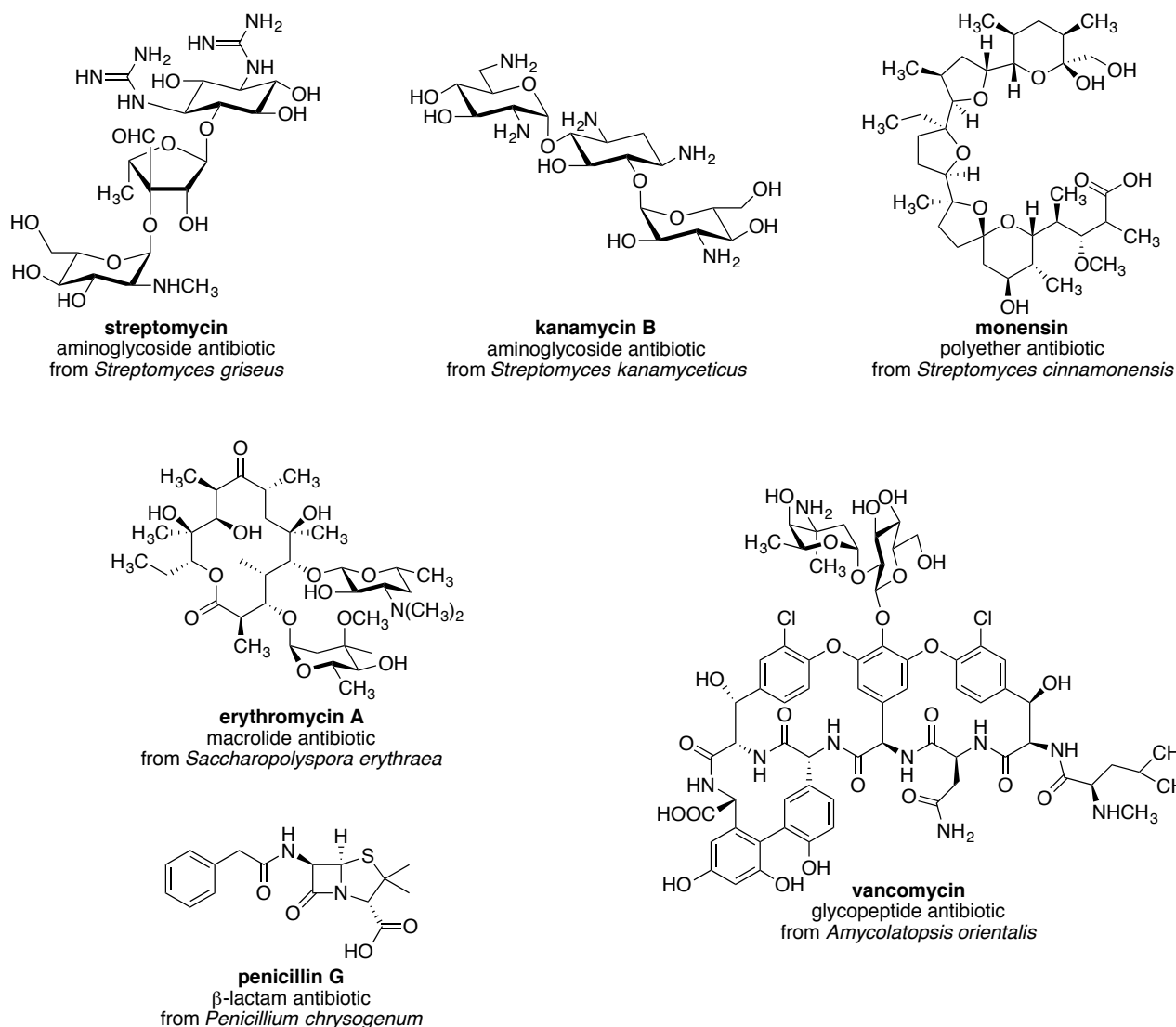


Fig. 1 様々な抗生物質

けではなく、ここ数年、生合成機構解析にも応用され始めてきた。例えば、数多くの二次代謝産物を生産することで知られている放線菌 *Streptomyces* 属では、2002 年に *Streptomyces coelicolor* A3(2) の全ゲノム DNA 配列の解読に成功して以降 [2]、現在までに 37 種の全ゲノム配列が既に明らかとなっている。Komatsu らはこれらの内、高い二次代謝産物生産能を有するエバーメクチン (avermectin) 生産菌 *Streptomyces avermitilis* の染色体ゲノム DNA に種々の操作を施し、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターを軒並み削除した変異株 SUKA17 の作成に成功している。更にこの SUKA17 に外部から種々の抗生物質生合成遺伝子クラスターを導入することによって、対応する抗生物質が非常に効率的に生産されたことを報告した [3]。すなわち、この報告は生合成研究分野にもポストゲノム時代が到来したことを示唆するものであり、今まで転写不活性で眠っていた二次代謝産物生合成遺伝子を取得・発現し、新規有用化合物の生産へと応用できる可能性も出てきた。しかし、これらの応用研究を発展させるためには、現存する未解明な二次代謝産物生合成機

構を明らかにすることが必須であり、現在まで行われてきた酵素レベルの生合成研究の重要性はますます増大してきている。

ポリケチド化合物は二次代謝産物生合成経路解明をターゲットとした研究対象の中でも非常に大きな化合物群を形成しており、その中にはタクロリムス (tacrolimus, FK506) [4] や、エリスロマイシン等、医療用途で用いられているものも少なくない。またその構造を基として創薬のための半合成なども行われている [5]。このように化学療法の薬剤として潜在的な可能性を秘めているポリケチド化合物の生合成は、一次代謝経路で見られる脂肪酸生合成経路と酷似しており、一般的に活性化されたカルボン酸開始基質とマロニル-補酵素 A (Coenzyme A, CoA) やメチルマロニル-CoA などとのクライゼン型縮合反応によって生合成されることが知られている。この機構はポリケチド化合物生合成に共通しているにもかかわらず、属する化合物の構造は多岐にわたっており、遺伝子改変などの手法によって新規化合物を取得できる可能性が高い化合物群である。

このようなポリケチド化合物の合成を触媒する酵素、ポリケチド合成酵素 (Polyketide Synthetase, PKS) には、モジュール型構造をとる I 型ポリケチド合成酵素 (type I PKS) や、芳香族型ポリケチド化合物の生合成を触媒する II 型ポリケチド合成酵素 (type II PKS)、また非常に単純な構造を有する III 型ポリケチド合成酵素 (type III PKS) などが知られている。

I 型 PKS は 1990 年、Cortes らによって初めてエリスロマイシン生合成に関わる PKS 遺伝子の取得がなされたのを始めとして [6]、現在までに非常に多くの I 型 PKS 遺伝子が報告されている。これら I 型 PKS の触媒機構をエリスロマイシン生合成に関わる 6-デオキシエリスロノライド合成酵素 (6-DeoxyErythronoride B Synthase, DEBS) を例に挙げて、Fig. 3 に示す。

I 型 PKS は非常に多くのアミノ酸から成り立ち、分子量は数万から数十万 (数十 – 数百 kDa) にも及ぶ巨大なタンパク質である。その内部は単独、もしくは複数のモジュールによって構成されている。一つのモジュールには原則的にアシル基の縮合反応を触媒するケトシンターゼ (KS) ドメイン、開始基質や伸長基質の転移反応を触媒するアシルトランスフェラーゼ (AT) ドメイン、AT ドメインから転移されるアシル基をチオエステルとして保持するアシルキャリアプロテイン (ACP) が存在する。AT ドメインは各々ドメインごとにどのアシル基を転移させるかが決まっている。マロニルトランスフェラーゼであればマロニル CoA を、メチルマロニルトランスフェラーゼであればメチルマロニル CoA をそれぞれ特異的に認識し、伸長ユニットとして各々のモジュールの ACP へと転移させる。他にもメトキシマロニル-ACP, アミノマロニル-ACP, グリセリル-ACP 等、単独発現された ACP に結合した各アシル基が伸長基質として PKS の ACP へ転移されることが報告されているが [8]、これら基質に対する各 AT ドメインの認識機構についても興味を持たれる。次にケトシンターゼ (KS) ドメインが前モジュールの ACP に結合しているポリケチド鎖と伸長基質の脱炭酸を伴ったクライゼン型縮合反応を触媒し、ポリケチド鎖が伸長される。その後ポリケチド鎖に生じた β 位のカルボニル基はケトレダクターゼ (KR) ドメイン、デヒドラターゼ

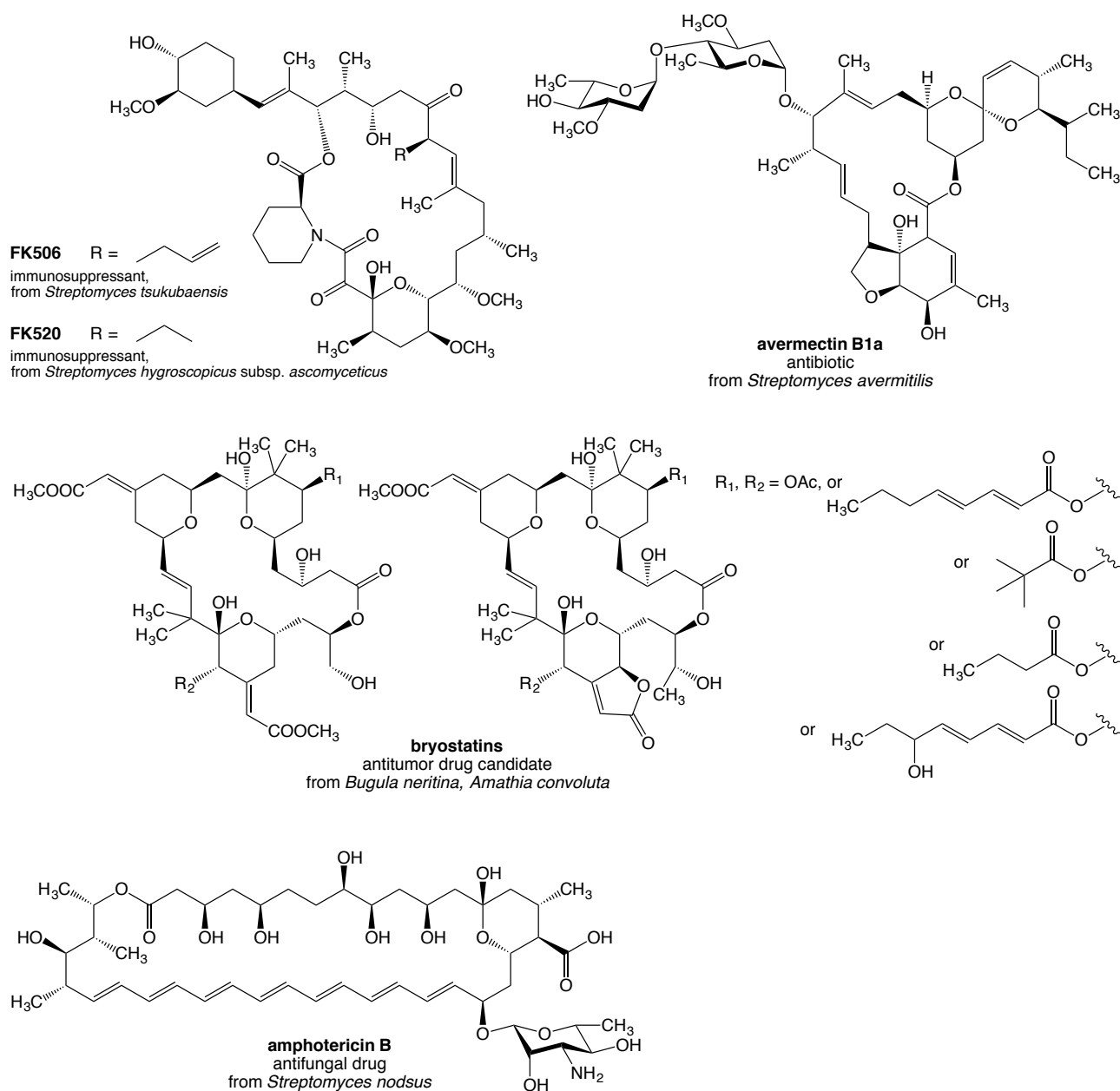


Fig. 2 ポリケチド化合物群

(DH) ドメイン、エノイルレダクターゼ (ER) ドメインにより、水酸基への還元、脱水を伴った二重結合の形成、二重結合の還元が各々なされ、飽和のメチレン側鎖が生成される。全てのモジュールによってポリケチド鎖が完成した後は PKS の C 末端に位置するチオエステラーゼ (TE) ドメインによって環化、もしくはチオエステルの加水分解反応が触媒され、PKS から放出される。一次代謝経路における脂肪酸生合成酵素 (FAS) ではこれら一連の反応が全て行われるのに対し、I 型 PKS では KS-AT-ACP 以外の修飾酵素ドメインの存在はモジュール毎に異なっている (Fig. 4)。これらに対応して各モジュールの最終産物の構造が変化し、ポリケチド化合物の構造多様性を与えている。

また 2006 年、ブタ由来脂肪酸合成酵素の X 線結晶構造解析がなされたことを発端とし [9]、DEBS の KR-AT ジドメイン [10]、KR ドメイン [11]、DH ドメイン [12] など、各ドメインの結晶化・構造解析が相次いでなされ、従来アミノ酸配列の解析のみで想定するしかなかった I 型 PKS 各ドメインの反応特異性に関する知見が一層深まっている [13]。例えば type I PKS の KR ドメインについては特徴的に保存されているアミノ酸配列モチーフのパターンと酵素反応生成物の立体化学に相関が見出されることが明らかにされており [14]、アミノ酸配列の保存領域に着目するだけで、KR ドメインの反応特異性を決定することが殆どの場合において可能になっている。すなわち原則に従った基本的な PKS においては、各機能ドメインの詳細な反応機構が明らかになりつつある。また、機能未知の PKS アミノ酸配列であっても、ネットワーク上で利用可能な SBSPKS [15]、ClustScan [16]、antiSMASH [17] 等のドメイン解析ツールを用いれば、それらの反応特異性を高い精度で予測することも可能になってきている。

一方、先に述べたように、遺伝子情報から得られる二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの数 は飛躍的に増大しており、その中には今までのポリケチド生合成の原則に従わない、特殊な PKS が種々発見されている。その中でも代表的なのは *trans*-AT PKS である。これは PKS のモジュール中にポリケチド鎖伸長反応に必須な AT ドメインが存在せず、PKS とは別に発現される単独の AT ドメインが各モジュールの ACP へ伸長基質を転移させる特徴を持つ。共生細菌など非標準型の原核生物に存在する PKS は全てこの *trans*-AT PKS であることが知られており、AT ドメインが個々のモジュール内に存在する標準型の PKS (*cis*-AT PKS) と共通の起源を有しながらも、進化初期の段階で別経路をたどっている [18]。このような *trans*-AT PKS から生産されるポリケチド化合物は標準型 PKS 産物とは異なる構造多様性を有している (Fig. 5)。

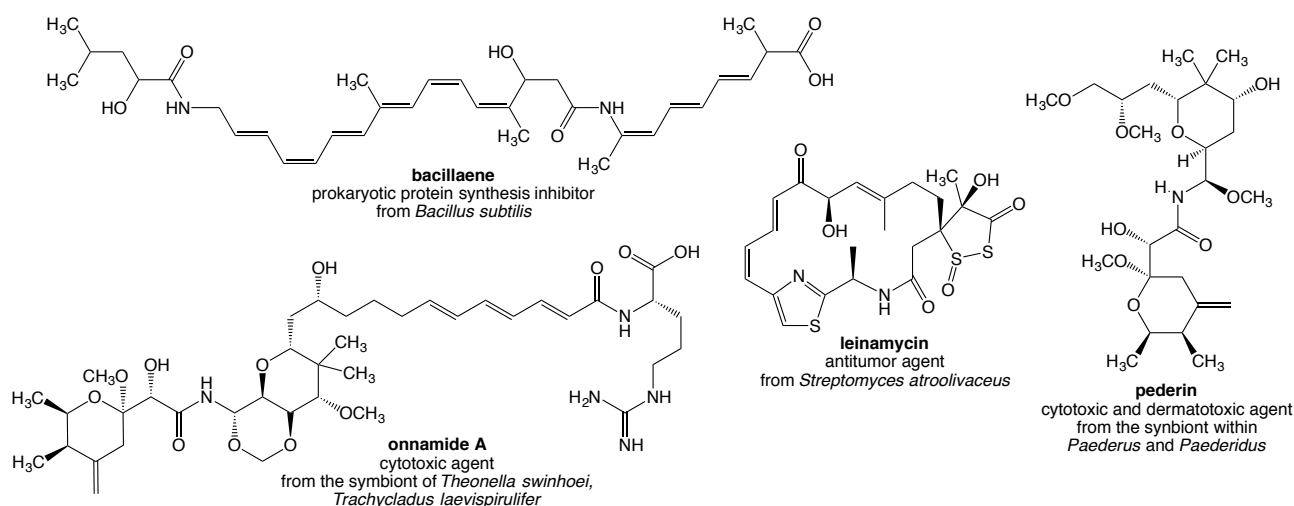


Fig. 5 *trans*-AT PKS により生合成されるポリケチド化合物群

例えば *cis*-AT 型の PKS は α 位にメチル基を有するポリケチドを生合成する場合、伸長基質に

メチルマロニル CoA を用いるが、*trans*-AT 型の PKS を有する生物種では、メチルマロニル CoA 自体を生合成することが出来ない場合が多い。そこで *trans*-AT 型 PKS ではポリケチド骨格の伸長中、もしくは形成後に *S*-アデノシル-L-メチオニン (SAM) 依存型のメチル基転移酵素によって α 位にメチル基を後から付加している [19]。またチオエステル β 位においても、メバロン酸経路におけるイソペンテニル二リン酸生合成と類似した機構で、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル-CoA 合成酵素 (3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Synthase, HMGS) と相同性を有する酵素が PKS 上のチオエステルにエキソメチレンを付加することが知られている (例: バシラエン生合成における β -側鎖の生成, Fig. 6) [20]。

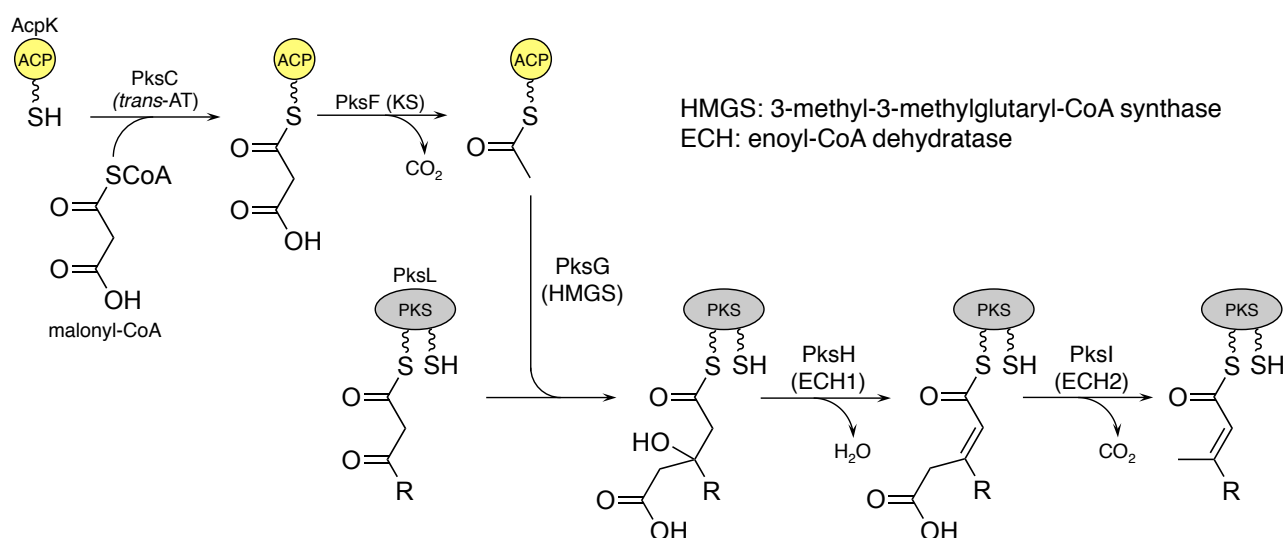


Fig. 6 バシラエン生合成経路における β 位のメチル化

以上のように、ポリケチド化合物は様々な PKS から生合成され、圧倒的な構造多様性を有しているが、 β -アミノ酸を開始基質として生合成されるポリケチド化合物もまた独自の多様性を有しているポリケチド化合物群である。通常ポリケチド化合物は、開始基質にアセチル-CoA やプロピオニル-CoA 等のカルボン酸の誘導体、もしくは一次代謝産物である各種 L-アミノ酸を用いることが知られている。しかし、このグループに属する化合物の開始基質は、一次代謝では生合成されとは想定しにくい β -アミノ酸である。すなわち、この開始基質生合成には、PKS 遺伝子クラスター毎に独自の β -アミノ酸生合成酵素が存在していることが想定できる。当研究室ではこれらの化合物群の生合成、特に先にも述べた β -アミノ酸開始基質の生合成及び PKS への導入機構に興味を持ち、種々の解析を行ってきた。

β -アミノ酸含有型ポリケチド化合物の開始基質生合成経路を *in vitro* で解析した例として、ビセニスタチン (vicenistatin) のスターター生合成機構がある (Fig. 7 中段右)。放線菌 *Streptomyces halstedii* HC34 により生産される、この 20 員環マクロラクタム配糖体の生合成遺伝子クラスター (vin クラスター) は、当研究室の Ogasawara らにより解読され、通常の PKS 生合成遺伝子クラ

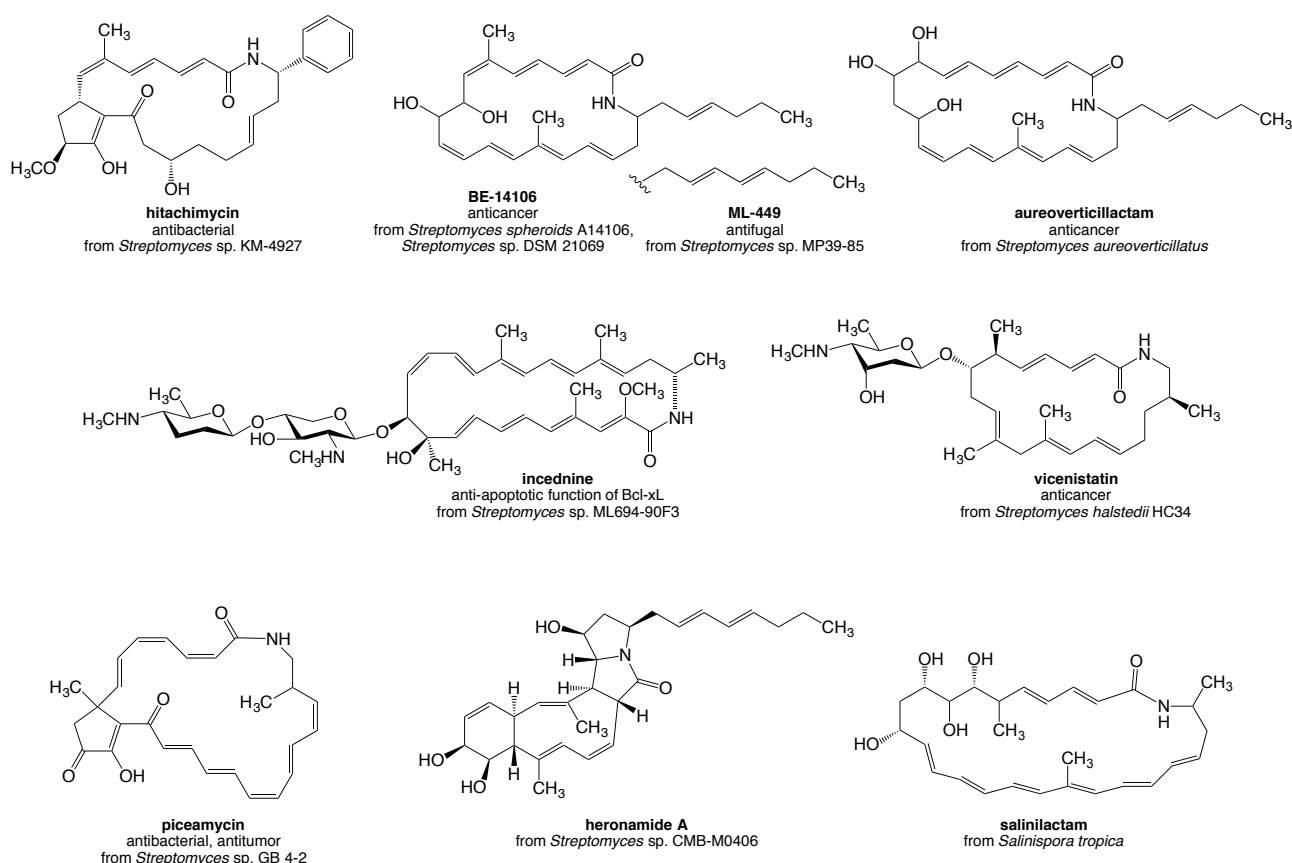


Fig. 7 β -アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質

スターでは見られない遺伝子群の存在が明らかとなった [21]。これらの遺伝子は、L-グルタミン酸ムターゼや脱炭酸酵素、非リボソーム性ポリペプチド合成酵素 (NonRibosomal Polypeptide Synthase, NRPS) のモジュール内に存在する個々の機能ドメインに類似した酵素をコードしていた。これらの酵素機能は当研究室の Shinohara らによりほぼ全てが解明されている (Fig. 8) [22]。すなわち、ビセニスタチン生合成開始基質である 3-アミノ-2-メチルプロピオン酸は、L-グルタミン酸を出発物質として以下のように生合成される。まず L-グルタミン酸は、L-グルタミン酸ムターゼ VinH, VinI の触媒反応により、(2S, 3S)-3-メチルアスパラギン酸へと変換される。続いて ATP 依存型アデニル化酵素 VinN によりアデニル化が起こり、続いて ACP である VinL へと転移される。その後ピリドキサル-5'-リン酸 (PLP) 依存型脱炭酸酵素 VinO によりアシル側鎖の脱炭酸反応が行われた後、もう一つの ATP 依存型アデニル化酵素 VinM が L-アラニンを用いて 3-アミノ-2-メチルプロピオニル-VinL のアミノ基を「保護」する。これは PKS 伸長反応初期段階で生じたポリケチド鎖において、開始基質のアミノ基がチオエステルへ求核攻撃し、思わぬ 6 員環形成が起こってしまうのを防ぐために行われていると考えられている。以上により完成したジペプチドはアシル基転移酵素 VinK により PKS へと転移され、アグリコン骨格形成のための伸長反応が触媒される。そしてポリケチド伸長反応終了後、ペプチド加水分解酵素である VinJ がアラニル基を「脱保護」し、TE ドメインがこれをラクタム環化する、というものである。

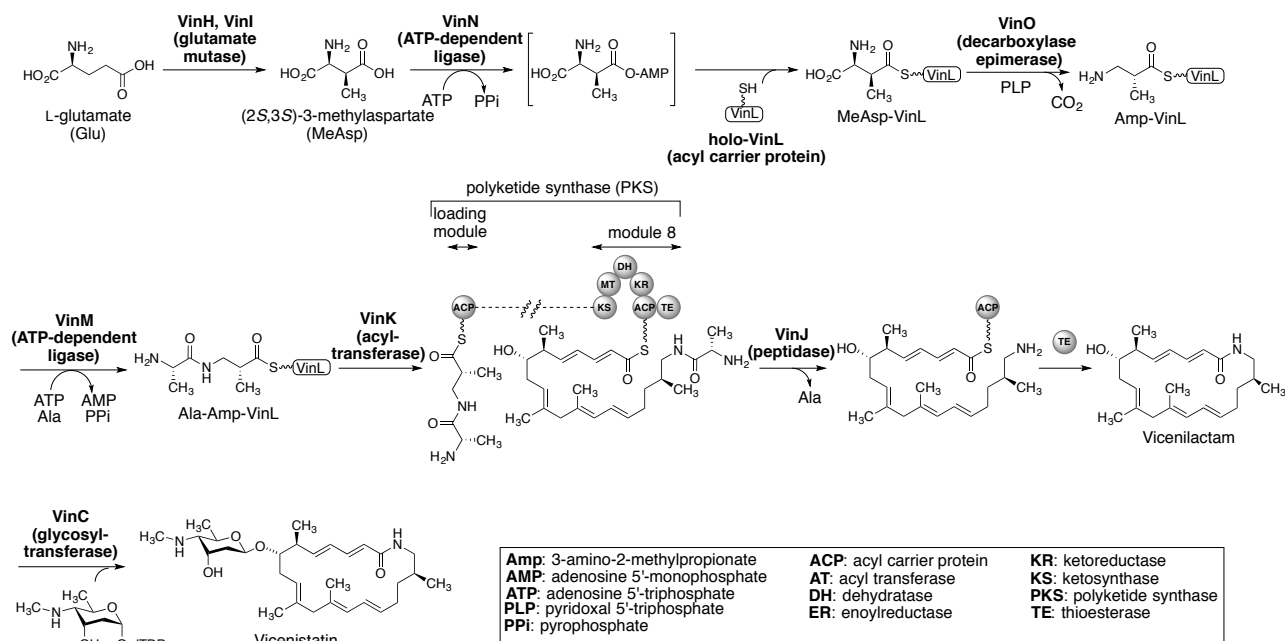


Fig. 8 ビセニスタチンの開始基質生合成機構

近年、サリニラクタム [23] や BE-14106 [24], ML-449 [25] 等、いくつかの β -アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質生合成遺伝子クラスターが報告されているが、何れにおいても *vin* クラスターに存在した二つのアデニル化酵素、単独の ACP とアシル基転移酵素、ペプチド加水分解酵素をコードする遺伝子が保存されている。すなわち、このグループに属する抗生物質の開始基質生合成は共通した経路で進行することが示唆されている。

クレミマイシン (cremimycin) は放線菌 *Streptomyces* MJ635-86F5 が生産する 19 員環 β -アミノ酸含有型マクロラクタムである。1998 年に Igarashi らによってその単離・構造決定が報告されている化合物であり [26]、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を含むグラム陽性菌に対して強力な生育阻害活性を示すことが知られている。着目すべきはその構造で、Fig. 9 に示すように一般的なポリケチド化合物と比較すると、非常に特異的なものであることがわかる。

まず、クレミマイシンは奇数炭素数 (9 個) の長鎖アルキル基を含む β -アミノ酸を開始基質として保持している。このような開始基質を有する化合物は Fig. 7 に示す BE-14106 [27], ML-449 [25], アウレオベルチシルラクタム (aureoveticillactam) [28], ヘロナミド (heronamide) 類 [29, 30] が知られているが、後者二つについては単離・構造決定が報告されているだけで、その生合成遺伝子や、詳細な開始基質生合成機構について全く一切の知見は報告されていない。このような β -アミノ酸は一次代謝経路で生産されている報告が無く、クレミマイシン生合成独自のものを有していると考えられる。またその生合成遺伝子中には、*vin* クラスターと共通の開始基質生合成に関わる遺伝子が存在することが予想される。

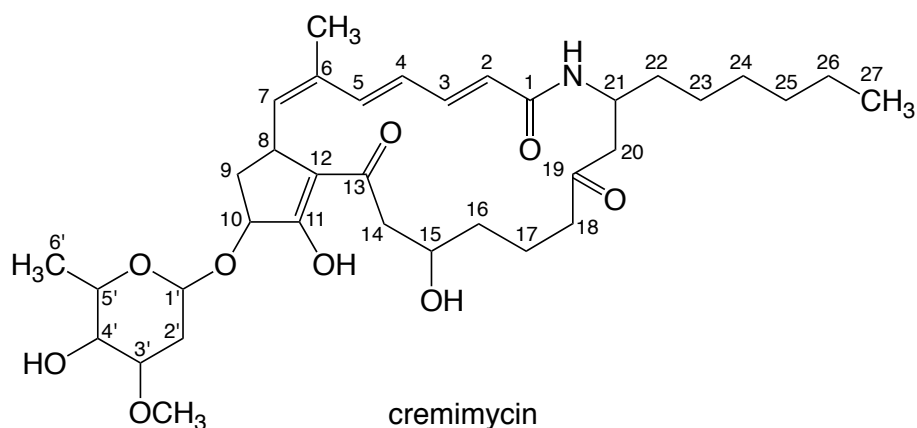


Fig. 9 Igarashi らによって報告されたクレミマイシンの構造 (数字は炭素原子の位置番号を示す。)

Table 1 種々の菌種に対するクレミマイシンの生理活性 (抜粋)

Test organisms	MIC ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209P	0.39
<i>S. aureus</i> Smith	< 0.2
<i>S. aureus</i> MS16526 (MRSA)	0.39
<i>S. aureus</i> TY-04282 (MRSA)	0.78
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-558	< 0.2
<i>Corynebacterium bovis</i> 1810	0.39
<i>Escherichia coli</i> NIHJ	> 100
<i>Salmonella enteritidis</i>	> 50
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	> 50

二つ目として挙げられるのが、炭素-炭素結合で形成された五員環を有している、すなわち二環性マクロラクタム骨格をアグリコンとして保持する点である。これはヒタチマイシン [31] やピセアマイシン (piceamycin) [32] でも見られる構造ではあるが、その形成機構に関する知見は全く存在しない。ポリケチド鎖の完成後、芳香環化やシクロプロパン環、またヘテロ原子を含む 5 員環・6 員環化が進行する事象はいくつか報告されているが、熱力学的にみても不利な炭素五員環を分子内に形成する生合成機構は解明されておらず、非常に興味深い。

最後はクレミマイシンアグリコンに結合している 2,6-ジデオキシ-3-O-メチルアロース (シマロース, cymarose) の存在である。ポリケチド化合物は配糖体として単離されることが多く、この配糖化が生理活性を高めていることも知られている。また、この際に結合している糖は高度に修飾を受けていたり、L 糖であったりすることがある。シマロースも 2 位と 6 位が各々デオキシ化されており、3 位の水酸基はアキシアル位に配置され、さらにメチル化を受けている。シマロースが結合している天然物として植物由来のプレグナン配糖体 [33–35] やヘリキノマイシン

(heliquinomycin) [36] が報告されているが (Fig. 10)、何れも構造決定が行われただけであり、この生合成機構にも興味を持たれる。

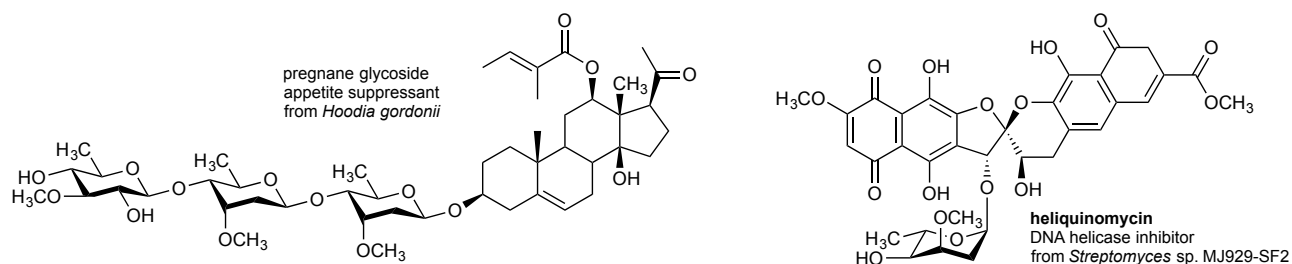


Fig. 10 D-シマロースを有する *Hoodia gordonii* 由来のプレグナン配糖体と L-シマロースを有するヘリキノマイシンの構造

すなわち、これら特異な構造を有するクレミマイシンの生合成機構を明らかにすることは、ポリケチド生合成機構に関わる新たな情報を追加し、ポストゲノム研究への礎になると期待できる。またヘロナミドやピセアマイシン、アウレオベルチシルラクタム等、生合成機構が未解明な β -アミノ酸含有型ポリケチド化合物の生合成機構解明への足掛かりになると考えた。そこで本研究ではクレミマイシンの生合成機構を解明するための包括的な研究を行った。

以下、本論文における章立てを示す。

第二章ではクレミマイシンを構築するための基質を明らかとするため、安定同位体標識化合物を用いた投与実験について述べる。

第三章ではクレミマイシン生合成遺伝子クラスターの探索について述べる。またこの遺伝子クラスターがクレミマイシン生合成に関与することを実証するため、遺伝子破壊実験を行ったことも併せて述べる。

第四章ではクレミマイシン開始基質生合成におけるアミノ基転移反応について述べる。

第五章では本論文を総括する。

第2章 投与実験による生合成前駆体の解明

2.1 序

安定同位体標識化合物を用いた投与実験は 1970 年代以降、有機化合物の構造決定にフーリエ変換核磁気共鳴分光 (Fourier Transform Nuclear Magnetic Resonance, FT-NMR) が汎用され始めたことに端を発するものである [37]。ポリケチド化合物の生合成は前述したように、一般に開始基質と伸長基質がクライゼン型縮合反応によって脱炭酸を伴いながら結合し、ポリケチド鎖が伸びていくことで進行していく。開始基質には多様性があり、容易に基質を特定することが困難な場合があるが、伸長基質は酢酸から誘導されるマロニル-CoA、プロピオン酸から誘導されるメチルマロニル-CoA 等が一般的であり、他の伸長基質を用いる場合は非常に限定的なものとなっている。そのため核スピン量子数 1/2 を持つ ^{13}C で標識化した酢酸やプロピオン酸を生産菌培地に投与すれば、抗生物質生産菌はこれらの化合物を使用してポリケチド化合物を生産することが容易に予想できる。すると天然存在比が通常 1.1 % 程度である ^{13}C が、標識化合物が取り込まれた抗生物質では ^{13}C 標識された部分だけその存在比が大きく増大し、 ^{13}C -NMR ではそのシグナルの増大を直接観測することができる。この取り込みパターンを解析することにより、ポリケチド化合物の生合成前駆体がどの位置にどのように配置されているかを解明することができる。このような投与実験は ^{13}C 標識化合物以外にも重水素 (^2H) や ^{15}N 標識を用いたものなどが知られており、天然有機化合物の生合成経路を明らかにしていく上での強力な手段となっている。例えばクレミマイシンの構造類似体であるヒタチマイシンに対しては 1982 年に投与実験が行われており、ヒタチマイシンのアグリコン骨格は酢酸、プロピオン酸ユニットで構成され、開始基質はフェニルアラニンから誘導された β -フェニルアラニンであることが報告されている (Fig. 11) [31]。

また当研究室では投与実験によって、既に様々な抗生物質の生合成前駆体を解明している [38, 39]。最近では Takaishi らがインセドニンの生合成前駆体を投与実験にて解明している [40, 41]。インセドニンはクレミマイシン同様 β -アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質であり (Fig. 7 中段左)、その構造から開始基質は β -アミノ酪酸、伸長基質は酢酸、プロピオン酸、グリセロールから各々誘導されるマロニル CoA, メチルマロニル CoA, メトキシマロニル-ACP であると予想された。そこでインセドニン生産菌 *Streptomyces* sp. ML694-90F3 に各種 ^{13}C 標識化した生合成前駆体を投与し、抗生物質を各々単離、 ^{13}C -NMR で解析している。その結果、開始基質の β -アミノ酪酸は L-グルタミン酸から誘導されることが明らかとなり、伸長基質の生合成前駆体は予想した通り酢酸、プロピオン酸、グリセロールであることが解明された (Fig. 12)。また脱炭酸反応のタイミングにより、開始基質生合成における L-グルタミン酸から 3-アミノ酪酸への変換経

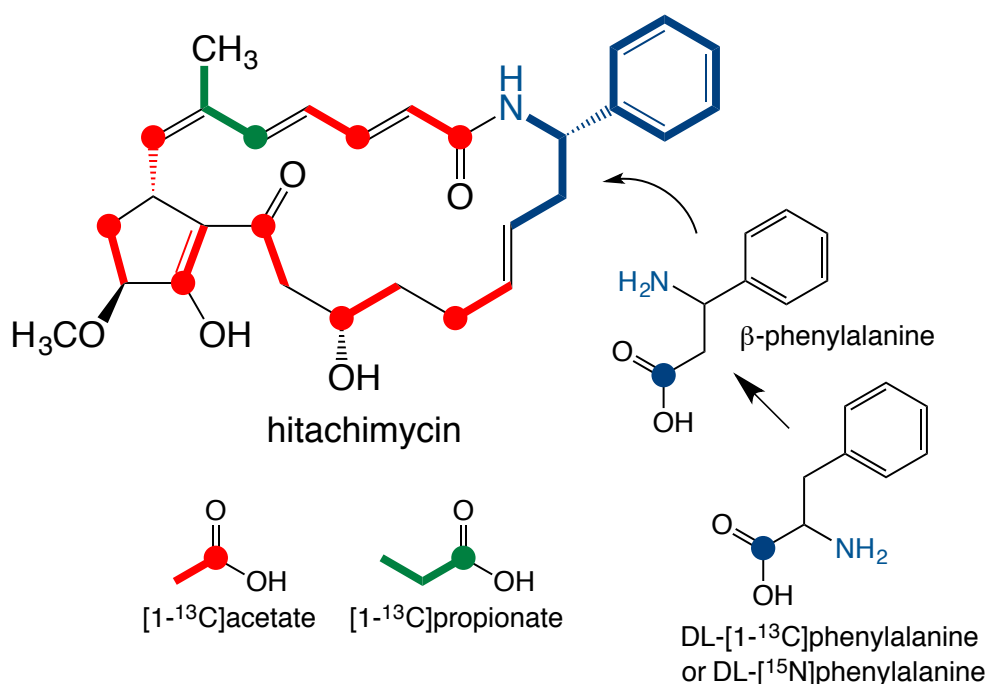


Fig. 11 投与実験で解明されたヒタチマイシンの生合成前駆体

路は、β-グルタミン酸、もしくは4-アミノ酪酸を経由する二つが考えられたが、²H 標識化した β-グルタミン酸のみがインセドニン骨格に取り込まれたことより、開始基質である 3-アミノ酪酸は、β-グルタミン酸を経由して生合成されることをも明らかにした (Fig. 13)。

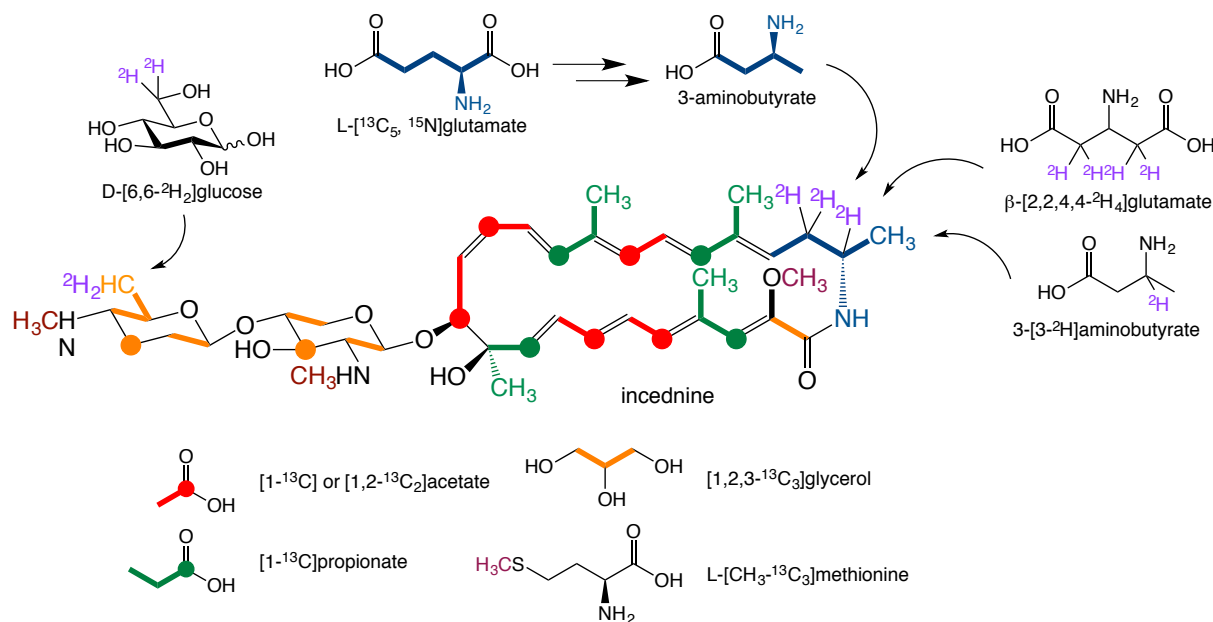


Fig. 12 投与実験でインセドニン骨格に取り込まれた安定同位体標識化合物とその取り込みパターン

現在まで生合成機構に関する知見が全く存在しないクレマイシンの生合成研究を始めるにあたり、このように NMR シグナルの増減の評価で判断でき、明解な結果が得られる投与実験は、

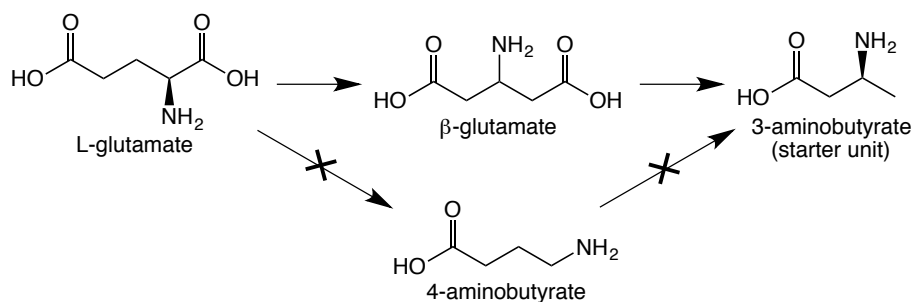


Fig. 13 投与実験により解明されたインセドニン開始基質生合成機構

初期段階の生合成研究として最も適したものだと考えた。そこで各種安定同位体標識化合物をクレミマイシン生産菌に投与、得られるクレミマイシンの NMR スペクトルを評価することにより、クレミマイシンの生合成前駆体の決定並びに生合成経路を推定することにした。

2.2 培養条件の検討

公益財団法人微生物化学研究所より供与頂いたクレミマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 (IMC S-0834) 株のクレミマイシン生産能を検証するため、培養、集菌し、Igarashi らの報告している手法に従ってクレミマイシンの単離を試みた (Fig. 14 右列) [26]。しかし、粗精製物を TLC にて確認したところ、クレミマイシンのスポットを確認することは出来ず、また $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいても報告されているようなシグナルは殆ど確認出来なかった。これはクレミマイシン以外の夾雑物が多過ぎるためだと考え、続けて精製作業を行った。しかし、Igarashi らの培養条件では、1.2 L の培養液中から数 mg のクレミマイシンを得るにとどまった。これは以降、安定同位体標識化合物を用いた投与実験を行うことが困難であることを示す結果であったため、培養条件を最適化することによってその生産能を改善する検討に着手した。種々検討の結果、Jørgensen らによって報告された BE-14106 生産用培地、0.3× BPS 培地 (Fig. 14) [24] をクレミマイシン生産菌の本培養に用いてみたところ、9 日間の本培養で 200 mL の培養菌体中から $^1\text{H-NMR}$ で容易にクレミマイシンの存在が確認できる程度の生産が確認できた。さらに 3 週間まで培養期間を延長したところ、クレミマイシンの生産量が最大 140 mg/L と従来の 50 倍以上に上昇することを見出した。そこでクレミマシン本培養条件は 0.3× BPS 培地での 28°C, 3 週間培養が最適条件と決定し、以下の投与実験に着手した。

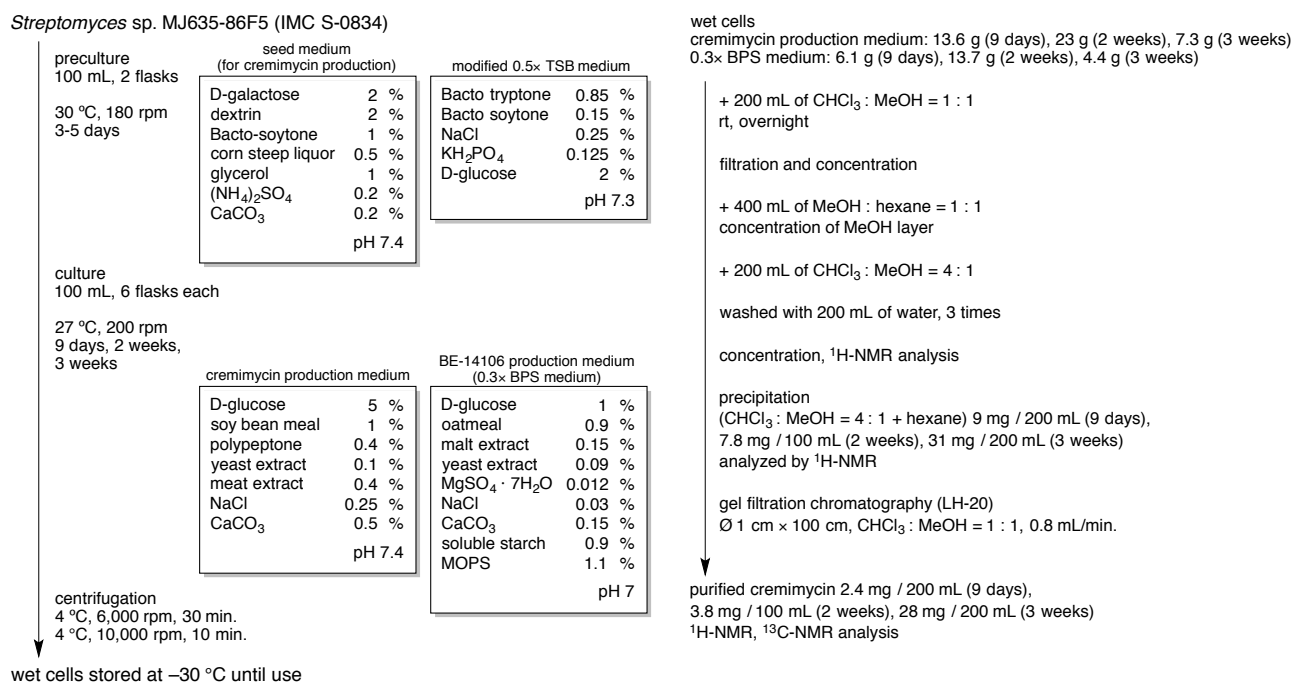


Fig. 14 クレマイシン生産菌の培養条件およびクレマイシンの単離工程

2.3 安定同位体基質を用いた投与実験

通常投与実験に用いる安定同位体標識化合物は、一次代謝での浪費を防ぐために抗生物質生産菌が抗生物質の生産を開始するタイミングで投与する。クレマイシン生産菌の場合、Igarashiらは本培養開始4日後からクレマイシンの生産を確認することができたと報告している。そこで本実験においてはクレマイシン生産菌の本培養4日後に各種安定同位体標識化合物を終濃度0.05%、もしくは0.1%になるように加えた。三週間の本培養後に得られた菌体は、先に述べた手法と同様に破碎・抽出・精製し、必要があれば、析出したクレマイシンをLH-20を用いたゲル濾過カラムクロマトグラフィーで更に精製した。その後¹³C-NMRで解析を行った。

投与実験の結果を示す前に比較のため、何も投与せず培養、精製したクレマイシンの¹³C-NMRスペクトルFig. 15に示す。Igarashiらは測定溶媒としてDMSO-*d*₆を用いていたが、本研究では測定後の操作を簡略化するため、重クロロホルム(CDCl₃)と重メタノール(CD₃OD)の混合溶媒で測定を行った。

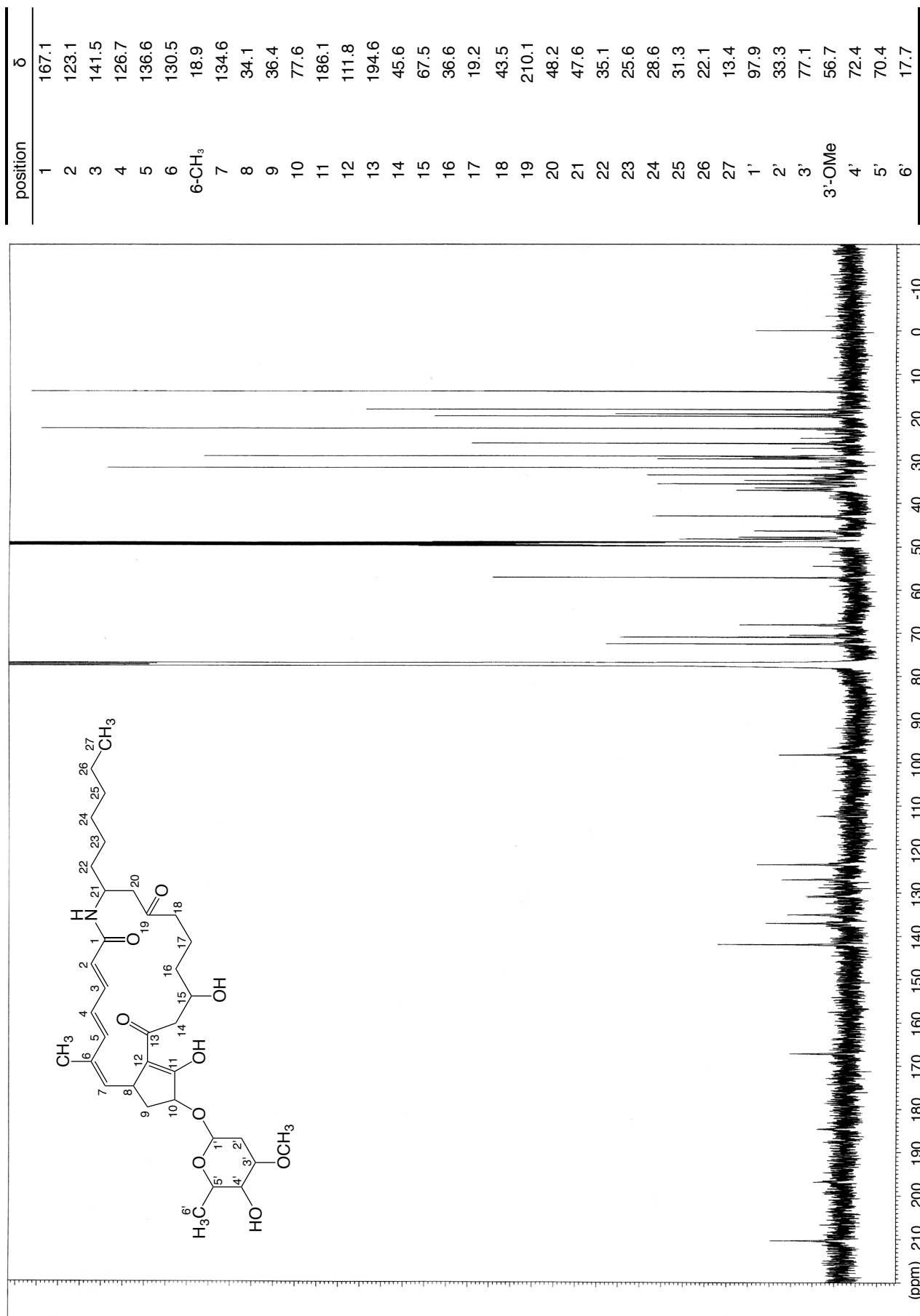


Fig. 15 クレミマイシンの ^{13}C -NMR スペクトル (125 MHz, in $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

2.3.1 [1-¹³C] 酢酸ナトリウムの投与

クレミマイシン生産菌に [1-¹³C] 酢酸ナトリウムを投与した場合に得られたクレミマイシンの ¹³C-NMR スペクトルを Fig 16 に示す。何も投与せず単離したクレミマイシンの ¹³C-NMR スペクトルと比較すると、奇数番号の炭素のシグナルが大きく増大していることがわかる。これはクレミマイシンに [1-¹³C] 酢酸から誘導された [1-¹³C] マロニル CoA がクレミマイシン骨格を形成するための PKS へ伸長基質として十分量取り込まれたことを意味している。また開始基質部分への [1-¹³C] 酢酸の取り込みパターンを解析すると、19–25 位までの奇数番号の炭素原子が全て ¹³C で標識化されていることがわかった。これは注目すべき結果である。何故ならばこの研究を行う以前の β-アミノ酸含有型マクロラクタムの β-アミノ酸開始基質は全てアミノ酸から誘導されたものであったのに対し、クレミマイシンの開始基質は酢酸から誘導されていたからである。また通常、奇数炭素数のアルキル基は最初に炭素数 3 のプロピオン酸ユニットが入り、その後炭素数 2 の酢酸ユニットが導入されていくことで生合成される。しかし 5 位や 25 位の炭素が標識化されたことから、通常プロピオン酸ユニットが取り込まれる部分にも酢酸が取り込まれるという結果を得た。

また、炭素 1–18 位部分の [1-¹³C] 酢酸の取り込みパターンは、1982 年に Omura らにより報告されたヒタチマイシンのアグリコン骨格への取り込みパターン [31] と同一であった。すなわちクレミマイシンとヒタチマイシンは互いに類似した PKS によってアグリコン骨格が構築されると考えられる。

2.3.2 [1-¹³C] プロピオン酸ナトリウムの投与

クレミマイシン生産菌に [1-¹³C] プロピオン酸ナトリウムを投与した場合に得られたクレミマイシンの ¹³C-NMR スペクトルを Fig. 17 に示す。クレミマイシン 5 位, 25 位炭素のシグナルのみが増大しているのが明確にわかる。すなわち 5, 6 位炭素と 6 位に存在するメチル基、25, 26, 27 位炭素はプロピオン酸ユニットが導入されることによって構築されることが明らかとなった。先の結果と合わせると、これらの部分はプロピオン酸, 酢酸何れの生合成前駆体も取り込まれることが明らかとなった。

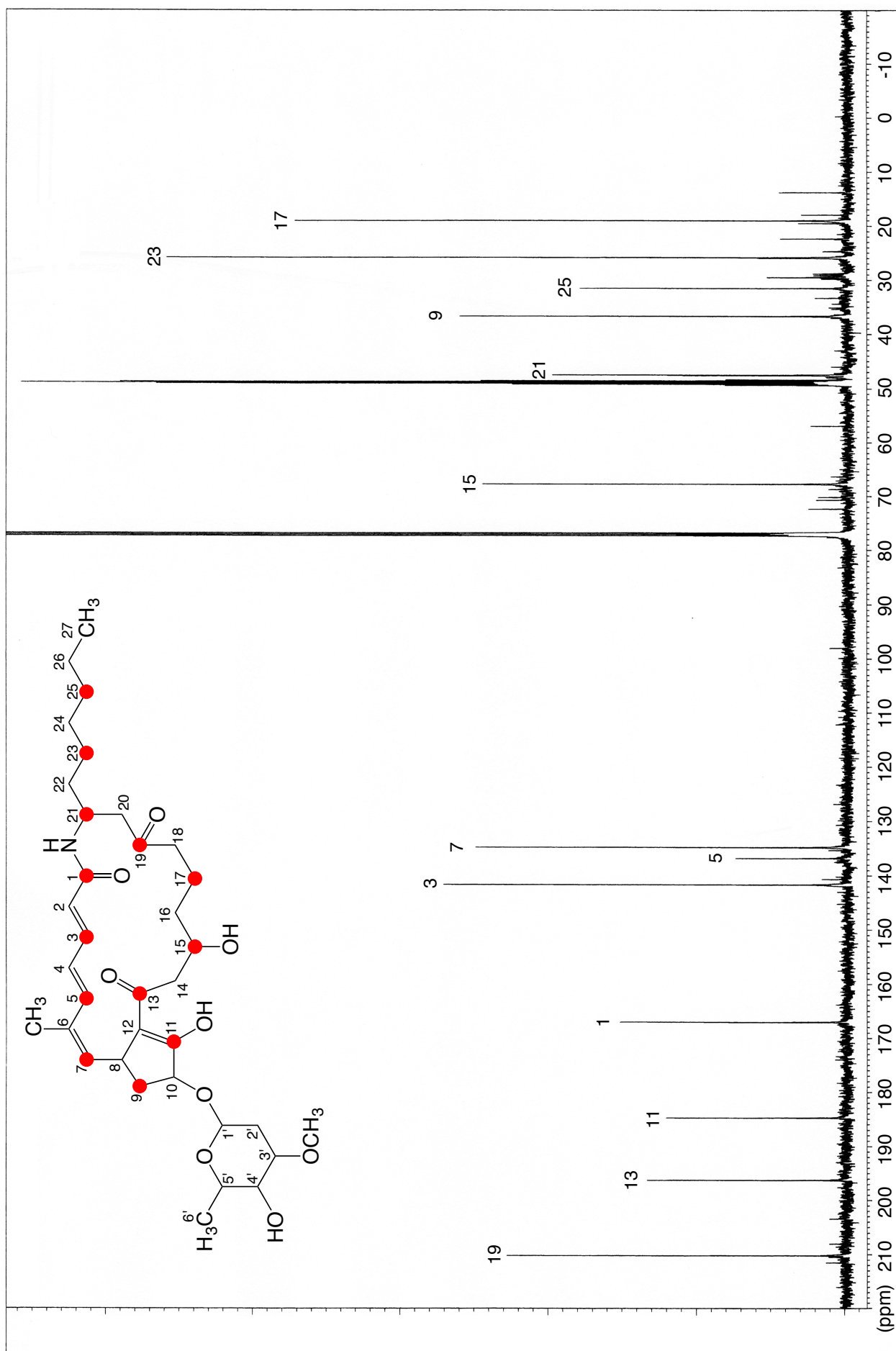


Fig. 16 [1- ^{13}C] 酢酸が取り込まれたクレマイシンの ^{13}C -NMR スペクトル (125 MHz, in CDCl_3 + CD_3OD)

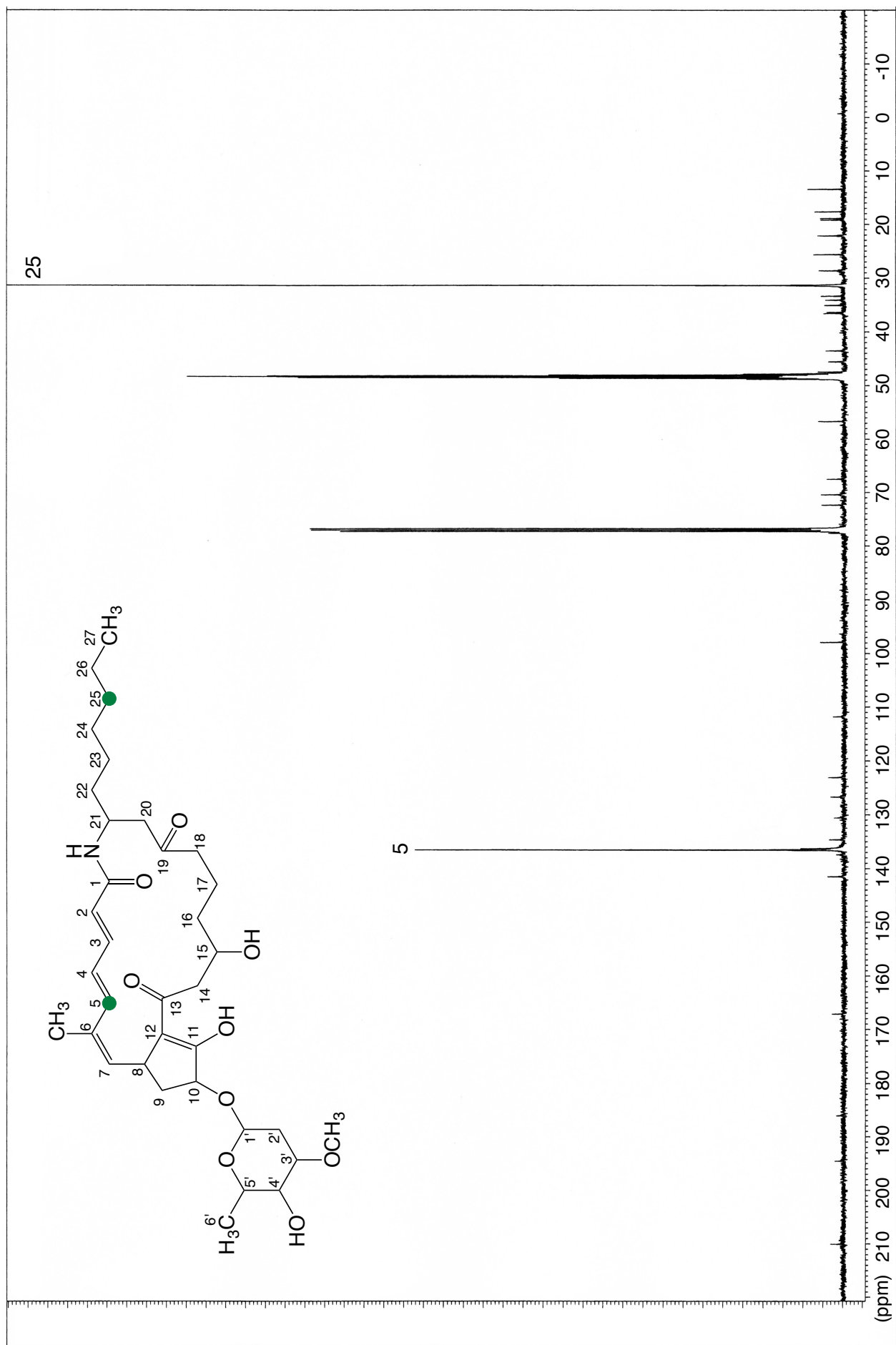


Fig. 17 [1- ^{13}C] プロピオン酸が取り込まれたクレマイシンの ^{13}C -NMR スペクトル (125 MHz, in CDCl_3 + CD_3OD)

2.3.3 [1,2- $^{13}\text{C}_2$] 酢酸ナトリウムの投与

クレミマイシン生産菌に [1,2- $^{13}\text{C}_2$] 酢酸ナトリウムを投与した場合に得られたクレミマイシンの ^{13}C -NMR スペクトルを Fig. 18 に示す。また 3 種の安定同位体基質を投与して得られたスペクトルにおける ^{13}C シグナルの相対強度を Table 2 にまとめた。この場合、クレミマイシンのアグリコン骨格に存在する全ての炭素のシグナルが増大した。さらに ^{13}C - ^{13}C のスピン結合によるカップリングが観測された。これは 1, 2 位ともに ^{13}C 標識化されている酢酸がそのままクレミマイシン骨格へ取り込まれたことを意味する。しかし、これらのカップリング定数は近い値のものが多く、2.3.1 で得られた結果から予想した通りの酢酸ユニットの取り込みパターンであるかどうかを確定するには至らなかった。また、プロピオン酸が取り込まれることが明らかとなった 5, 6 位, 6 位メチル基炭素、25, 26, 27 位炭素においても全てのシグナルが増大、カップリングを観測することができたものの、そのカップリングシグナルの現れ方は他のカップリングシグナルとは異なるパターンを示していた。すなわち Fig. 19 で見られるように、これらの部分以外のシグナルではカップリングシグナルの大きさが、カップリングせずに残存する一重線シグナルよりも大きくなっているのに対し、5, 6 位炭素と 6 位に存在するメチル基炭素、25, 26, 27 位炭素のシグナルにおいては残存する一重線シグナルの方が大きくなっていた。以上から更に詳細な [1,2- $^{13}\text{C}_2$] 酢酸の導入機構を調べる必要があると判断し、INADEQUATE を測定した。INADEQUATE とは **I**ncredible **N**atural **A**bundance **D**ouble **Q**Uantum **T**ransfer **E**xperiment の略で、 ^{13}C - ^{13}C の相関を観測する二次元 NMR である。 ^{13}C の天然存在比は先に述べた通り 1.1 % 程度であるため、 ^{13}C と共有結合を有している炭素原子が ^{13}C である確率は約 0.01 % と極端に小さい。そのため通常の有機化合物で INADEQUATE を測定するのは困難であることが多い。しかし本実験の場合、安定同位体標識化合物の取り込み率もシグナルの高さから推定すると比較的高く、 ^{13}C - ^{13}C カップリングも明確であったことから、この測定を行うことにした。

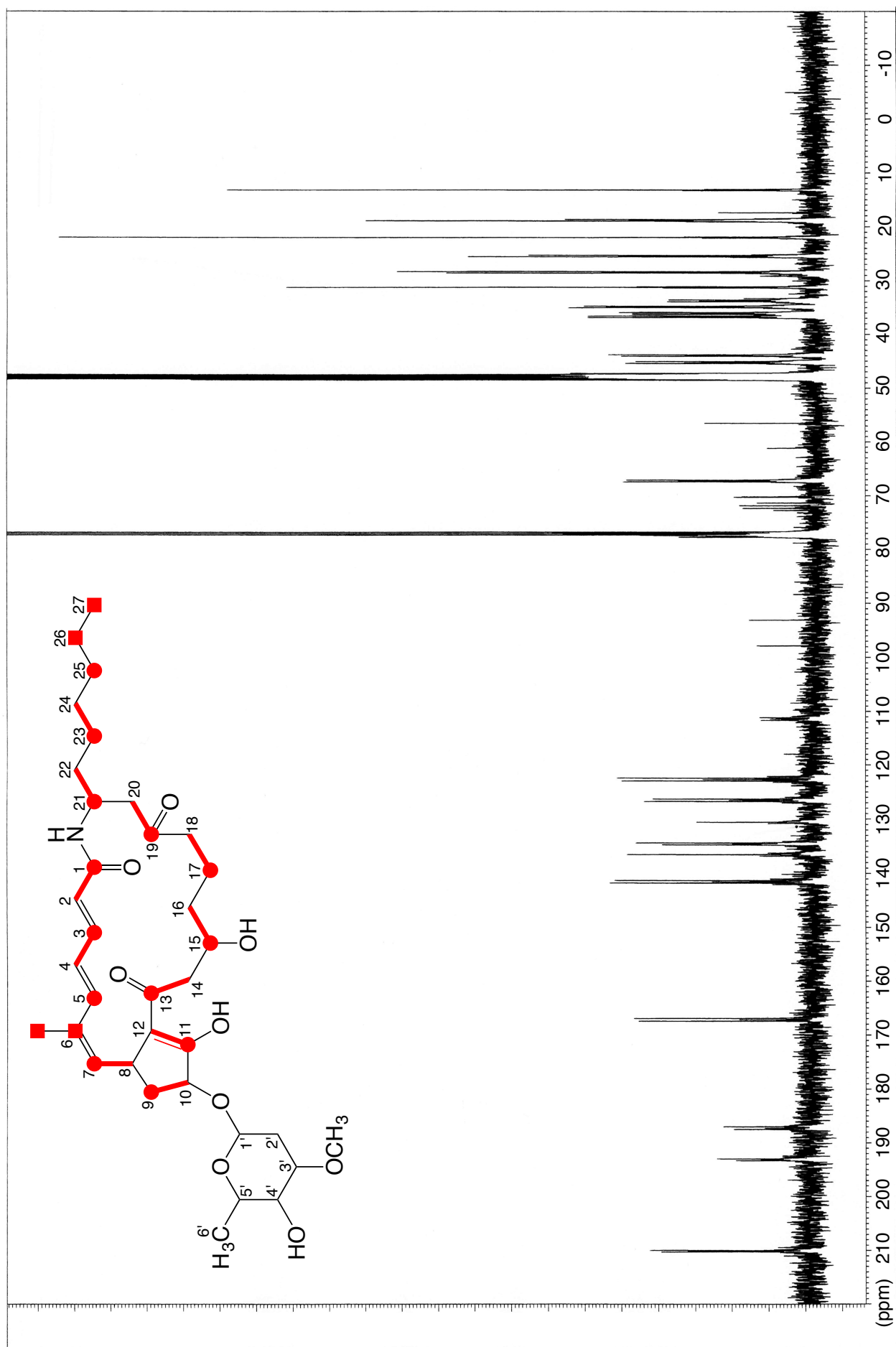


Fig. 18 [1,2- ^{13}C] 酢酸が取り込まれたクレマイシンの ^{13}C -NMR スペクトル (125 MHz, in CDCl_3 + CD_3OD)

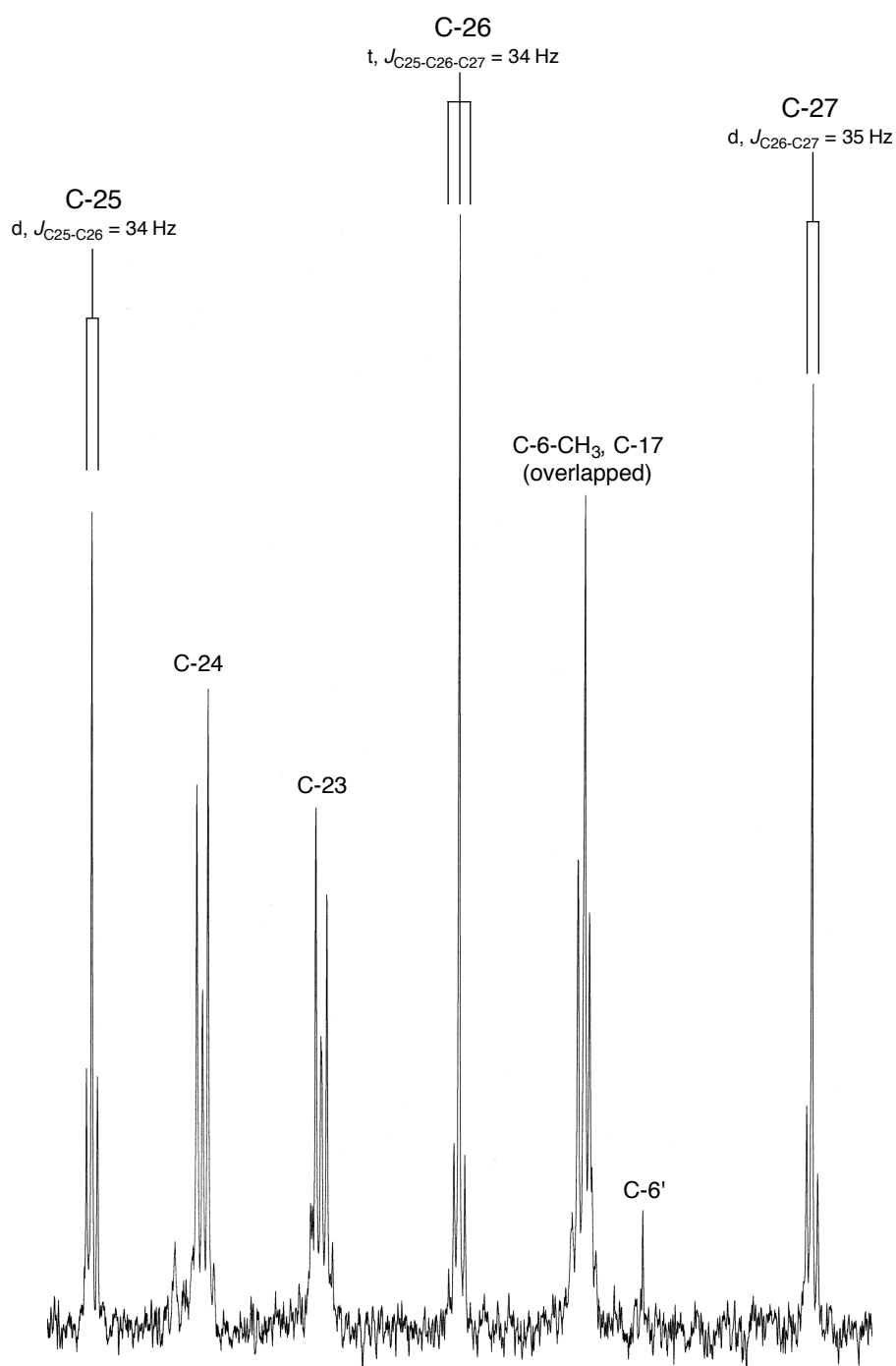


Fig. 19 [1,2- ^{13}C] 酢酸が取り込まれたクレマイシンの ^{13}C -NMR スペクトル (Fig. 18) 拡大図。C-25, 26 と C-26, 27 が互いにカップリングをしており、26 位炭素は両方のシグナルの和を示している。

Table 2 クレミマイシン各炭素の ^{13}C -NMR における化学シフトと安定同位体標識化合物を加えた時のシグナルの相対強度変化 ($3'\text{-OCH}_3$ を 1 として規格化、括弧内はシグナルの分裂パターンとスピンカップリング定数)

position	δ	Relative intensity		
		1- ^{13}C acetate	$^{13}\text{C}_2$ acetate	1- ^{13}C propionate
1	167.1	30.67	27.33 (<i>d</i> , $J = 65$ Hz)	2.87
2	123.1	1.92	18.46 (<i>d</i> , $J = 65$ Hz)	2.27
3	141.5	21.67	13.61 (<i>d</i> , $J = 56$ Hz)	1.69
4	126.7	3.39	21.67 (<i>d</i> , $J = 56$ Hz)	2.67
5	136.6	10.91	11.82 (m)	81.82
6	130.5	4.17	14.17 (m)	2.92
6-CH ₃	18.9	1.76	2.21 (m)	1.34
7	134.6	45.63	23.75 (<i>d</i> , $J = 44$ Hz)	3.25
8	34.1	1.97	11.61 (<i>d</i> , $J = 44$ Hz)	2.26
9	36.4	28.85	17.69 (<i>d</i> , $J = 39$ Hz)	2.42
10	77.6	n/a	12.26 (<i>d</i> , $J = 39$ Hz)	1.84
11	186.1	46.25	23.75 (<i>d</i> , $J = 64$ Hz)	3.25
12	111.8	5.00	33.00 (<i>d</i> , $J = 64$ Hz)	3.70
13	194.6	40.00	45.00 (<i>d</i> , $J = 43$ Hz)	3.00
14	45.6	2.10	16.21 (<i>d</i> , $J = 43$ Hz)	1.97
15	67.5	22.90	15.81 (<i>d</i> , $J = 39$ Hz)	2.10
16	36.6	1.81	18.06 (<i>d</i> , $J = 39$ Hz)	2.45
17	19.2	8.68	4.55 (n/a)	0.75
18	43.5	1.00	8.93 (<i>d</i> , $J = 36$ Hz)	1.25
19	210.1	35.26	22.11 (<i>d</i> , $J = 40$ Hz)	2.74
20	48.2	3.85	n/a	1.92
21	47.6	16.57	n/a	2.86
22	35.1	1.13	11.67 (<i>d</i> , $J = 37$ Hz)	1.37
23	25.6	11.55	7.09 (<i>d</i> , $J = 33$ Hz)	1.09
24	28.6	1.00	5.28 (<i>d</i> , $J = 33$ Hz)	0.53
25	31.3	4.62	3.81 (<i>d</i> , $J = 33$ Hz)	18.10
26	22.1	0.70	4.13 (<i>d</i> , $J = 35$ Hz)	0.43
27	13.4	0.70	3.39 (<i>d</i> , $J = 35$ Hz)	0.61
1'	97.9	3.21	2.53	4.79
2'	33.3	1.53	1.00	1.50
3'	77.1	n/a	n/a	n/a
3'-OCH ₃	56.7	1.00	1.00	1.00
4'	72.4	1.62	0.91	1.28
5'	70.4	1.30	1.11	1.39
6'	17.7	0.80	0.57	0.73

測定の結果得られた INADEQUATE スペクトルを Fig. 20, 21 に示す。x 軸方向は通常の ^{13}C -NMR の化学シフト、y 軸方向は ^{13}C - ^{13}C の相関が示されている。すなわち同一の y 座標シグナルを共有する炭素原子同士がスピン結合を持っていることを示している。このスペクトルにより ^{13}C -NMR スペクトルのシグナルが全て帰属でき、また ^{13}C - ^{13}C 相関から、クレミマイシンアグリコン骨格への酢酸・プロピオン酸ユニット導入機構が明らかとなった。

クレミマイシンの開始基質はプロピオン酸から誘導されるプロピオニル-CoA が取り込まれることによって生合成が開始される。その後酢酸から誘導されるマロニル-CoA が PKS 中で脱炭酸を伴いながら結合し、開始基質が構築される。開始基質以外のアグリコン骨格はヒタチマイシンと同一の機構で酢酸・プロピオン酸ユニットが取り込まれ、最後に TE ドメインによってラクタム環化、クレミマイシンアグリコン骨格が構築される。

しかしプロピオン酸ユニットが取り込まれる部分には標識化された酢酸も取り込まれた。その取り込みパターンは 5 位, 25 位に酢酸の 1 位炭素、6 位, 6 位メチル基, 26 位, 27 位に酢酸 2 位の炭素が取り込まれるというものであった。これは一次代謝経路の一つであるクエン酸回路 (TCA 回路) を経由して、酢酸がメチルマロニル-CoA に効率よく変換されたと考えることによって説明できる。すなわち TCA 回路では酢酸から誘導されたアセチル-CoA が基質となるが、これが回路中でコハク酸へと変換される。この時スクシニル-CoA からコハク酸への変換は可逆反応であり、コハク酸は対称分子であることから、標識化パターンが二種類のスクシニル-CoA が生成することになる。更にこの時スクシニル CoA からメチルマロニル-CoA への変換を触媒するメチルマロニル-CoA ムターゼの活性が高く、効率的にメチルマロニル-CoA が生産されたとすると、1 位に酢酸 1 位、2 位メチル基に酢酸 2 位の炭素原子が配置されたメチルマロニル-CoA、もしくは 2 位に酢酸 2 位の炭素原子が配置された ^{13}C 標識化メチルマロニル-CoA が生成する。これがクレミマイシン骨格へ取り込まれると、標識化酢酸を投与した場合でもプロピオン酸ユニットが取り込まれる部分の炭素原子が標識化されることになる (Fig. 22 上段)。

さらにこれが TCA 回路を一周経たスクシニル-CoA においても同様の変換が行われるとすると、4 種類の ^{13}C 標識化メチルマロニル-CoA が生じ、これらの中には ^{13}C - ^{13}C 相関を示すことのできるものも存在し、これが INADEQUATE スペクトルにて観測されたと考えられる (Fig. 22 下段)。

これらの推測を検証するために、TCA 回路の鍵化合物であるコハク酸の 2,3 位を重水素標識化した $[2,3-^2\text{H}_2]$ コハク酸を投与し、得られたクレミマイシンの ^2H -NMR を測定した。加えてシマロース部分の生合成前駆体を調べるために D- $[6,6-^2\text{H}_2]$ グルコースの投与実験も行った。

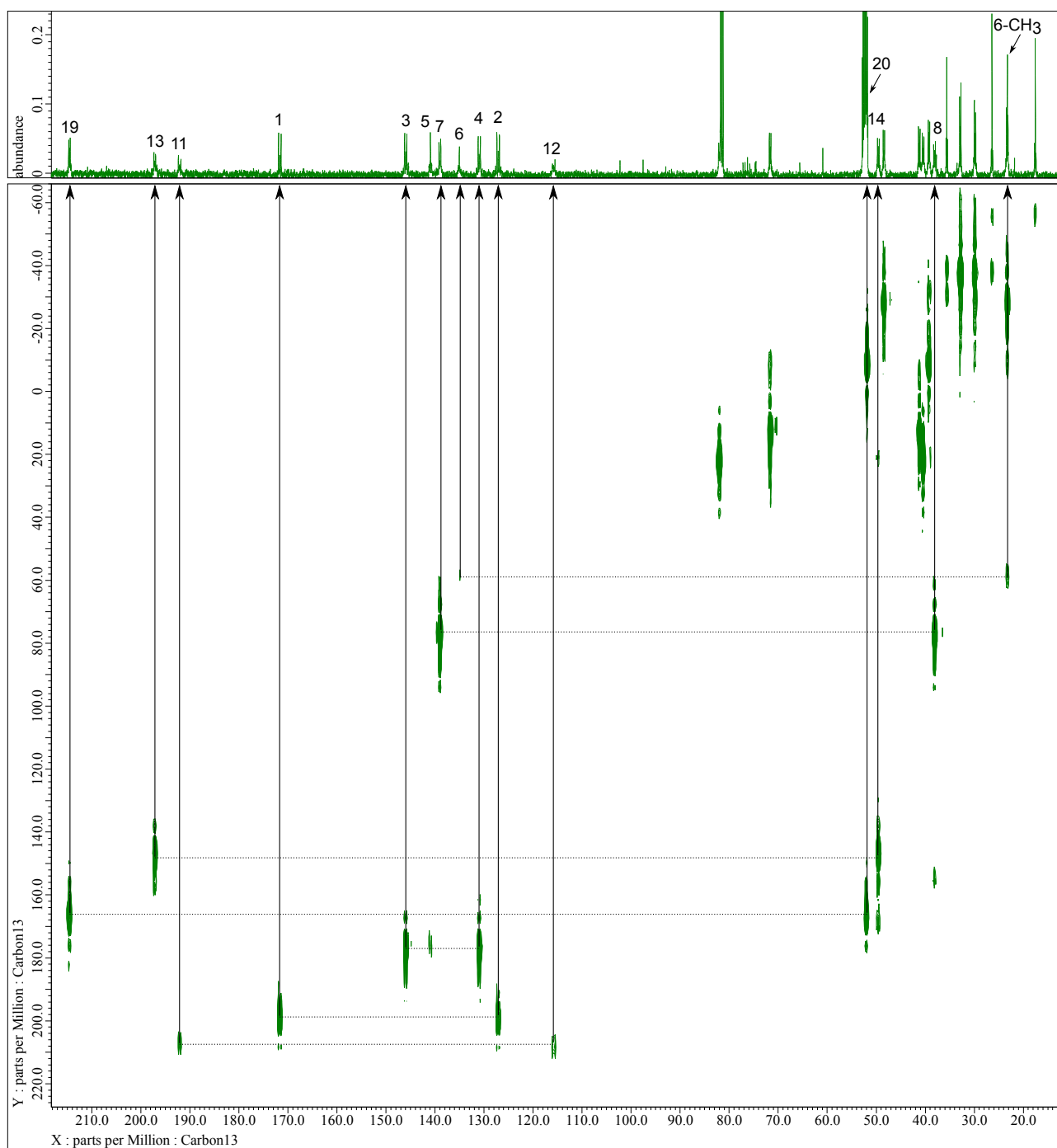


Fig. 20 [1,2- ^{13}C] 酢酸が取り込まれたクレマイシンの INADEQUATE スペクトル (in $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

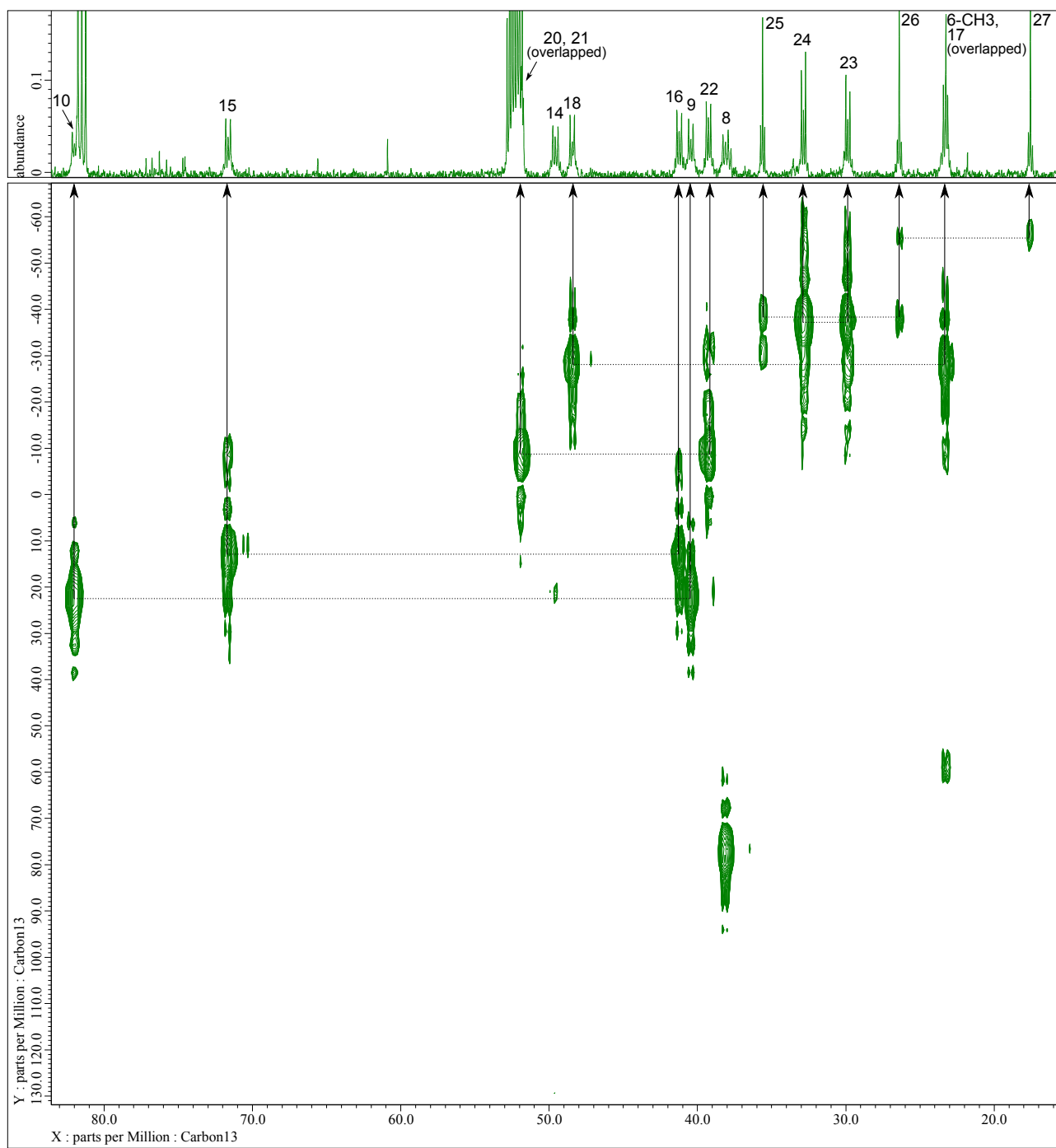


Fig. 21 [1,2- ^{13}C] 酢酸が取り込まれたクレミマイシンの INADEQUATE スペクトル拡大図 (in $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$)

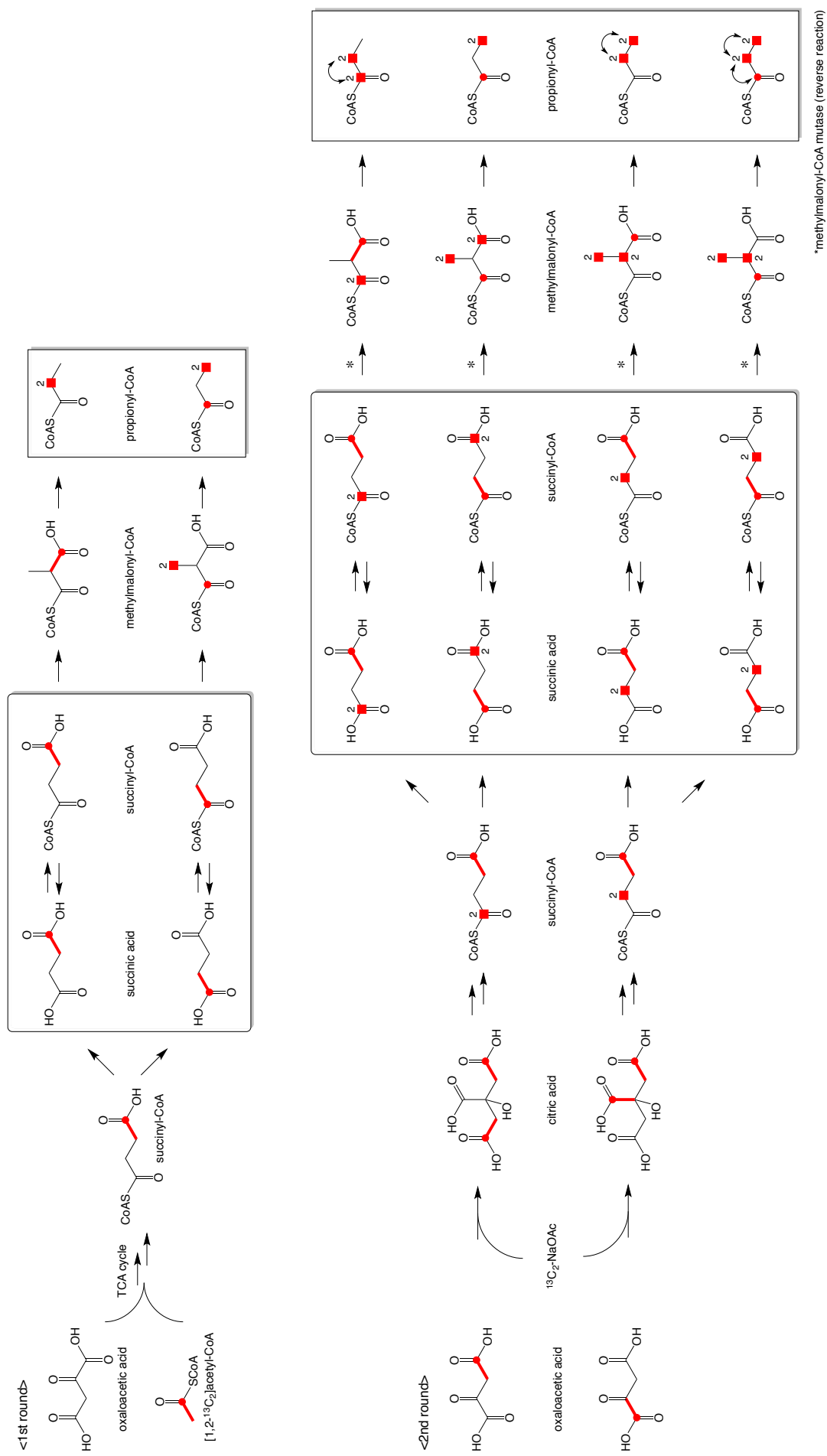


Fig. 22 [1,2-¹³C₂] 酢酸を出発物質とし、TCA 回路を経由して生成されるメチルマロニル-CoA またはプロピオニル-CoA の推定生成機構

2.3.4 コハク酸- d_4 および D-[6,6- $^2\text{H}_2$] グルコースの投与

コハク酸- d_4 および D-[6,6- $^2\text{H}_2$] グルコースを投与した場合に得られたクレマイシンの ^2H -NMR スペクトルを Fig. 23 に示す。2.3.3 の後半で推測した通り、重水素標識化したコハク酸はプロピオン酸ユニットが取り込まれる部分に取り込まれ、6 位メチル基, 26 位, 27 位で ^2H シグナルを観測することができた。一方 D-[6,6- $^2\text{H}_2$] グルコースを投与した場合はシマロース 6' 位部分に ^2H シグナルが観測されたことから、シマロースは D-グルコースを出発物質として生合成されることが明らかとなった。

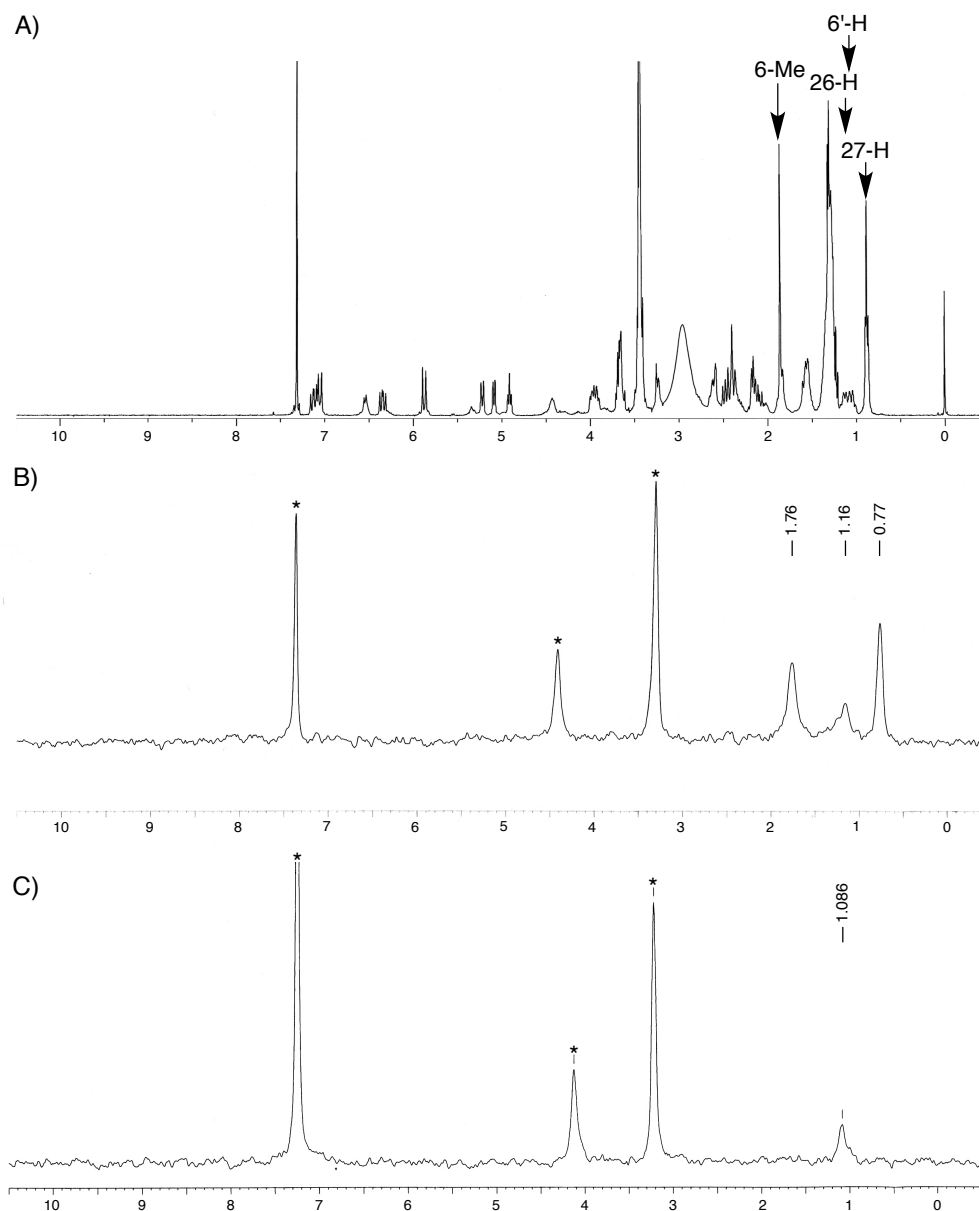


Fig. 23 A) クレマイシンの ^1H -NMR スペクトル (500 MHz, in $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) B) [2,3- $^2\text{H}_4$] コハク酸を投与して得られたクレマイシンの ^2H -NMR スペクトル (77 MHz, in $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$) C) D-[6,6- $^2\text{H}_2$] グルコースを投与して得られたクレマイシンの ^2H -NMR スペクトル (77 MHz, in $\text{CHCl}_3 + \text{CH}_3\text{OH}$) “*” は溶媒由来のシグナルを示す。

2.4 まとめ

本研究によって明らかとなったクレミマイシンの生合成前駆体の概要を Fig. 24 に示す。クレミマイシンのアグリコン骨格はその開始基質を含め全て PKS による酢酸およびプロピオン酸ユニットの縮合反応により構築されることが推定できる結果となった。プロピオン酸が取り込まれる部位にも ^{13}C 標識化した酢酸が取り込まれた理由については 2.3.3 で推定した通り、酢酸が TCA 回路を経由して構築されたメチルマロニル-CoA ならびにプロピオニル CoA が取り込まれることによって生じるものであることを、 ^2H 標識化したコハク酸を投与することによって実証することができた。このような現象は抗生物質生産菌培養時における条件によって生じることがあり、エリスロマイシン生産菌 *Saccharopolyspora erythraea* における投与実験においても同様に、標識化したコハク酸がメチルマロニル-CoA となってエリスロマイシン骨格に取り込まれたことが報告されている [42,43]。

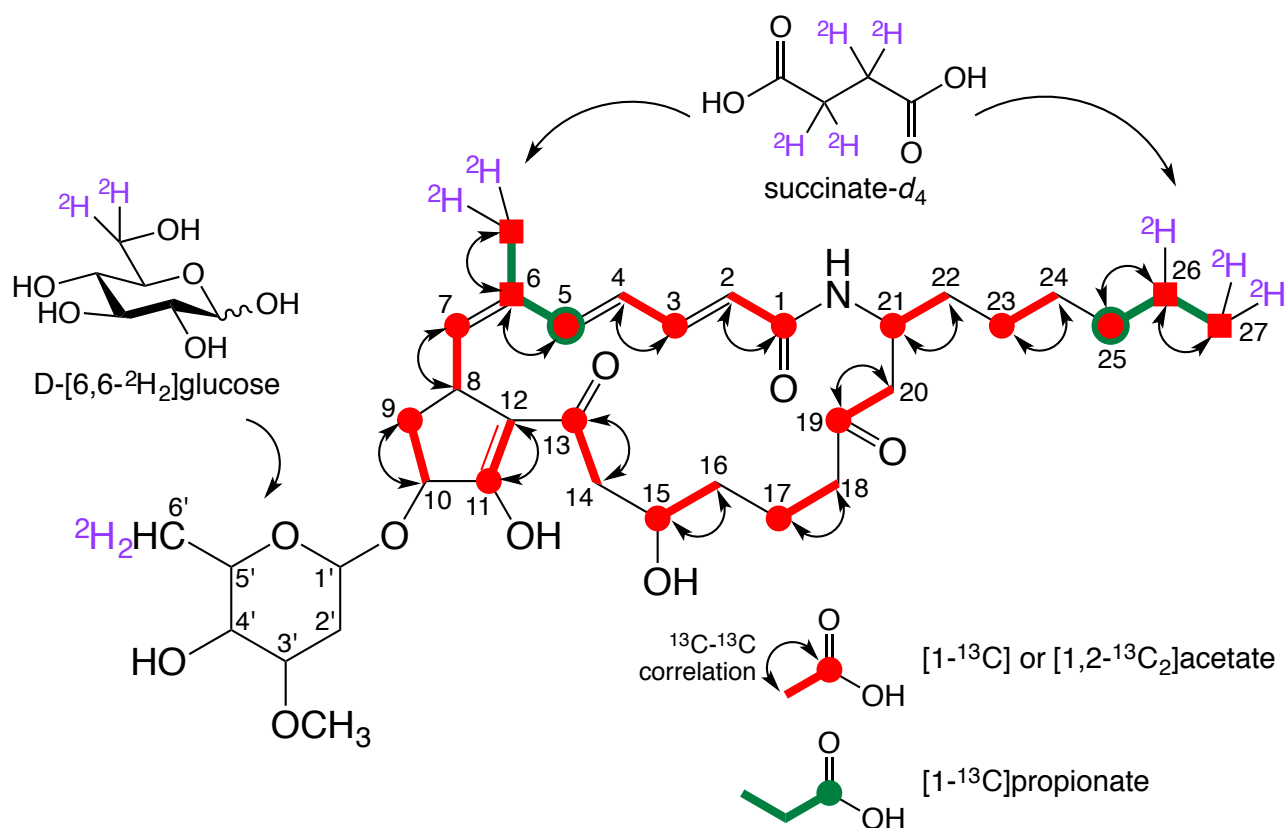


Fig. 24 クレミマイシン骨格に取り込まれた各種安定同位体基質とその取り込みパターン

シマロース部位についても ^2H 標識化した D-グルコースが取り込まれたことから、この希少糖骨格は D-グルコースを出発物質として生合成が開始されることが明らかとなった。これはシマロースと構造が類似するジギトキソース生合成と同様のものであると考えられる。

一方、今まで投与実験にて解明されている β -アミノ酸含有型マクロラクタムの開始基質は、全て α -アミノ酸を出発物質とし、各種修飾反応を受けて生合成されているものであったが、クレミマイシンの開始基質の炭素原子は、全てプロピオン酸、酢酸を前駆体として構築されることが分かった。このような β -アミノ酸の構築機構は、PKS-NRPS ハイブリッド酵素中で報告されている。例えば、マイコサブチリン (mycosubtilin) 生合成に関わる PKS-NRPS ハイブリッド酵素 MycA は、内部にアミノトランスフェラーゼドメイン (AMinoTransferase domain, AMT) と呼ばれる PLP 依存型アミノ基転移酵素と類似した機能ドメインを有し、近傍の ACP ドメインに結合している β -ケトチオエステルに対してアミノ基を導入することが知られている (Fig. 25) [44]。

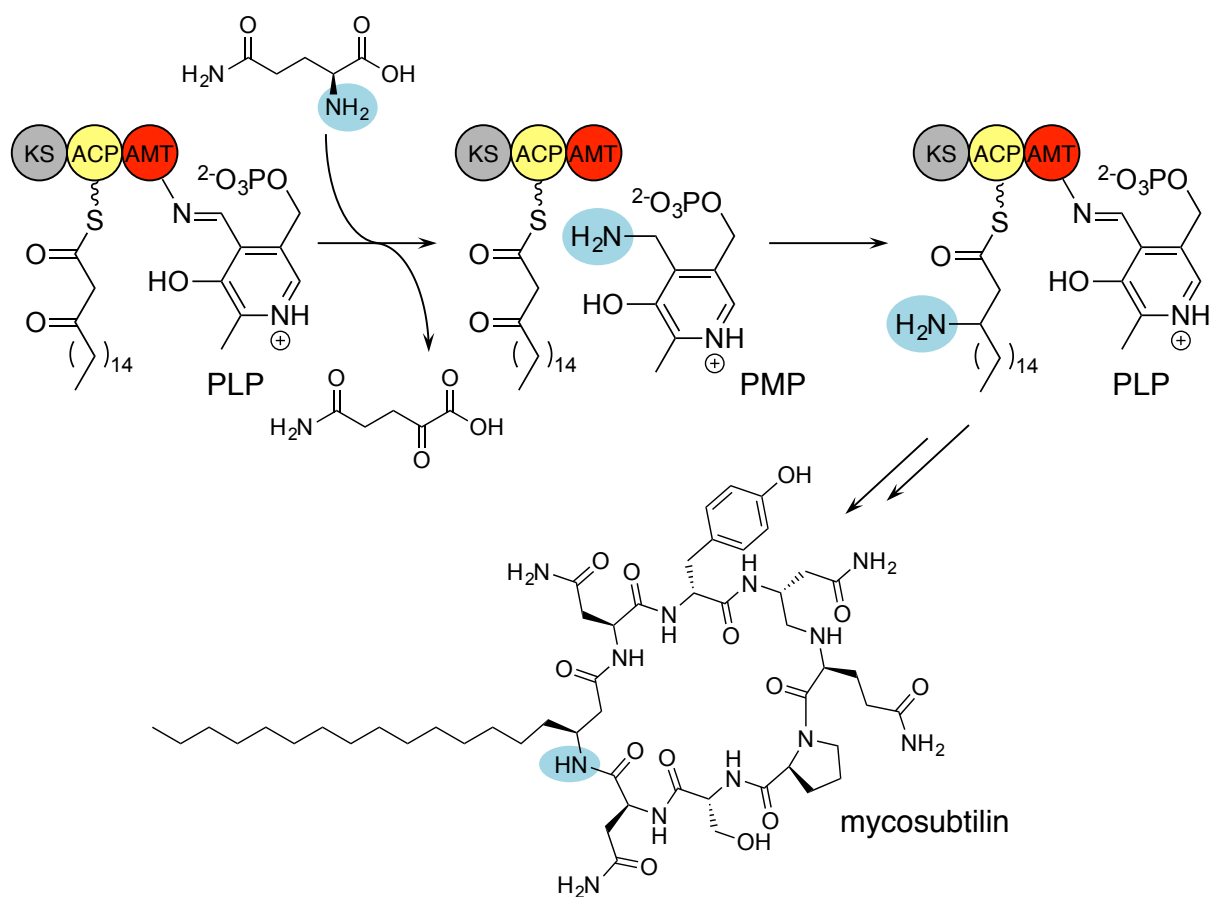


Fig. 25 MycA のアミノ基導入機構

すなわち、クレミマイシンの生合成遺伝子でも同様のアミノトランスフェラーゼドメインを有する PKS 遺伝子が存在するか、もしくは PLP 依存型アミノ基転移酵素遺伝子が存在していて、クレミマイシン開始基質のアミノ基導入反応が触媒されると考えられた。したがって、何らかのアミノ酸に由来する窒素原子が取り込まれると考えたが、その特定は困難と考え、次にクレミマイシン生産菌から生合成遺伝子クラスターを取得し、その機構を遺伝子・酵素レベルで解明することにした。

第3章 生合成遺伝子の探索と同定

3.1 序

第2章の結果よりクレマイシンの生合成前駆体は酢酸、プロピオン酸、D-グルコースであり、クレマイシンはPKSを含む生合成酵素群で構築される β -アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質であることが強く示唆された。しかし、特異な構造の開始基質である β -アミノ酸のアミノ基導入に関する知見を得ることは出来なかったことから、クレマイシン生合成遺伝子クラスターの探索を行い、遺伝子情報から得られる知見を基に開始基質アミノ基導入機構を解明する手掛かりを得ようと考えた。

2013年現在、二次代謝生合成遺伝子クラスターの取得を行う最も簡便な方法として、二次代謝産物を生産する染色体ゲノムDNAを全てショットガンシーケンスにて解読し、*in silico* スクリーニングする方法が知られている[45]。しかし、本章の研究開始当初、この手法は非常にコストが高く、実用化は殆どされていなかった。そこでクレマイシン生合成遺伝子クラスターの探索は従来から行われている手法に従って行った。すなわちクレマイシンの構造及び投与実験の結果から生合成に関わる遺伝子を推測し、その遺伝子と相同性のある既知遺伝子をプローブとしてターゲット遺伝子を取得、これを手掛かりにクレマイシン生産菌染色体ゲノムDNAのコスミドライブラリーをスクリーニングし、生合成遺伝子クラスターを見出すという方法である。

3.2 クレマイシン生合成遺伝子クラスターの取得

3.2.1 PCRによる標的遺伝子の探索

クレマイシンの構造に着目すると、シマロースは2位および6位がデオキシ化されていることがわかる。一般的にこのようなデオキシ糖の生合成は、グルコース1位にヌクレオチド二リン酸 (NDP) が結合して活性化された NDP 糖が逐次修飾反応を受けることによって生合成されることが現在までに多数報告されている[46]。それらの修飾反応を触媒する酵素遺伝子の中でもオルソログで高く保存された塩基配列部分を有するのは、NDP 糖-2,3-デヒドラターゼ遺伝子や NDP 糖-4,6-デヒドラターゼ遺伝子である。よって、クレマイシン生合成遺伝子クラスターを探索する手掛かりとして、これらの部分塩基配列を縮重プライマーによって増幅し、サザンハイブリダイゼーションによって探索するのが最も適した方法だと考えた。そこで、当研究室にてビセニスタチン生合成遺伝子クラスターを探索する際に用いた縮重プライマーを使用し、クレマイシン生産菌染色体ゲノムDNAを鋳型としてポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction, PCR) を行い、デヒドラターゼ遺伝子の取得を試みた。

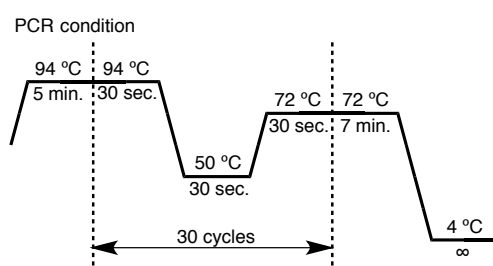
その結果、23DH1-23DH3C, 46DHN1-46DHC1, 46DHN1-46DH2C, 46DHN1-46DH3C の組み

Table 3 NDP 糖-2,3-もしくは 4,6-デヒドラターゼ遺伝子の相同性の高い塩基配列を増幅するために使用した縮重プライマー (S = C or G, Y = C or T, B = C or G or T, H = A or C or T, R = A or G, W = A or T)

primer	sequence
for NDP sugar-2,3-dehydratase	
23DH1 (forward)	5'-CGGGCGSTTCTTCWCCRTCAGG-3'
23DH2 (forward)	5'-CGGGCGSTTCTTCWCCRTCAGG-3'
23DH3C (reverse)	5'-GMKCCCTGCTCGGACTGGAG-3'
for NDP sugar-4,6-dehydratase	
46DHN1 (forward)	5'-GCSGAGWSSCACGTSGACCG-3'
46DH-C (reverse)	5'-ACCAGGTGCGGTTGGAGCGGTACC-3'
46DHC1 (reverse)	5'-CTGGTRSGGSCCGTAGTTGTT-3'
46DH2C (reverse)	5'-GRWRCTGRTRSGGCCGTAGTTGTT-3'
46DH3C (reverse)	5'-CGBACGTTSDBSGCCGTCSCCGTA-3'

primer	@ 0.2 μ L
genome DNA template	1 μ L
DMSO	0.5 μ L
dNTP Mix	1.6 μ L
LA Taq	0.1 μ L
2 $\times$ GC buffer	5 μ L
sterilized water	1.4 μ L
total	10 μ L

Entry	sense primer	anti sense primer	Entry	sense primer	anti sense primer
1	23DH1	23DH3C	8	46DHN1	46DH2C
2	23DH2	23DH3C	9	46DHN1	46DH3C
3	23DH1		10	46DHN1	
4	23DH2		11		46DHC1
5		23DH3C	12		46DH-C
6	46DHN1	46DHC1	13		46DH2C
7	46DHN1	46DH-C	14		46DH3C



agarose gel electrophoresis

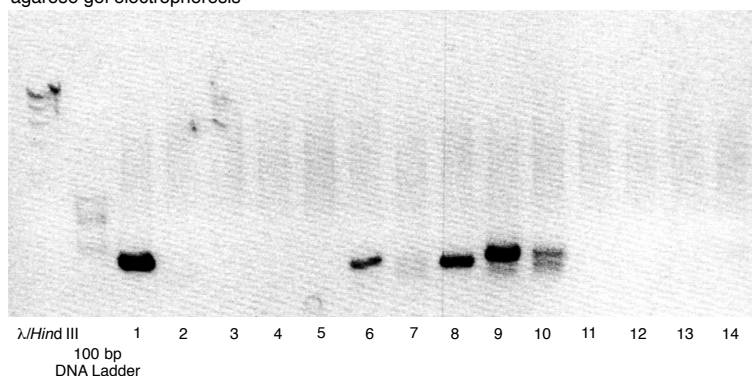


Fig. 26 縮重プライマーを用いた PCR

合わせて各プライマーを用いた場合に遺伝子の特異的増幅を観測することが出来た (Fig. 26, Entry 1, 6, 8, 9)。そこでこれらの断片を pT7-blue を用いて TA クローニングし、サンガー法にて塩基配列を解読した。その結果、何れの遺伝子断片も目的の NDP 糖 2,3-デヒドラターゼ、もしくは 4,6-デヒドラターゼ遺伝子と相同性を示したことことから、これらをジゴキシゲニン (DIG) 標識化し、サザンハイブリダイゼーションのプローブとした。クレミマイシン生産菌染色体ゲノム DNA をいくつかの制限酵素で完全消化し、これらのプローブを用いてゲノムサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、DIG 標識化した NDP 糖 2,3-デヒドラターゼ遺伝子断片を用いた場合に

は制限酵素 *Bgl* II, *Pst* I で処理した染色体ゲノム DNA の約 6.5 kbp のバンドに特異的発色を確認することが出来た。一方 DIG 標識した NDP 糖 4,6-デヒドラターゼ遺伝子断片を用いた場合には制限酵素 *Xho* I で処理したゲノム DNA の約 4.5 kbp のバンドに特異的発色を検出することが出来た (Fig. 27)。

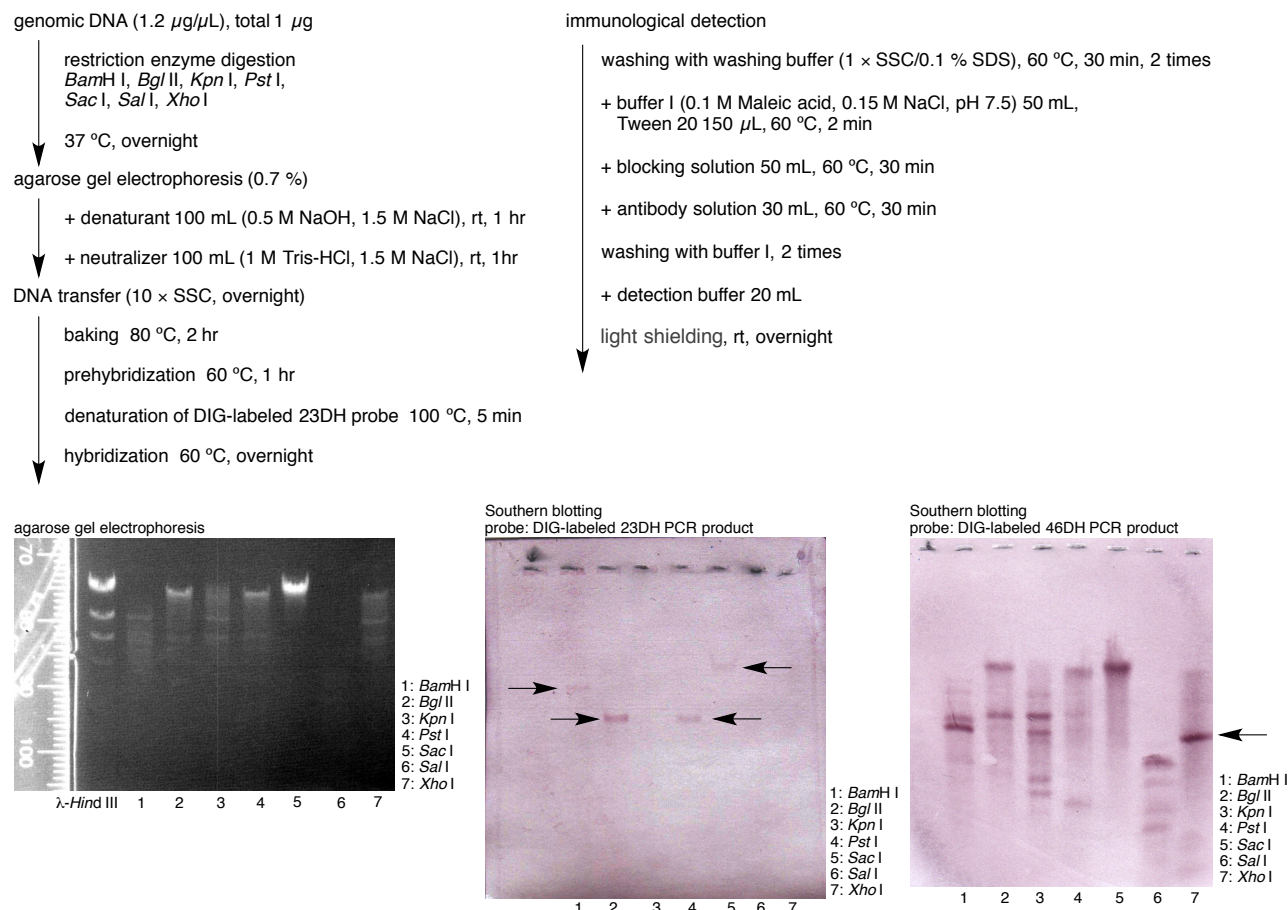


Fig. 27 ゲノムサザンハイブリダイゼーション

3.2.2 コスミドライブラリーの構築・スクリーニング

NDP 糖デヒドラターゼ遺伝子を含む 30-50 kb 程度の遺伝子を獲得するため、コスミドライブラリーを構築・サザンハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。

クレミマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 の染色体ゲノム DNA を制限酵素 *Sau*3 AI にてランダムに部分消化して 30-50kb 程度の遺伝子断片とし、これを当研究室にてスクリーニング実績のあるコスミドベクター pOJ446 にクローニングした。得られたコスミド遺伝子は λ ファージウィルスに定法にてパッケージングし、大腸菌 *E. coli* XL1-Blue MRF' に感染させた。得られた約 1,800 個のコロニーはコスミド遺伝子を保持させるため 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ジェネティシンを含んだ LB 寒天培地 2 枚に継代し、またコロニー 100 個毎にコスミドプールを作製した。

ライブラリー化したコロニーの中に NDP 糖 2,3-デヒドラターゼもしくは 4,6-デヒドラターゼ

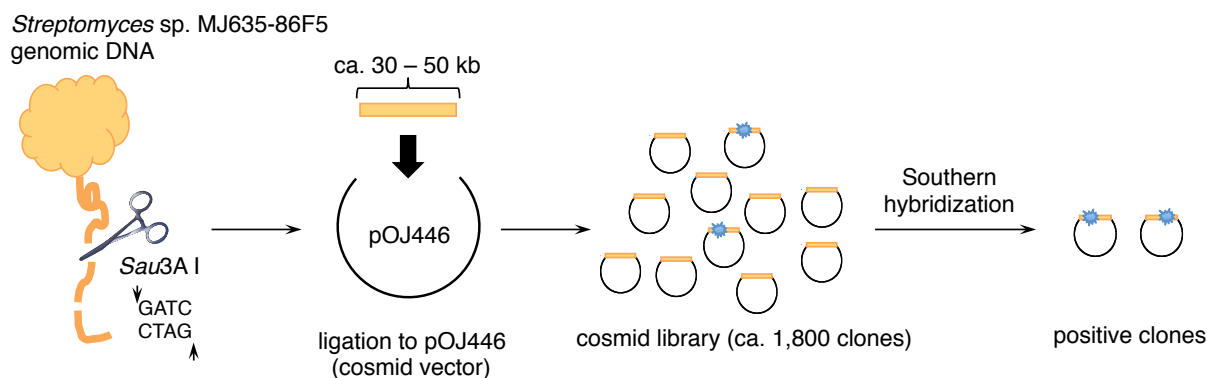


Fig. 28 クレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 染色体ゲノム DNA コスミドライブラリー構築および目的コスミド遺伝子取得までの概要図

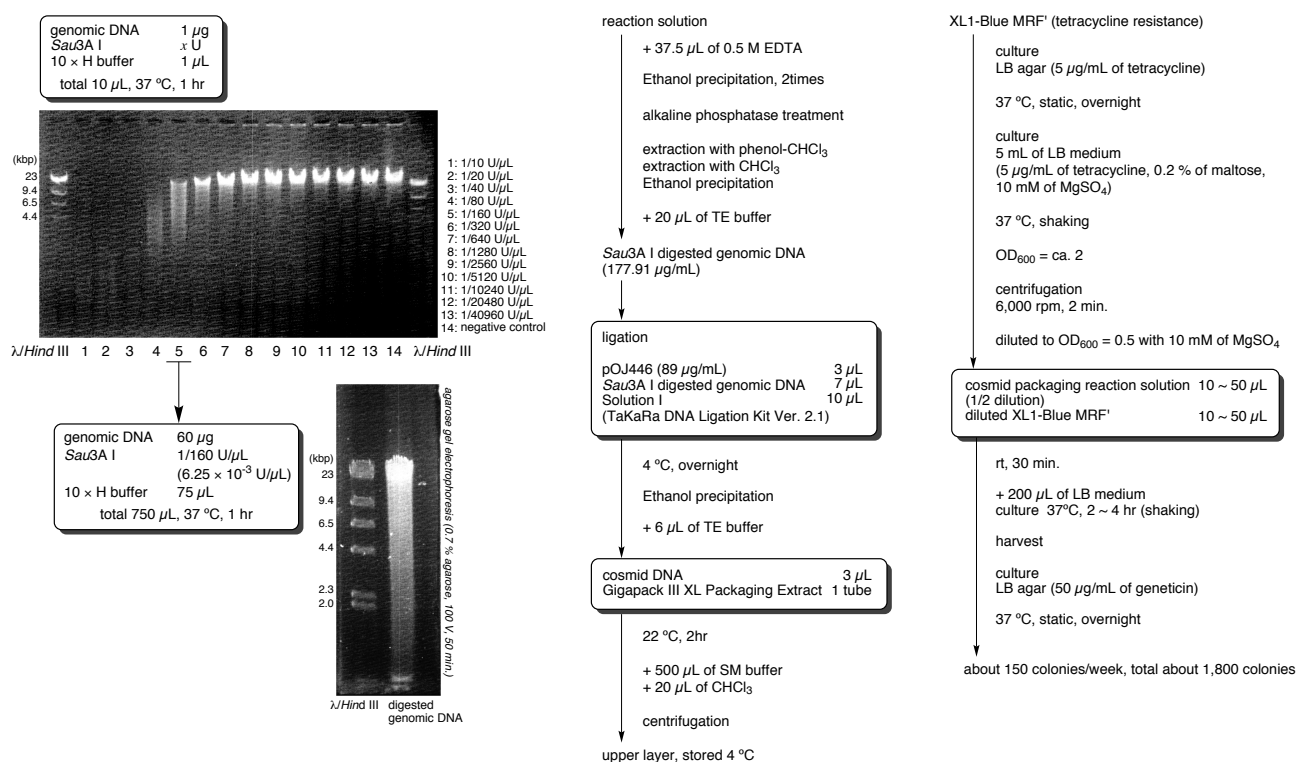


Fig. 29 クレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 染色体ゲノム DNA コスミドライブラリーの構築

遺伝子を含むコスミド遺伝子を有するものがあるかを探索するため、コロニーサザンハイブリダイゼーションを行った。これはコスミド遺伝子を含む大腸菌ごとアルカリ処理をして変性させ、内部に存在するコスミド遺伝子を用いてサザンハイブリダイゼーションを行うというものである (Fig. 30)。その結果、約 1,800 個のコロニーのうち 8 個のコロニーに着色が見られた (Fig. 31)。これらを別に保存していたプレートから各々液体培養し、コスミド遺伝子を単離した。これらを用いてさらにサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、2つのコスミド遺伝子で明確な着色が見られたことから、これらを以降詳細に解析することにした (Fig. 32, Cosmid73, Cosmid106)。

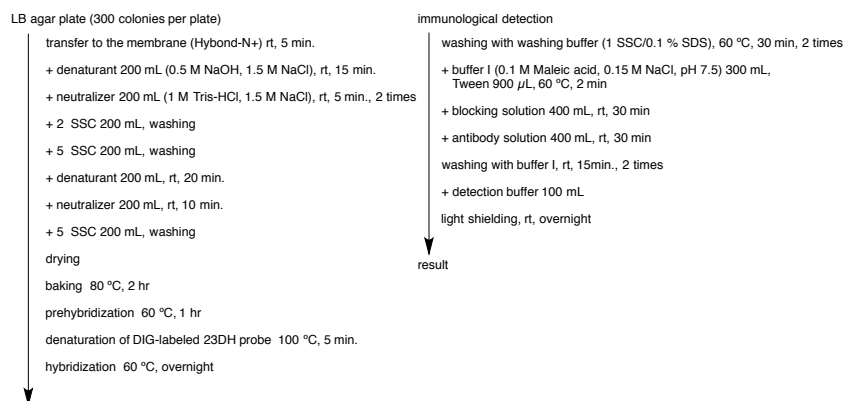


Fig. 30 コロニーハイブリダイゼーション

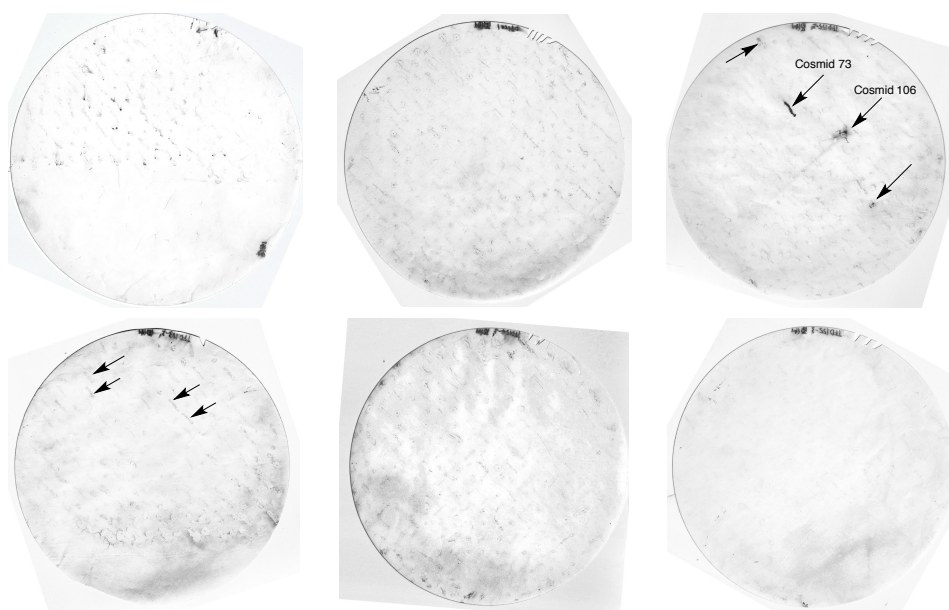


Fig. 31 コロニーハイブリダイゼーションの結果 (着色したコロニーを矢印で示してある)

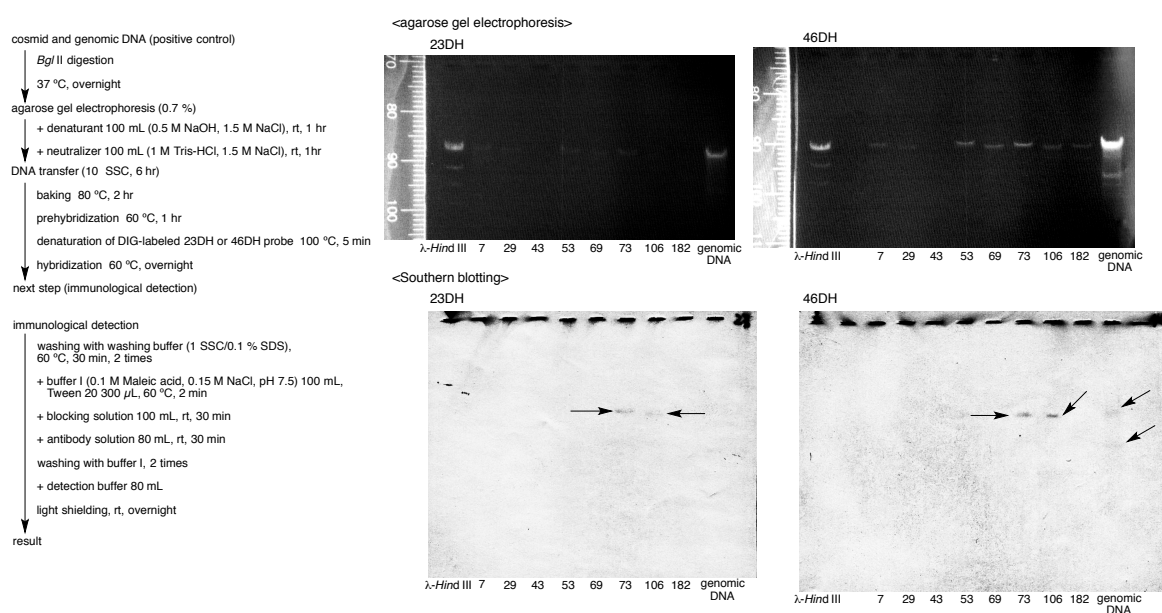


Fig. 32 ポジティブだったコスミド遺伝子を用いて行ったサザンハイブリダイゼーション

3.2.3 ポジティブクローンの解析

コスミド遺伝子は染色体ゲノム DNA の約 30-50 kb の領域を含むものであり、DNA シーケンサで一度に解読出来る塩基配列は最大でも約 1,000 bp である。したがって、コスミド遺伝子の配列を解読するには適当な制限酵素で消化、さらに小さな遺伝子断片としてクローニングして解読した。簡単にこれを示すと Fig. 33 のようになる。全ての配列を詳細に解析する際にはショットガンシーケンス法を適用することを予定していたことから、Cosmid73 および 106 の両端に存在する塩基配列を中心に塩基配列の解析を行った。その結果、Cosmid73 と 106 は NDP 糖 2,3-デヒドラターゼおよび 4,6-デヒドラターゼ遺伝子を含む領域を約 9.3 kb 共有しており、Cosmid106 は共有している領域の上流側、Cosmid73 は下流側の領域を含むコスミド遺伝子であることがわかった。一方反対側の領域はいずれも I 型 PKS をコードしており、ポリケチド生合成遺伝子クラスターの途中までしか取得出来ていないことを示す結果を得た (Fig. 34)。そこでコスミド遺伝子末端の領域を再び DIG 標識化してサザンハイブリダイゼーションのプロープとし、これらの外側の領域を含むコスミド遺伝子を探索することにした。

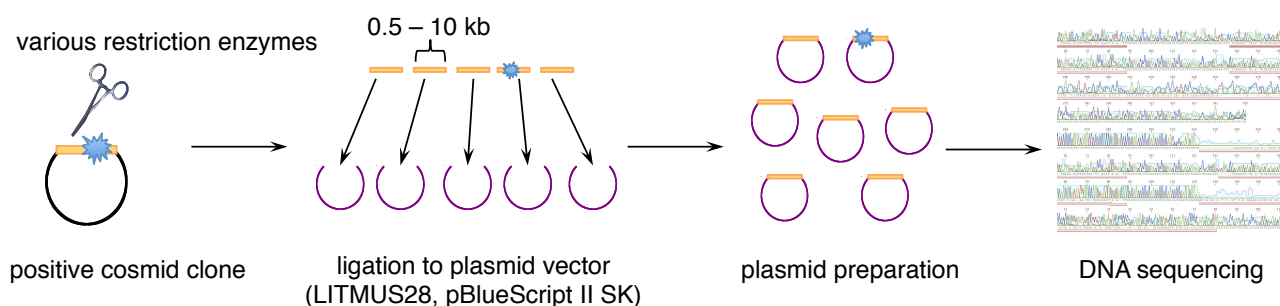


Fig. 33 コスミド遺伝子の塩基配列解読の概要

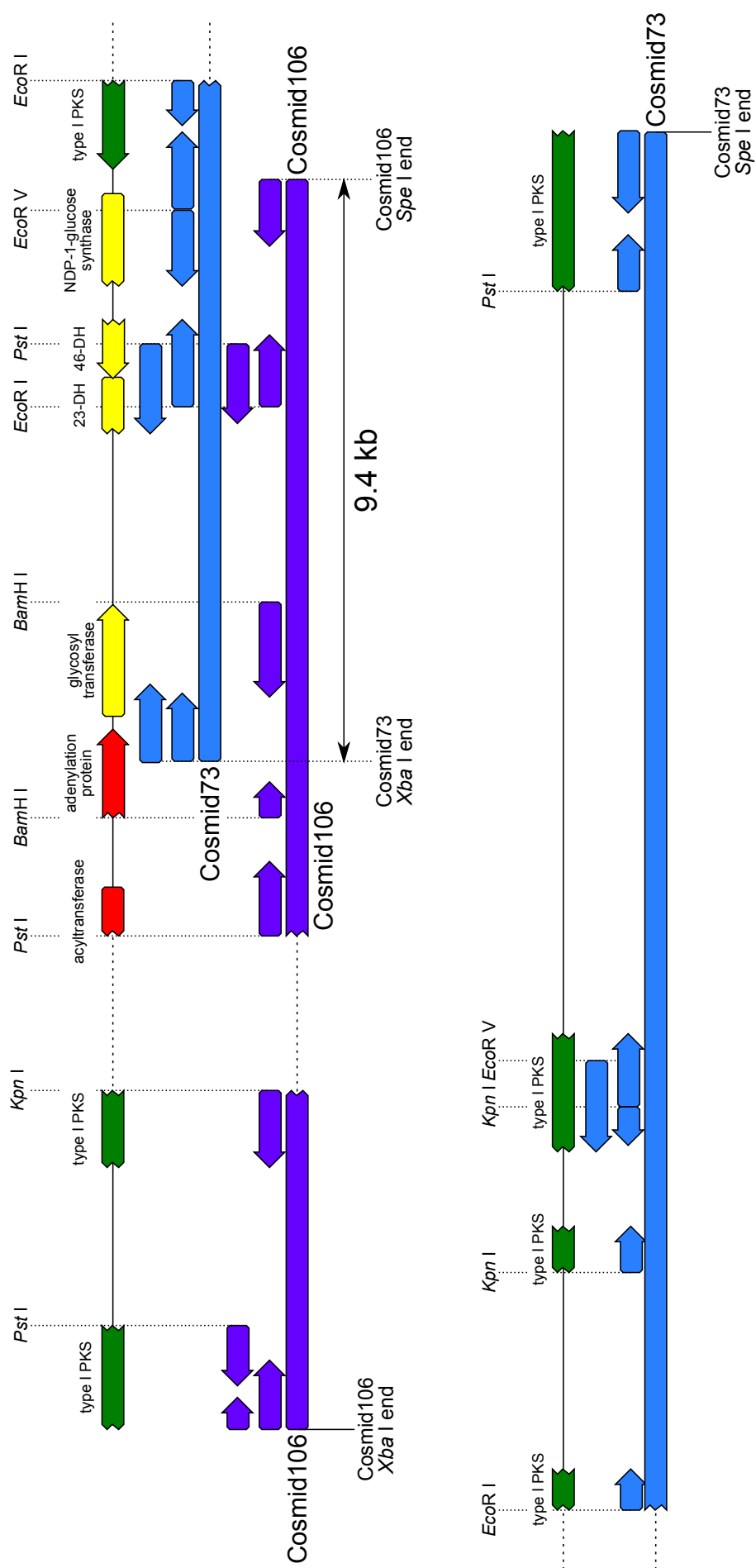


Fig. 34 Cosmid73, Cosmid106 の両端の解析が終了した時点での遺伝子マップ 紫の矢印は Cosmid106 から部分消化して解読した DNA 断片、青の矢印は Cosmid73 から部分消化して解読した DNA 断片を示す。解読出来た部分配列は、blastx により相同性検索を行っている。

3.2.4 Cosmid73, 106 の外側の領域を含むコスミド遺伝子の探索

3.2.2 と同様の手法で Cosmid73, 106 の外側の領域を含んだコスミド遺伝子の探索を行ったところ、3 つのポジティブなコスミド遺伝子の獲得に成功することが出来た (Cosmid25, 59, 200)。これらも Cosmid73, 106 と同様にコスミド遺伝子の端の領域を中心に解析を行ったところ、Cosmid200 は Cosmid25 の内側に存在する領域であると考えられたため、以降の解析には使用しないこととした。一方 Cosmid25 の端にはペニシリンアシラーゼ等、ポリケチドの生合成には関与する可能性の低い遺伝子がコードされていたため、遺伝子クラスターを包括していると判断した。逆に Cosmid59 は Cosmid106 とわずかに約 700 bp ながら重なった領域が存在し、さらに Cosmid73 よりも外側の遺伝子をコードしていた。以上の解析結果をもとに、Cosmid25, 59, 106 の 3 つをショットガンシーケンス法にて解析した。

3.2.5 遺伝子ギャップ領域の解読、ドラフトゲノムショットガンシーケンス

ショットガンシーケンス法とはコスミド遺伝子をランダムに小さく断片化、クローニングし、得られたプラスミドを網羅的に解読、得られた塩基配列をアセンブラによって大きな遺伝子配列 (コンティグ) とする方法である。しかし放線菌の染色体ゲノム DNA は一般的に GC 含有率が高く、PKS をコードする領域は繰り返し配列が多いことから、アセンブリしてもいくつかのコンティグ配列に分かれてしまい、その間にはギャップ領域が存在している。今回のショットガンシーケンスでも Cosmid25, Cosmid106 の配列にはいくつかギャップ領域が存在しており、最終的にこの領域を再びクローニングして解読する必要があった。しかし、通常のサンガー法では解読出来ず、いくつかは転写シーケンス法である CUGA [47] によって解読した。これは遺伝子の状態では二次構造等が原因でステムが生じ、シーケンサに用いるサンプルを作る際の PCR 反応がうまく進行しなかったのが原因といえる。また、Cosmid59 の最下流側にはポリケチド生合成遺伝子の発現を調節すると考えられるレギュレータ遺伝子が存在していたが、これは他の相同性の高いレギュレータ遺伝子の半分のサイズしか無いことが分かった。そこでインバース PCR 法 [48] を用いて Cosmid59 の下流側の遺伝子を取得しようと試みたが、検討した全ての条件でそれを成し得ることは出来なかった。更に先と同様の手法でコスミド遺伝子の探索を行ってみたが、サザンハイブリダイゼーションで有意な発色を示したコスミド遺伝子を得ることが出来なかった。最終的にクレミマイシン生産菌染色体ゲノム DNA のドラフトシーケンスを行うことでこの領域を取得するに至った。

3.3 クレミマイシン生合成遺伝子クラスターの解析

ところで Cosmid25 に存在していたペニシリンアシラーゼを含む領域は、Cosmid106 との重ね合わせをする上で不可解な点があった。すなわち、P450 酵素をコードする遺伝子上に存在する *Sau*3A I サイトにおいて、他のクレミマイシン生産菌染色体ゲノム DNA の断片が結合していると考えられた。そこで P450 遺伝子を増幅するためのプライマーを設計し、Cosmid25, Cosmid106, 染色体ゲノム DNA を鋳型として PCR を行ったところ、Cosmid106 と染色体ゲノム DNA を鋳型とした場合には同サイズの P450 遺伝子が正しく増幅されてきたことから (Fig. 35, Table 4)、Cosmid25 が別の遺伝子断片を取り込んだと判断し、この部分を生合成遺伝子クラスターから除外した。また染色体ゲノム DNA ドラフトシーケンスによって得られたデータからも、ペニシリンアシラーゼを含む領域がクレミマイシン生産菌ゲノム DNA の別の領域に存在していることを確認している。

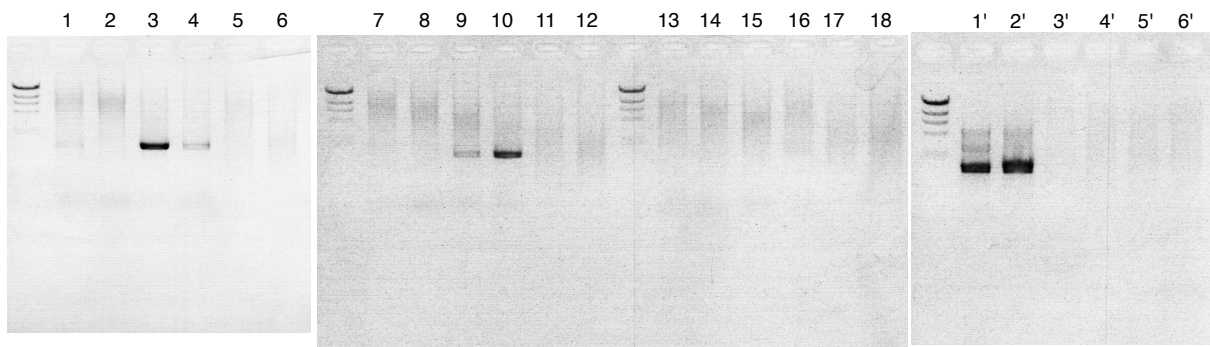


Fig. 35 Cosmid25, 106, 染色体ゲノム DNA を鋳型として P450 遺伝子の増幅を検討した時の PCR 産物の電気泳動図: Entry 3, 4, 9, 10 は Cosmid106 を鋳型とした場合に増幅してきた P450 遺伝子、Entry 1', 2' はクレミマイシン生産菌ゲノム DNA を鋳型とした場合に増幅してきた P450 遺伝子。

Table 4 Cosmid25, 106, 染色体ゲノム DNA を鋳型として P450 遺伝子の増幅を検討した時の PCR 条件

Entry	temperature	template	template conc.	Entry	temperature	template	template conc.
1	98 °C → 55 °C → 68 °C	Cosmid 25	1/10	13	98 °C → 68 °C	Cosmid 25	1/10
2	98 °C → 55 °C → 68 °C	Cosmid 25	2/10	14	98 °C → 68 °C	Cosmid 25	2/10
3	98 °C → 55 °C → 68 °C	Cosmid 106	1/10	15	98 °C → 68 °C	Cosmid 106	2/10
4	98 °C → 55 °C → 68 °C	Cosmid 106	2/10	16	98 °C → 68 °C	Cosmid 106	1/10
5	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	1/10	17	98 °C → 68 °C	genomic DNA	1/10
6	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	2/10	18	98 °C → 68 °C	genomic DNA	2/10
7	98 °C → 60 °C → 68 °C	Cosmid 25	1/10	1'	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	1/200
8	98 °C → 60 °C → 68 °C	Cosmid 25	2/10	2'	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	1/100
9	98 °C → 60 °C → 68 °C	Cosmid 106	2/10	3'	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	2/100
10	98 °C → 60 °C → 68 °C	Cosmid 106	1/10	4'	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	3/100
11	98 °C → 60 °C → 68 °C	genomic DNA	1/10	5'	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	4/100
12	98 °C → 60 °C → 68 °C	genomic DNA	2/20	6'	98 °C → 55 °C → 68 °C	genomic DNA	5/100

以上、コスミドショットガンシーケンスならびにギャップ領域の補完、ドラフトゲノムショットガンシーケンスにより得られた遺伝子クラスターは、まず国立遺伝学研究所が公開・管理している遺伝子自動アノテーションツール **MiGAP (Microbial Genome Annotation Pipeline)** [49] に入力し、大まかなアノテーションを行った。その後、得られた結果を基に **FramePlot 4.0beta** (<http://nocardia.nih.go.jp/fp4/>) を用いて細かな部分を修正し、約 95 kb のポリケチド生合成遺伝子クラスター (*cmi* クラスター) を得た (Fig. 36)。

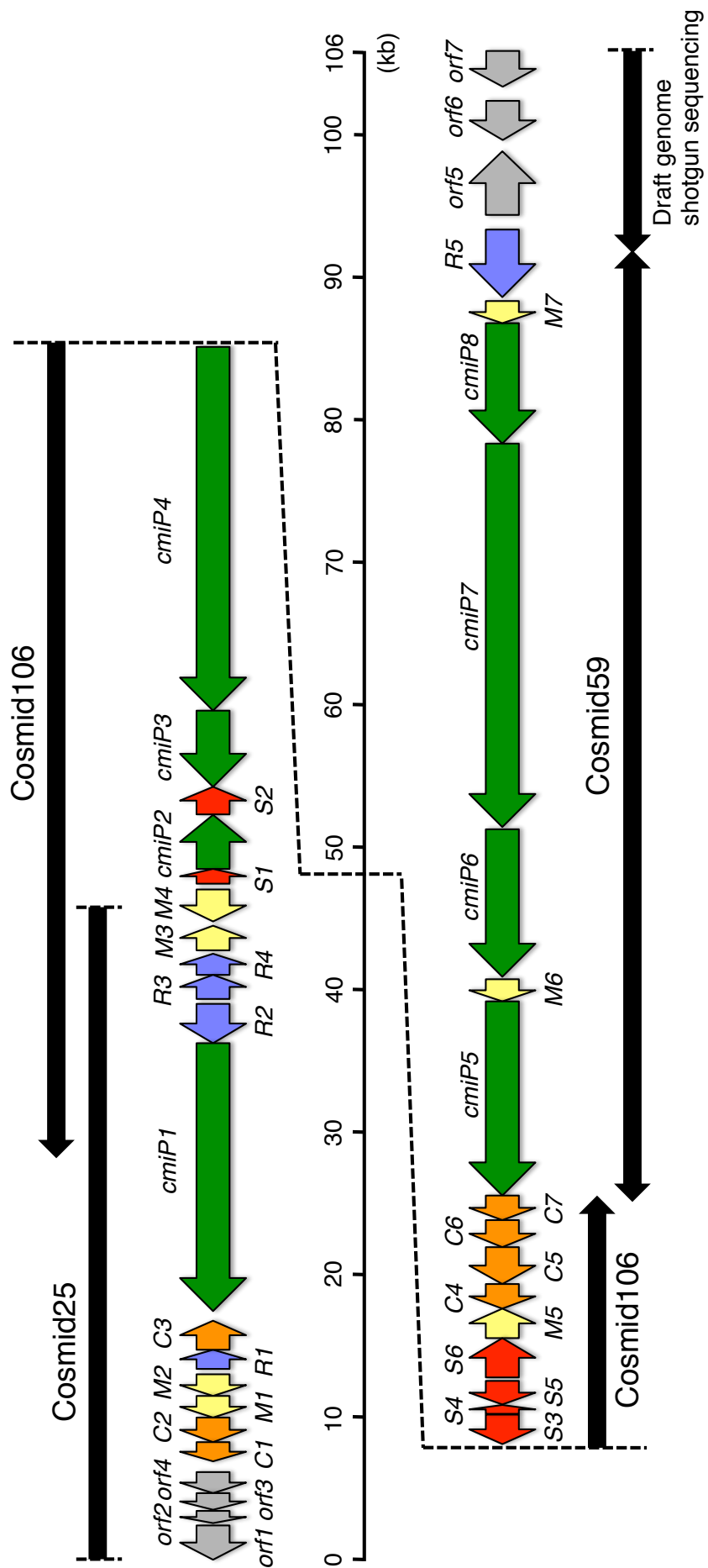


Fig. 36 クレマイシン合成遺伝子クラスター (*cmi* クラスター)

Gene Designation	size [bases]	Encoded Protein Homologues (GenBank Accession Numbers), % Positives/% Identity	putative function	Homologues from <i>vin</i> and <i>bec</i> , <i>mia</i> clusters
<i>orf1</i>	1,041	LipMT (ABB05099), 57/41	SAM-dependent methyltransferase	
<i>orf2</i>	492	COG1733 (ZP_06407553), 40/21	MarR-family transcriptional regulator	
<i>orf3</i>	675	SACTE.0865 (YP_004801334), 69/57	4'-phosphopantetheinyl transferase	
<i>orf4</i>	855	SCAB_84081 (YP_003493881), 80/72	hypothetical protein	
<i>cmiC1</i>	771	LkmO (NP_851467), 93/87	NDP-hexose 3-O-methyltransferase	
<i>cmiC2</i>	1,044	GerK1 (GERK1_STRSQ), 66/46	dTDP-2,6-dideoxyhexose 4-ketoreductase	
<i>cmiM1</i>	879	Sros_3312 (YP_003338994), 72/63	retinol dehydrogenase	
<i>cmiM2</i>	867	HELO_1602 (YP_003896671), 30/19	hydroxypyruvate isomerase	
<i>cmiR1</i>	771	Strvi_3933 (YP_004813873), 71/58	type II TE	BecQ, MiaQ
<i>cmiC3</i>	591	PokS7 (ACN64855), 77/66	dTDP-4-keto-6-deoxyglucose 3,5-epimerase	
<i>cmiP1</i>	10,761	Strvi_7995 (YP_004817598), 70/59	type I PKS	
<i>cmiR2</i>	756	SSOG_04032 (ZP_07295948), 71/58	TetR-type transcriptional regulator	
<i>cmiR3</i>	981	SRIM_15495 (ZP_20965425), 73/61	ABC transporter	
<i>cmiR4</i>	846	SM8_00466 (ZP_16176899), 67/52	ABC transporter	
<i>cmiM3</i>	867	WSS_A31970 (ZP_14482754), 72/56	carveol-dehydrogenase	
<i>cmiM4</i>	1,239	MlaO (ACO94495), 69/46	P450 monooxygenase	BecO, MiaO
<i>cmiS1</i>	576	MlaU (ACO94487), 79/62	fatty-acyl CoA thioesterase	BecU, MiaU
<i>cmiP2</i>	2,175	BecC (ACO94458), 64/51	type I polyketide synthase	BecC
<i>cmiS2</i>	1,128	ThiO (YP_003300613), 58/69	glycine oxidase/FAD-dependent oxidoreductase	BecI, MiaI
<i>cmiP3</i>	3,135	SSOG_05754 (ZP_07297671), 73/60	type I PKS	
<i>cmiP4</i>	15,693	FscE (AAQ82567), 63/52	type I PKS	
<i>cmiS3</i>	1,551	SSOG_07863 (ZP_07299780), 70/61	NRPS adenylation domain	BecL, MiaL, VinM
<i>cmiS4</i>	237	SHJG_1914 (YP_006243062), 68/55	peptidyl carrier protein	BecS, MiaS, VinL
<i>cmiS5</i>	954	BecK (ACO94462), 73/57	acyltransferase	BecK, MiaK, VinK
<i>cmiS6</i>	1,584	BecJ (ACO94461), 73/61	AMP-dependent acyl-CoA synthase/ligase	BecJ, MiaJ, VinN
<i>cmiM5</i>	1,242	AveBI (NP_822120), 58/44	glycosyltransferase	
<i>cmiC4</i>	999	SaqT (ACP19378), 79/69	sugar 3-ketoreductase	
<i>cmiC5</i>	1,539	ApoH1 (AEP40911), 70/61	NDP-hexose 2,3-dehydratase	
<i>cmiC6</i>	999	Aur1T (ACK77743), 84/74	NDP-glucose 4,6-dehydratase	
<i>cmiC7</i>	1,065	SaqG (ACP19371), 77/67	NDP-1-glucose synthase	
<i>cmiP5</i>	7,962	PimS2 (CAC20921), 67/57	type I PKS	
<i>cmiM6</i>	894	BecP (ACO94469), 80/71	putative proline iminopeptidase	BecP, MiaP, VinJ
<i>cmiP6</i>	6,012	SSOG_07859 (ZP_07299776), 68/58	type I PKS	BecG, MiaG
<i>cmiP7</i>	15,603	Amir_2684 (YP_003100465), 68/57	type I PKS	
<i>cmiP8</i>	4,878	Amir_2682 (YP_003100463), 67/55	type I PKS	BecF, MiaF
<i>cmiM7</i>	870	BRAO285_1380083 (ZP_09472857), 30/20	hydroxypyruvate isomerase	
<i>cmiR5</i>	2,757	MlaH (ACO94482), 52/38	LuxR-type transcriptional regulator	BecH, MiaH
<i>orf5</i>	2,688	SSOG_07879 (ZP_07299796), 53/40	LuxR-type transcriptional regulator	BecH, MiaH
<i>orf6</i>	1,596	SSOG_03682 (ZP_07295599), 72/59	cyclohexanecarboxylate-CoA ligase	
<i>orf7</i>	1,461	SVEN_0617 (YP_006876163), 92/84	cytosine/purine/uracil /thiamine/allantoin permease	

3.3.1 遺伝子産物の相同性解析

クレマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 から得られたポリケチド生合成遺伝子クラスター、*cmi* クラスターは、放線菌染色体ゲノム DNA に特徴的な比較的高い G + C 含有率を示し (72 %), Cosmid25, 106, 59 はそれぞれ *cmi* クラスターを含む 34, 44, 39 kb の領域を保持していた。この遺伝子クラスターの構成は、ジデオキシ糖の生合成に関わると考えられる酵素遺伝子を除くと BE-14106 や ML-449 等の生合成遺伝子クラスター (*bla*, *mia* クラスター) と類似しており、同様のポリケチド骨格を生合成するものと考えられる。遺伝子にはそれぞれ番号と、その前にポリケチド骨格を生合成する PKS 遺伝子には “P” を (Polyketide)、開始基質生合成に関わると考えられる酵素遺伝子には “S” を (Starter)、シマロース生合成に関わると考えられる酵素遺

伝子には“C”を (Cymarose)、PKS 伸長反応後の修飾反応に関わると考えられる酵素遺伝子には“M”を (Modification)、遺伝子発現や生成物の輸送等、調節に関わると考えられる酵素遺伝子には“R”を (Regulation) それぞれ付けた。このようにして命名した *cmi* クラスターは、国立遺伝学研究所日本 DNA データバンクに登録した (アクセッション番号 AB818354)。以下これらの遺伝子産物の相同性について示す。この解析にあたっては BLASTp にて相同性の高いアミノ酸配列を検索、また、相同性が高く、且つ酵素レベルでの機能説明が行われているタンパクの検索には DoBISCUIT (<http://www.bio.nite.go.jp/pks/top>) [50] を使用した。

3.3.2 シマロース生合成酵素群の相同性解析

cmiC1

cmiS1 は 6-デオキシ-L-ヘキソース-3-O-メチル基転移酵素と相同性を持つタンパクをコードしている遺伝子である。最も相同性が高かったのは *Streptomyces rochei* 由来ランカマイシン (lankamycin) 生合成に関わるとされる LkmO である (87 %, Fig. 37) [51]。

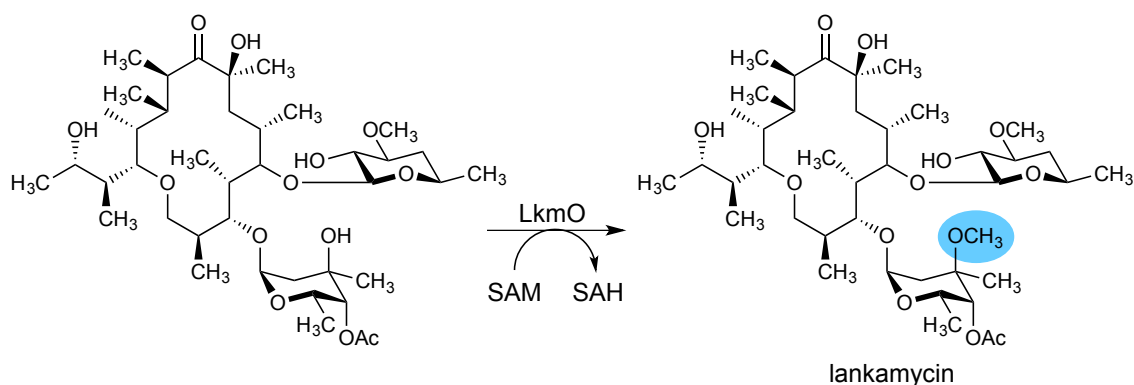


Fig. 37 LkmO の予想触媒機構

すなわちこの遺伝子産物はシマロース生合成において、*S*-アデノシル-L-メチオニンを用いてジギトキソースの 3 位水酸基メチル化を触媒すると考えられる (Fig. 38)。

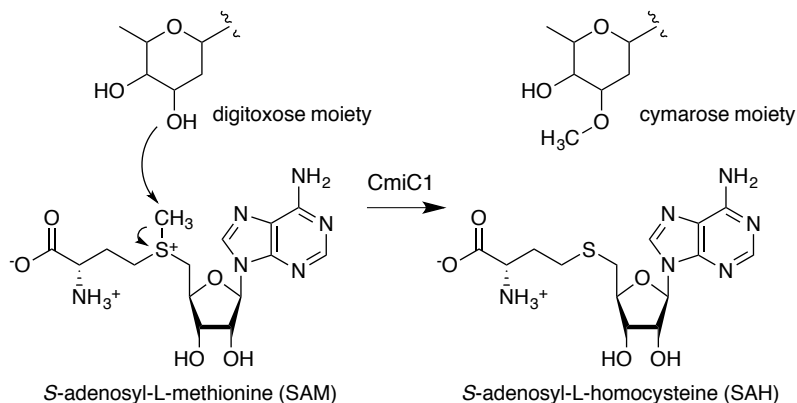


Fig. 38 CmiC1 によるジギトキソース部位の予想 *O*-メチル化機構

cmiC2

翻訳産物 CmiC2 は dTDP-4-ケトグルコース還元酵素と類似したアミノ酸配列を有しており、シマロース生合成の際に生じる 4 位のカルボニル基を還元する酵素だと考えられる。最も高い相同性を示したのは *Streptomyces* sp. KCTC0041BP で生産されるジヒドロカルコマイシン (dihydrochalomycin) 生合成における dTDP-4-ケト 6-デオキシグルコース還元酵素 GerK1 であった (46 %, Fig. 39) [52]。

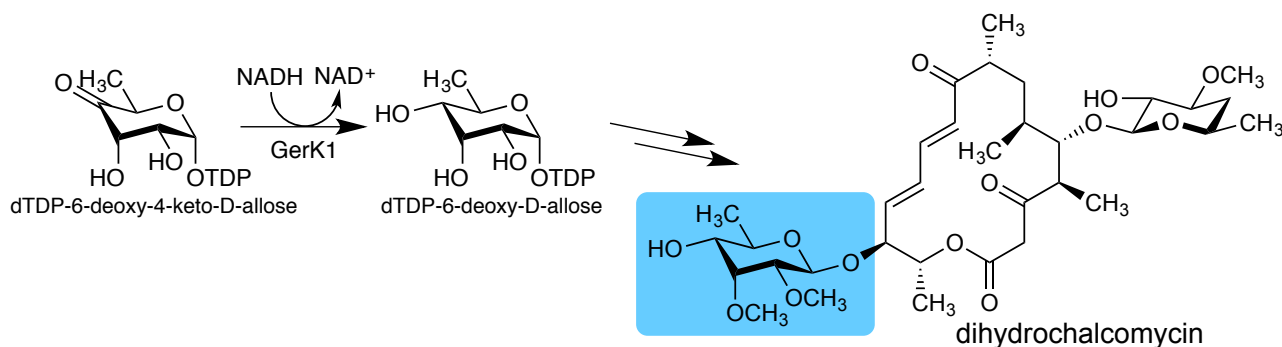


Fig. 39 提唱されている GerK1 の触媒機構

cmiC3

この遺伝子の翻訳産物は 4-ケトグルコース 3,5-エピメラーゼと高い相同性を示した。最も相同性の高かった酵素は *Streptomyces diastatochromogenes* Tü6028 由来のポリケトマイシン (polyketomycin) 生合成に関わる PokS7 で (66 %)、D-グルコース-1-リン酸から NDP-L-アクセノースを生合成する際に D 糖から L 糖への変換を触媒する酵素だと考えられている (Fig. 40) [53]。

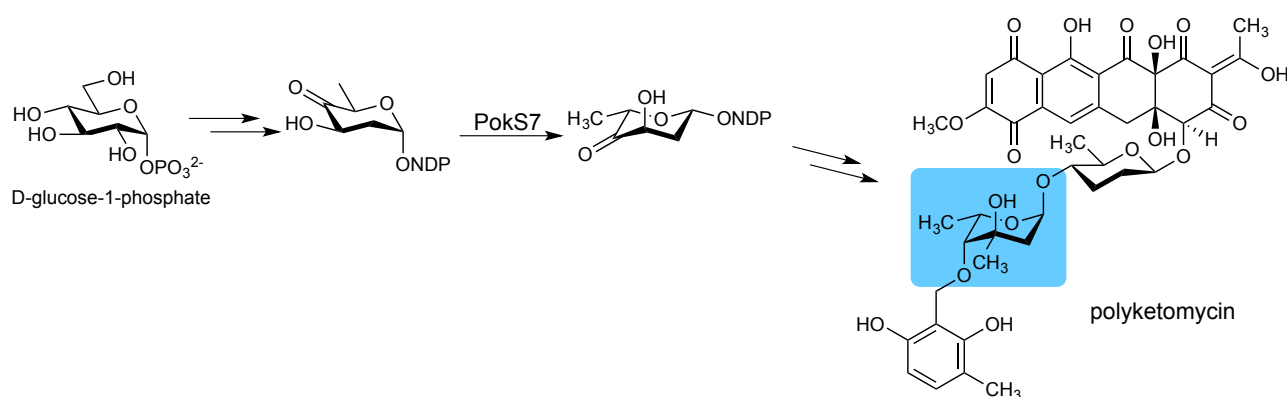


Fig. 40 提唱されている PokS7 の触媒機構

他にも一次代謝系でラムノース生合成時に用いられる *Pseudomonas aeruginosa* 由来 dTDP-4-デヒドロラムノース 3,5-エピメラーゼ RmlC とも相同性を示している。この酵素については結晶構造が既に解かれており、Tyr134, Lys74, His65–Asp171 が活性発現に必須であることが知られている (Fig. 41) [46]。これらの残基は CmiC3 においても保存されているため、CmiC3 は活性型の酵素であると判断した。

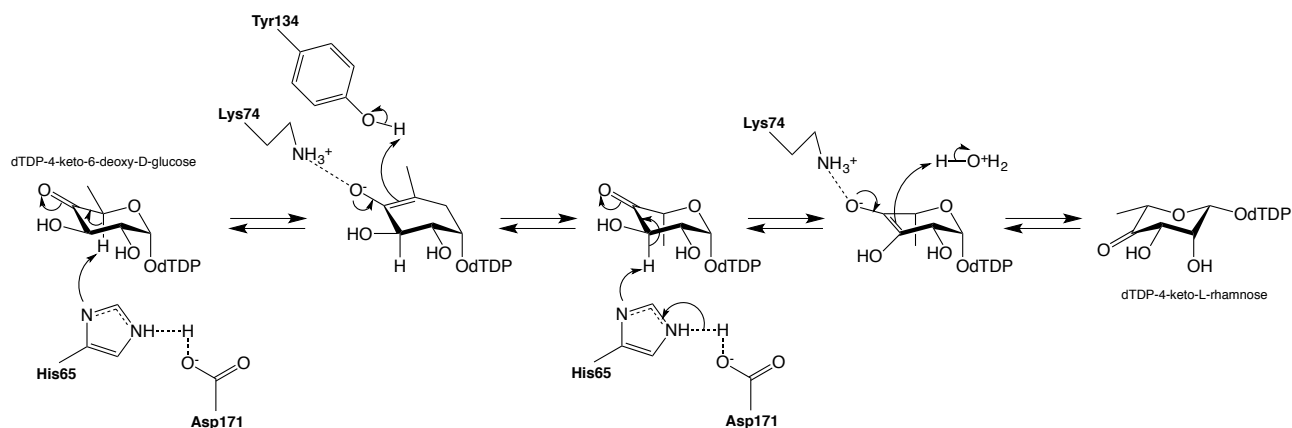


Fig. 41 X線結晶構造解析により提唱された 3,5-エピメラーゼ RmlC の触媒機構

cmiC4

cmiC4 翻訳産物は NDP-2,6-ジデオキシ-3,4-ジケトグルコース還元酵素と類似しており、最もアミノ酸配列相同性が高かったのはサクアヤマイシン (saquayamycin) 生合成における SaqT である (69%) [54]。すなわちこの酵素は 2,6 位が脱水された後に生じるジケトグルコースの 3 位の還元を触媒すると考えられる。

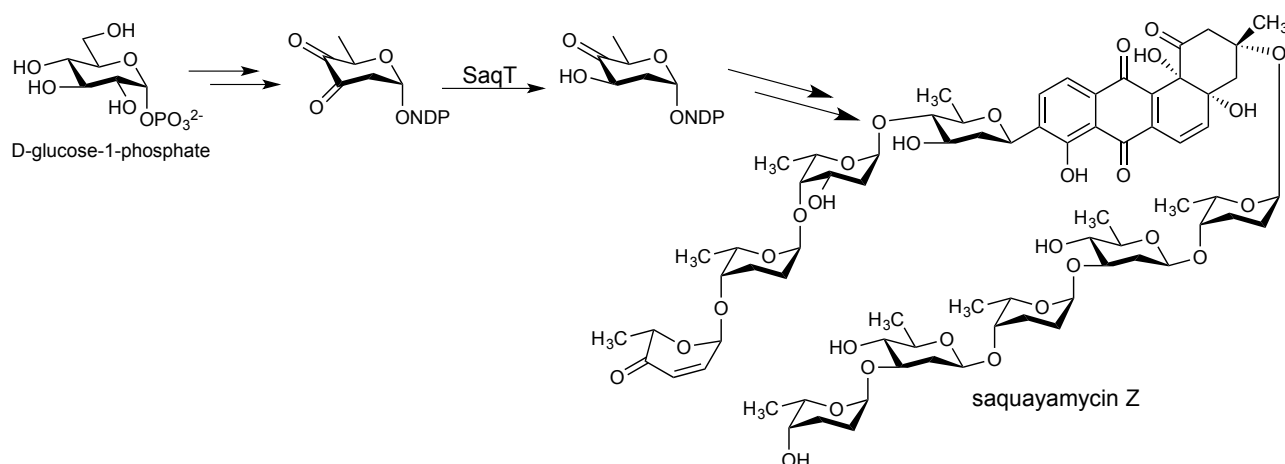


Fig. 42 提唱されている SaqT の触媒機構

cmiC5

cmiC5 翻訳産物と最も相同性の高かったタンパクはアポトリジン (apoptolidins) 類生合成における NDP-6-デオキシ-4-ケトグルコース 2,3-デヒドラターゼである ApoH1 である (61 %, Fig. 43) [55]。すなわち ApoH1 同様、6 位の脱水が行われた糖の 2 位水酸基をさらに脱水する機能を有していると考えられる。

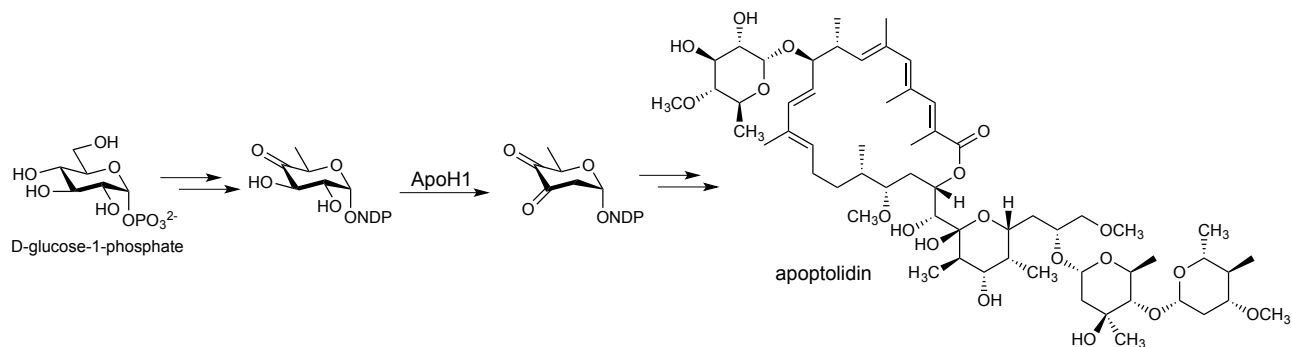


Fig. 43 提唱されている ApoH1 の触媒機構

cmiC6

cmiC6 翻訳産物は NDP-グルコース 4,6-デヒドラターゼとアミノ酸配列が類似しており、*Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 由来のオーリシン (auricin) 生合成における NDP-グルコース-4,6-デヒドラターゼ Aur1T と最も高い相同性を示した (74 %) [56]。すなわち、CmiC6 はシマロース生合成の初期段階、6 位のデオキシ化を触媒する酵素であると考えられる。

cmiC7

cmiC7 は NDP-1-グルコース合成酵素と相同性のあるタンパクをコードしており、サクアヤマイン生合成における SaqG と最も高い相同性を示した (67 %)。また機能解析がなされている酵素の中では Sch47555 生合成における SchS6 と最も高い相同性を示した [57]。よって、CmiC7 はシマロース生合成の初期段階、グルコース-1-リン酸にヌクレオチドを付加する機能を有していると考えられる。

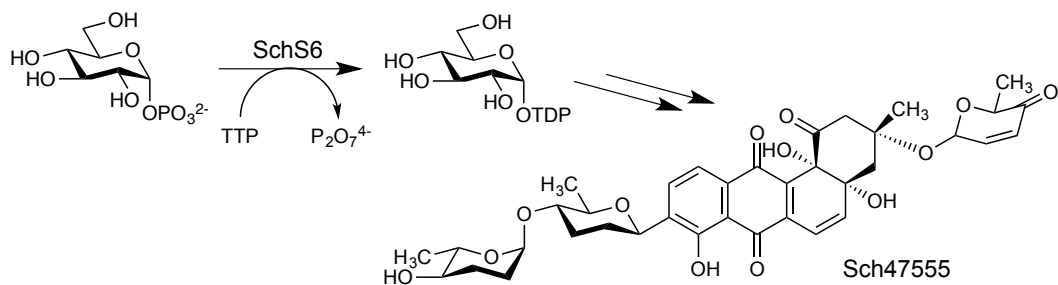


Fig. 44 Han らにより解明された SchS6 の触媒機構

3.3.3 開始基質生合成酵素群の相同性解析

cmiS2

cmiS2 は FAD 依存型グリシンオキシダーゼと相同性を示すタンパクをコードしていた。グリシンオキシダーゼは通常、一次代謝経路においてチアミンの生合成初期段階に関わっており (ThiO)、現在までに様々な生物種由来の ThiO の機能解析が行われているが、二次代謝経路においてこの酵素遺伝子が存在したという報告は BE-14106 及び ML-449 の *bec* 及び *mli* クラスターの BecI, MliI 以外には存在しない [24,25]。これら 2 つのクラスターを報告した Jørgensen らは、これらの酵素が開始基質生合成においてアミノ基転移反応を触媒すると提唱していたため、この時点では *cmiS2* もアミノ基転移に関わるものと考えた。

cmiS3

cmiS3 翻訳産物は NRPS に含まれているアデニル化ドメインと相同性を示しており、またピセニスタチン生合成において 3-アミノ-2-メチルプロピオニル-VinL にアラニンを結合させる VinM とも相同性があつた (56 %)。すなわち CmiS3 はクレマイシン開始基質である 3-アミノノナン酸のアミノ基に何かしらのアミノ酸を保護基として結合させる機能を有すると考えた。

cmiS4

cmiS4 翻訳産物は非常に小さなタンパクであり、PCP と相同性があつた。また VinL とも相同性を有しているため、クレマイシン開始基質とチオエステル結合を行う PCP であると考えられる。

cmiS5

cmiS5 翻訳産物は単独のアシル基転移酵素 VinK, BecK, MliK と相同性を有しており、これらの酵素同様、PCP に結合していた開始基質を PKS のローディングモジュールへ転移する反応を触媒すると考えられる。

cmiS6

cmiS6 翻訳産物はアデニル化酵素 VinN, BecJ, MliJ と相同性を有しており、クレマイシンの予想開始基質である 3-アミノノナン酸を PCP である CmiS4 へアデニル化を経由して結合させる機能を有していると考えられる。

cmiS1 については当時翻訳産物の相同性解析を行っていた時は *bec*, *mli* クラスターに存在する

becU や *miaU* との類似性しか見出せず、その機能については不明であった。翻訳産物である CmiS1 が開始基質生合成に関わっていることについては第 4 章にて詳しく述べる。

3.3.4 ポスト PKS 修飾酵素群の相同性解析

cmiM1, *cmiM2*, *cmiM7*

これら 3 つの酵素遺伝子はそれぞれレチノールデヒドロゲナーゼ (*cmiM1*)、ヒドロキシピルビン酸イソメラーゼ (*cmiM2*, *cmiM7*) をコードしていた。クレミマイシンのアグリコン骨格構築後、修飾反応として考えられるのはアグリコン内に存在する五員環の形成やグリコシル化反応の 2 つであるが、これらの酵素遺伝子は何れも NAD(P) 依存型の酸化還元酵素をコードしており、未解明な分子内炭素五員環の形成反応に関わる可能性があると考えた。

cmiM3

cmiM3 翻訳産物は NAD 依存型酸化還元酵素カルベオールデヒドロゲナーゼや、PKS の機能ドメインとしても存在している 3-ケト還元酵素と相同性を持っていた。またこの遺伝子は *bec*, *mia* クラスターに相同性を示す遺伝子が存在しない。したがって後述する CmiM4 と協同して二環性のマクロラクタム骨格構築を触媒する酵素であると予想した。

cmiM4

cmiM4 翻訳産物はシトクローム P450 酸化酵素と相同性を示した。*bec* クラスター中に存在する P450 酵素 BecO は BE-14106 生合成においてアグリコン骨格構築後に 8 位の水酸化を触媒していることが遺伝子破壊実験にて示されている。すなわち CmiM4 もクレミマイシンのアグリコン骨格に水酸化する機能を有していると考えられる。

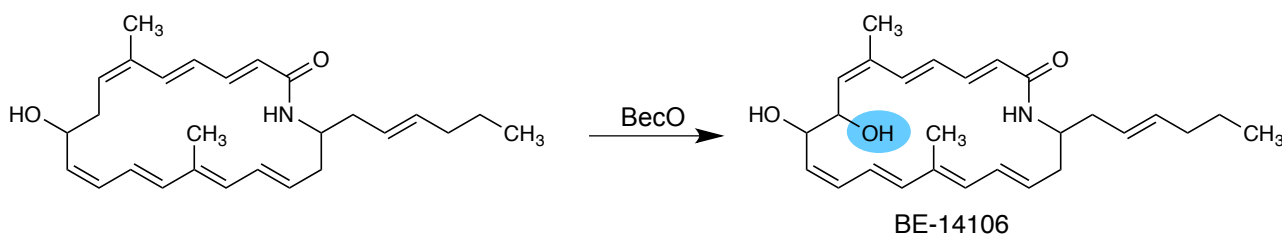


Fig. 45 遺伝子破壊実験により明らかになった BecO の触媒機構

cmiM5

cmiM5 翻訳産物のアミノ酸配列は糖転移酵素と類似し、エバーメクチン生合成における糖転移酵素 AveBI (AvrB) と最も高い相同性を示した (44 %)。AveBI は既に酵素レベルでの機能解析が行われており、エバーメクチンのアグリコン骨格に L-オレアンドロースを転移させる機能を有し

ていることが分かっている [58]。よって CmiM5 は dTDP-シマロース、もしくは 3 位が水酸基のままの dTDP-ジギトキソースをクレマイシンアグリコン骨格へ転移させる機能を有していると考えられる。

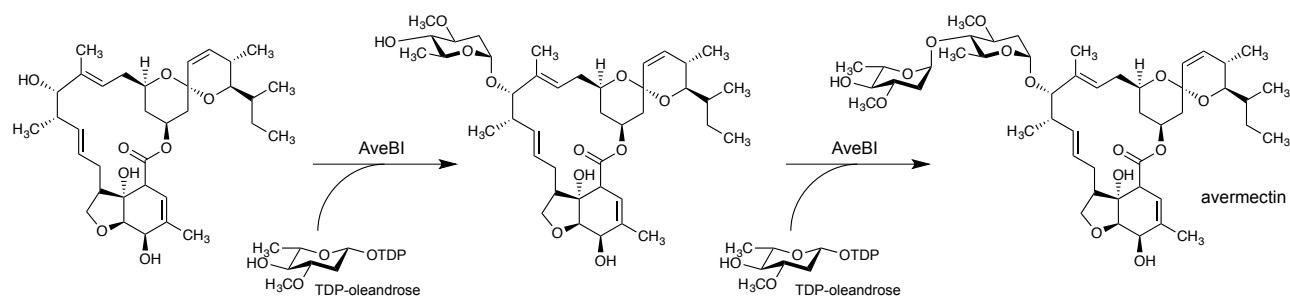


Fig. 46 Zhang らにより解明された AveBI の糖転移反応

cmiM6

cmiM6 翻訳産物はプロリンイミノペプチダーゼと注釈の付けられた酵素と類似していたが、その中には既に機能解明のなされた VinJ も存在していた。VinJ は VinM によって付加されたアラニンを PKS 伸長反応の終了後、TE によるラクタム環化を行わせるために取り除く機能を有している。これは β -アミノ酸含有型マクロラクタム生合成遺伝子クラスターに共通して存在する酵素であり、CmiM6 も同様の機能を有していると考えられる。

3.3.5 発現・調節に関わる遺伝子の解析

cmiR1

cmiR1 翻訳産物は II 型のチオエステラーゼと類似したアミノ酸配列を有するタンパク質であった。II 型チオエステラーゼとは PKS の C 末端に存在する TE とは異なって単独で発現し、ホットドッグ構造を有することが知られている。機能としては PKS 上に間違ってロードされてしまったアシル基、もしくは伸長反応が生じる前に脱炭酸反応だけが起こってしまい、先の反応へ進行出来ないアシル基を切り出すような PKS の保守機能を有するとされており、様々なポリケチド生合成遺伝子クラスターで報告されている。CmiR1 と最も高い相同性を示したのは *Streptomyces violaceusniger* Tü 4113 の染色体ゲノム DNA 上に存在した酵素遺伝子からの翻訳産物 Strvi_3312 であるが (58 %)、その詳細な機能は不明である。機能解明がなされた酵素の中では RifR との相同性が最も高かった (52 %)。RifR も II 型 TE の 1 つであり、リファマイシン生合成において PKS のメンテナンス機能を果たしていることを酵素レベルで証明している [59]。

cmiR2

cmiR2 翻訳産物は TetR タイプの転写制御因子と相同性のあるアミノ酸配列を有している。機能解析が行われた酵素の中で最も相同性の高かったのは *Streptomyces virginiae* におけるバージニアマイシン (virginiamycin) 生合成に関わる転写制御因子 VarR である。このタンパクはバージニアマイシンの排出に関わるタンパクをコードする *varS* 遺伝子の転写プロモーター領域に特異的に結合し、転写阻害を行うことが明らかとなっている [60]。CmiR2 においても近くに *cmiR3*, *cmiR4* 等、トランスポーターをコードする遺伝子が存在しているため、同様の機能を有している可能性がある。

cmiR3, cmiR4

cmiR3, *cmiR4* 遺伝子翻訳産物は何れも ABC-トランスポーターと高い相同性を示した。ABC-トランスポーターは膜タンパクの一種であり、ATP を動力源として分子の輸送に関わるタンパクとして知られている。すなわち CmiR3, CmiR4 は生合成されたクレミマイシンを細胞外へ排出する機能を有すると考えられる。先に述べたように、通常は CmiR2 によってこれらの発現が抑制されていると思われる。

cmiR5

cmiR5 遺伝子からの翻訳産物は LuxR タイプの転写制御因子と相同性のあるアミノ酸配列を有していた。最も相同性の高かったタンパクは ML-449 生合成酵素群に含まれる MlaH であり (38%)、ML-449 生合成の制御を行っていると考えられている。LuxR タイプの転写制御因子はしばしば二次代謝生合成遺伝子クラスターに見られ、例えばエバーメクチン生合成遺伝子クラスターでは *aveR* が、ピクロマイシン生合成遺伝子クラスターでは *pikD* が存在しており、それぞれの翻訳産物は正の発現制御を行うことが酵素レベルで実証されている [61,62]。すなわち CmiR5 も *cmi* クラスター中の何れかのプロモーター領域に結合し、正の RNA 転写制御を行っていると考えられる。

3.3.6 PKS のドメイン解析

cmi クラスターには合計 8 つの PKS 遺伝子が存在しており (Fig. 36)、これらの遺伝子産物はそれぞれ異なったドメイン構成を有していた。以下で各ドメインの活性残基、モチーフをマルチプルアライメントを用いて示す。PKS のドメイン解析にはドメイン検索プログラムである Pfam 及び InterProScan を、マルチプルアライメント図の作製にはアライメント作成プログラム MAFFT をそれぞれ遺伝子・アミノ酸配列統合解析ソフトウェアである Geneious 上で実行した。

ACP ドメイン

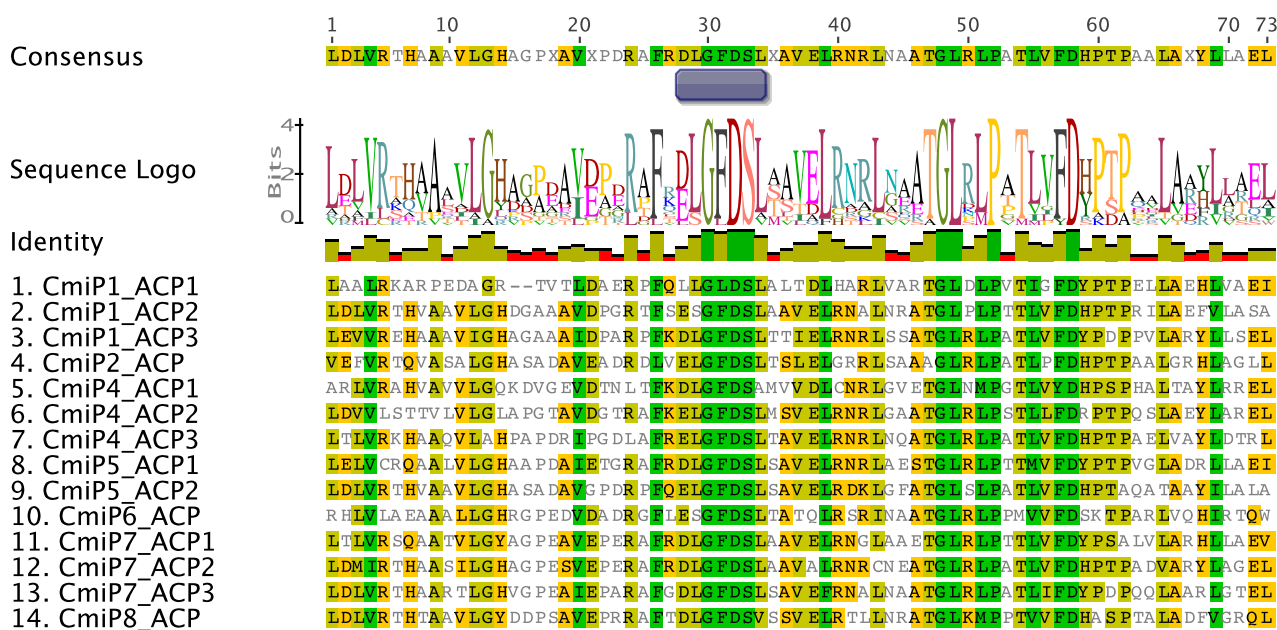


Fig. 47 ACP ドメインのマルチプルアライメント: 灰色の四角は ACP ドメインに保存されている“(D/E)XGXDSL”モチーフを示し、太字で示したセリン残基にホスホパンテテニル基が結合し、ホロ型 (活性型) となる。

ACP は開始基質や伸長基質をチオエステル結合で保持し、ポリケチド鎖伸長反応の土台となる 80 アミノ酸残基程度の小さなドメインである。チオエステル結合は (D/E)XGXDSL モチーフ中に存在するセリン残基がホスホパンテテニル化されて活性型 (ホロ型) となり、アシル基との結合を行えるようになる。CmiP タンパクは全てホスホパンテテニル基が結合するセリン残基を有することから、ポリケチド生合成に関わるものと考えられる。CmiP1 の N 末端は ACP ドメインから始まっているため、これが開始基質を受け入れる ACP と考え、CmiP1 はアグリコン骨格生合成における最初の PKS であると考えた。

AT ドメイン

AT ドメインは各モジュールに存在する ACP に開始・伸長基質を転移させるドメインで、約 300 アミノ酸残基から構成される。AT ドメインの基質特異性についてはアミノ酸配列からマロニル-CoA 選択性、もしくはメチルマロニル-CoA 選択性を決定することが出来るが、その他の基質特異性については十分な情報が存在しないため、未解明である。*cmi* クラスターに存在する PKS においては、CmiP4_AT1 と CmiP7_AT2 に “GHSQG” および “YASH” モチーフが存在し (太字は触媒活性残基を示す)、これはメチルマロニル-CoA を特異的に選択する AT ドメインであることを示す。他の AT ドメインは “GHS(V/I)G” および “HAFH” モチーフを有することから、マロニル-CoA 選択性を有すると考えられる。

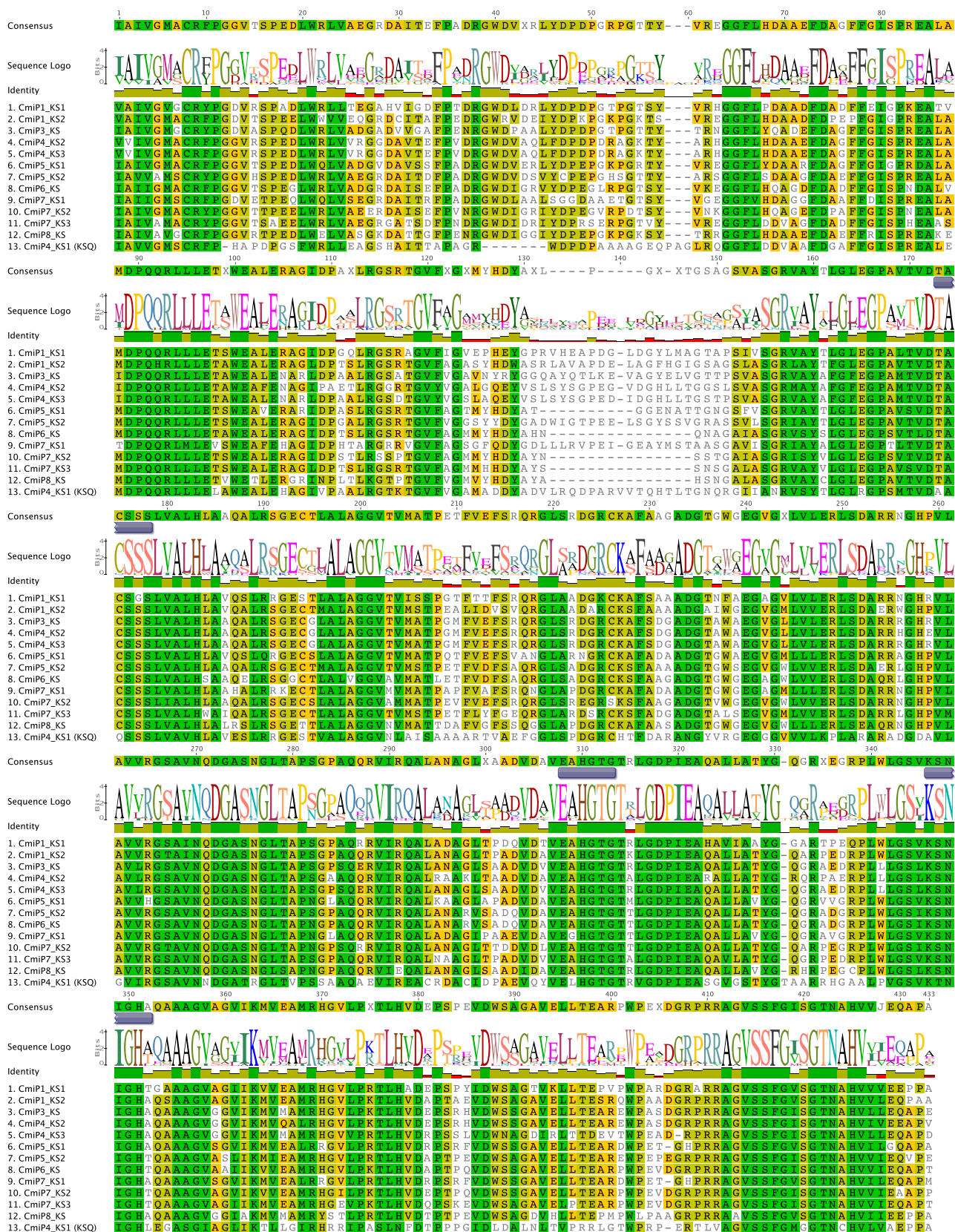


Fig. 49 KS ドメインのマルチプルアライメント: 3つの灰色の四角はそれぞれ活性残基を含む保存されたアミノ酸配列モチーフを示している。CmiP4のKSドメインでは触媒活性に必須なシステイン残基がグルタミンに置換されている(三段目の左端)。

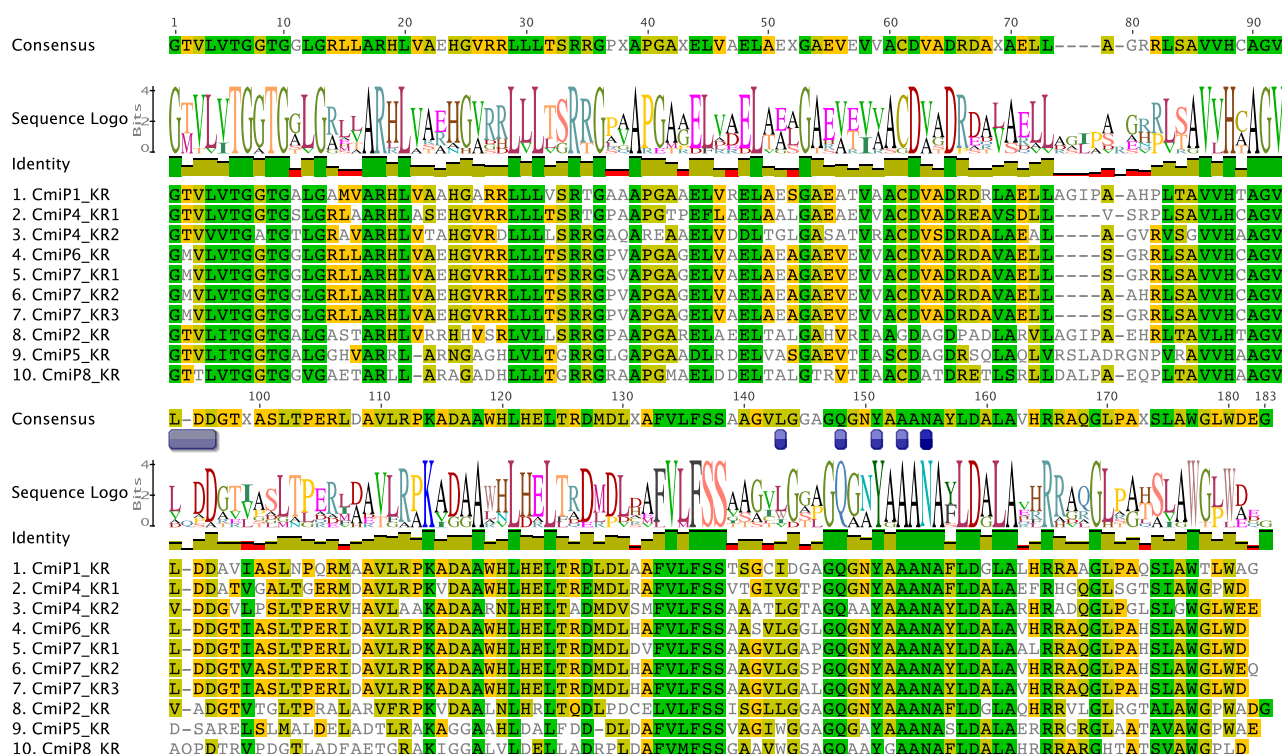


Fig. 50 KR ドメインのマルチプルアライメント: 灰色の四角および青色の四角はそれぞれ KR ドメインの反応特異性に関わるアミノ酸残基を示す。反応特異性に関しては Fig. 51 を参照。

KS ドメイン

KS ドメインの触媒活性残基は 1 つのシステイン残基と 2 つのヒスチジン残基で構成されており、各々特徴的に保存された “TACSSS”, “EAHGTG”, “KSNIGHT” モチーフ内に存在することが今までに分かっている。*cmi* クラスターの PKS に存在する KS ドメインにおいても CmiP4_KS1 以外は、モチーフ内の残基に多少の揺らぎが有りながらも触媒活性残基は全て保存されており、KS ドメインとして正しく機能していると考えられる。CmiP4_KS1 は触媒活性に必要なシステイン残基がグルタミンに置換されていることから KS^Q ドメインであると判断した。これは開始基質を脱炭酸を伴いながら ACP ヘロードするドメインであることが知られている。また先の AT ドメインの解析により、KS^Q ドメインに隣接する AT ドメインはメチルマロニル-CoA であることが予想出来た。そこで CmiP4 はクレミマイシン開始基質の生合成を行う最初の PKS であると判断した。

KR ドメイン

現在までにいくつかの結晶構造が解かれ、その反応特異性と構造との相関を観ることによって、アミノ酸配列において保存されている領域から比較的簡単に酵素反応生成物を予想出来る。2007 年に Keatinge-Clay が提唱した KR ドメインのフィンガープリント解析を適用すれば (Fig. 51) [14], CmiP5, CmiP8 の KR ドメインは A1 タイプであり、生成物は (2*R*,3*S*) の立体化学

を有することになる。一方 CmiP2 以外のその他の KR ドメインは“LDD”モチーフを有し、触媒活性に必須であるチロシンの2つ隣の残基がプロリンではなくアラニンであるため、B1 タイプの KR ドメインであることが考えられ、KR ドメインによる生成物は (2*R*,3*R*) の配置を持つと考えられる (何れも α 位, γ 位の置換基の優先順位が最も小さい場合)。CmiP2 の KR ドメインについては触媒活性に必須なチロシン残基は存在するものの、LDD モチーフが“VAD”に置換されていたため、この時点ではどのタイプにもあてはまれないと判断し、不活性の KR ドメインと判断した。

Substrate	KR type	Product	Module	LDD						Lid	Fingerprint
				Loop	Catalytic Region	1	2	3	456		
A1			Ery2	HAAGLPQQVAI	SSGAGVWGSARQAYAAAGNA	WGLWAAAGMTG-DEEAVSFLRRG					1: no LDD 2: W 3: no H
			Meg6	HAAGVQSTPL	SSGAGVWGSANLGAYAAANA	WGMWAGEGMAVGGAAARE-LRRG					
			Ole6	HTAGVPDSRPL	SSNAGVWGSQGQAVYAAANA	WGAWAGDMAT--GLDGG-LTRRG					
			Pik5	HTAGAPGGDPL	SSNAGVWGSQGQAVYAAANA	WGLWAGDGMGR--GDDAYWRRG					
			Sor6	HAGGIEPHAPL	SSGAVVWGSQGQGYAAANA	WGVWGGGGMAT--GLLAAQLRRG					
A2			Ty16	HTAGTPHSAEF	SSGAAVWGSQGQTAYGAANA	WGLWGGGGMGE--GDGEFLRRG					1: no LDD 2: W 3: H
			Amp1	HTAAVIELAAL	SSTAGMWGSGVHAAYVAGNA	WGWPPDLLERELAT---PHQIRRS					
			Can1	HTAAVIELQSI	SSTAGMWGSGRHAAVYAANA	WGIWADDMKLGRVD---PGQIRRS					
			Con5	HAAGTGLLVPL	SSISGVWGSQDGHGAYAAANA	WGIWDPGGAGMAANLVEQLRRG					
			Ela4	HTAGAGLVVPL	SSISAVWGSQDGHGAYAAANA	WGIWSPERG-GMAANLVEQLRRG					
B1			Nys1	HAAAIELSAL	SSTAGMWGSGVHAAYVAGNA	WGWPPDDRARELAT---PHRIRRS					1: LDD 5: no P
			Pim7	HTAVTIELAPL	SSTAGMWGSGHAAYVAGNA	WGIWADDLKLRVD---PGQIRRS					
			Ave1	HTAGILDDATL	SSVTGTWGNAGQAYAAANA	WGTWQGNGLADSDKARAYLDRRG					
			Ty11	HTAGILDDAVI	SSAAATFGAPQANYAAANA	WGLWGGGGMAG-AGEESLRRG					
			Asc8	HTAATLDDGIL	SSAAAVLGSPPGQNYAAANA	WGMWHTSTLTGOLDADRRIRRG dh					
B2			Ave7	HAAGVLDDATI	SSAAAGILGSAGQNYAAANA	WGLWEEASGMTGHLAGTDHRIIRSG dh					1: LDD 5: P
			Ave9	HAAGVLDDATI	SSAAAGILGSAGQNYAAANA	WGLWEEASGMTGHLAGTDHRIIRSG DH					
			Rap10	HTAGVLDDGVV	SSAAAGVLGSAGQNYAVANA	WGLWEDASGLTAKLTGTDHRIIRSG DH					
			Ery1	HAATLDDGTIV	SSFAAFGAPGLGGYAPGNA	WGTWAGSGMAEGA-VADFRFRHG					
			Lan1	HTAATLDDGTL	SSFAAFGAPGLGCYAPGNA	WGTWAGSGMAEGP-VAERFRFRHG					
C1			Meg1	HVAATLDDGTIV	SSSTAAGAPGLGGYVPGNA	WGTWAGSGMAEGP-VADFRFRHG					4: no Y
			Pik1	HTAGALDDGIV	SSVBSLTGIPGQGNYPHNA	WGPWDGGMAAGDGAERLRNHG					
			Oli14	HTAGVAGHGPL	SSGAAVWGSQNGANAAAGC	WGGWQATAMAVGDTAEQLRRG					
			Ery3	HAGTLTNFGSI	SSVAGIWWGGAGMAAYAGSA	WTPWA--LPGGAVDDGYLRERG					
			Lan3	HAATRTFPGPV	SSVAGVWGGAGMAGYAAGSA	FSPWA--LPGTVFSAPOAAORG					
C2			Meg3	HAETLTNFAV	SSVAGVWGGVGMAYAAGSA	WTPWA--LPG-AVDDGRLRRG					6: <N*
			Nid4	HAPPLVPLAPL	SSVSGVWGGAGGAYAAATA	WSPWAGGAHAEGADEEFLRRG					
			Pik3	HLPPVTDSEPL	SSVAAIWGGAGQAYAAAGTA	WSPWEGSRVTEGATGERLRLRG					
			Ty14	VAPPVFPPTPL	SSVAGVWGGAGQGGYAAAGTA	WTPWLGTFAAD-SLGEQMSRAG					

Fig. 51 Keatinge-Clay が提唱した KR ドメインのフィンガープリント解析 [14]: 1. “LDD” モチーフの有無, 2. Trp 残基の有無, 3. His 残基の有無, 4. 触媒活性に必須な Tyr 残基の有無, 5. Pro 残基の有無, 6. Asn か Asn より小さい残基が存在するか これら 6 か所を調べることで、KR ドメインが A1–C2 タイプであることが予想出来る。

DH ドメイン

DH ドメインに関しては保存された活性残基を含むモチーフ“LXXHXXXGXXXXP”のみで判断し、CmiP1 の最初の DH ドメイン以外、全ての DH ドメインが活性型であるということのみ判断した [63]。CmiP1_DH1 の触媒活性に必須なヒスチジン残基は、チロシン残基に置換されており不活性であることが示唆された。しかしこの DH ドメインが存在するモジュールには KR ドメインが無い場合、考慮する必要は無いと考えられる。一方当初ドメイン検索を行っても発見出来なかった CmiP2, CmiP3 に存在する“切断された”DH ドメインについては、第 4 章で述べる。

ER ドメイン

ER ドメインは *cmi* クラスターに存在する PKS に 3 つしか存在しなかったが、これら全てが“GGVGXAAQXA”モチーフを有していたため、全て活性型のドメインと判断した。



Fig. 52 DH ドメインのマルチプルアライメント: 灰色の四角は触媒活性に必須なヒスチジン残基を含む“LXXHXXGXXXXP”モチーフを示している。

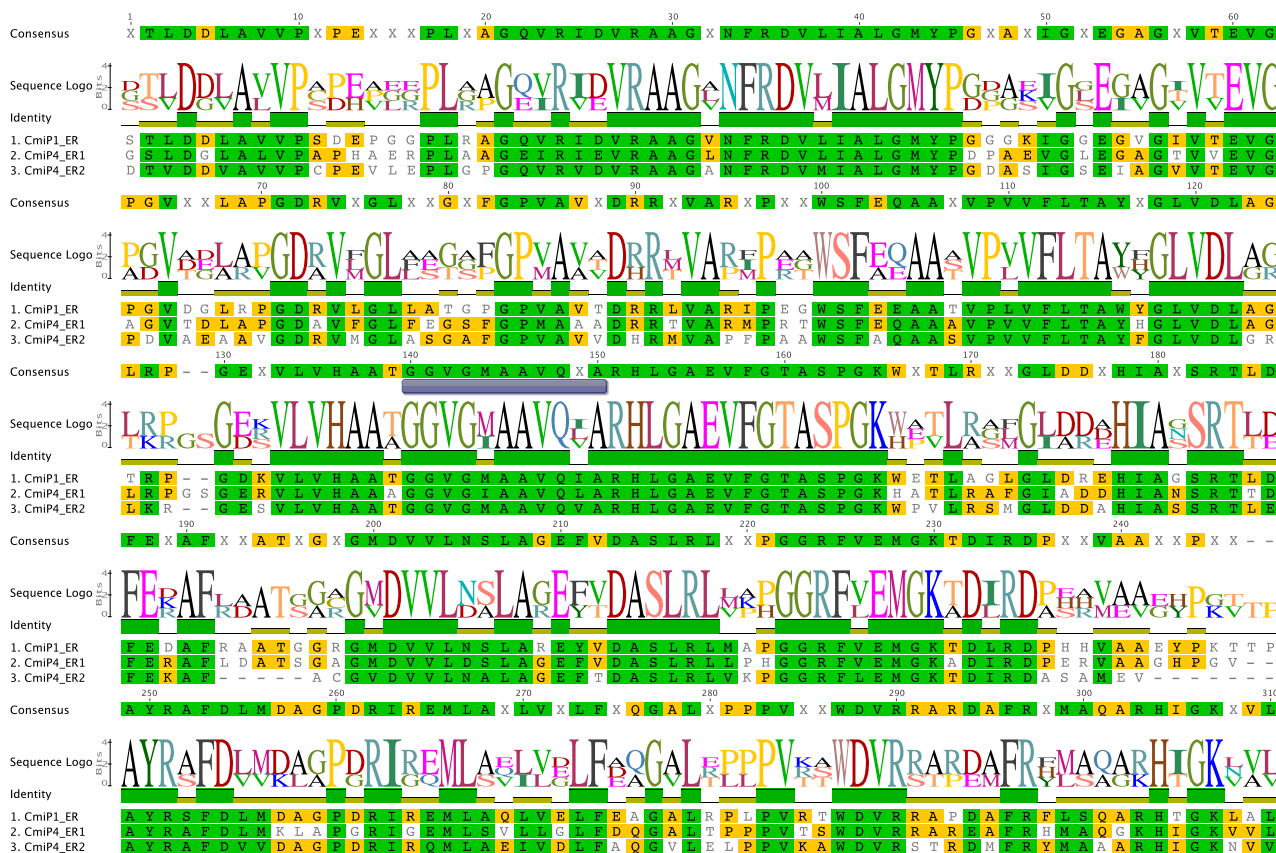


Fig. 53 ER ドメインのマルチプルアライメント: 灰色の四角はアミノ酸配列のモチーフ“GGVGXAAQXA”を示している。

TE ドメイン

TE ドメインは CmiP6 の C 末端に存在し、三つ組触媒残基 (Asp-Ser-His) を有していたことから活性型のドメインであるとした。またこの TE ドメインを有することから、CmiP6 をクレミマイシンアグリコン骨格を生合成する最後の PKS であると判断した。

以上の PKS ドメイン解析により、最初にクレミマイシンの開始基質生合成に関わる PKS は、N 末に KS^Q ドメインを有する CmiP4 であることが予想出来る。また CmiP3, CmiP2 が互いに不足しているドメインを相補し合うような構成をとっていたので、これらはまとめて一つのモジュールを形成し、開始基質生合成に関わっていると予想した。クレミマイシンアグリコン骨格の構築に関わる最初の PKS は、N 末側に ACP のみのモジュールを有する CmiP1 であり、また、AT ドメインによる伸長基質の基質特異性や、モジュールに存在するドメインとクレミマイシンの構造との対応、TE ドメインの存在を考慮すると、アグリコン骨格を構成する PKS は、CmiP1 → CmiP5 → CmiP8 → CmiP7 → CmiP6 の順でポリケチド伸長反応を触媒すると考えられる。

また、以上のように相同性解析を行った結果、クレミマイシン生合成は 33 個の酵素遺伝子翻訳産物により生合成されと考えられ、*cmiC1* より上流側にある酵素遺伝子 *orf1-orf4* と、*cmiR5* より下流側に存在する酵素遺伝子 *orf5-orf7* はクレミマイシン生合成に直接関わっていないと予想した。

3.4 遺伝子情報を基としたクレミマイシン生合成経路の推定

3.4.1 クレミマイシン開始基質の生合成機構

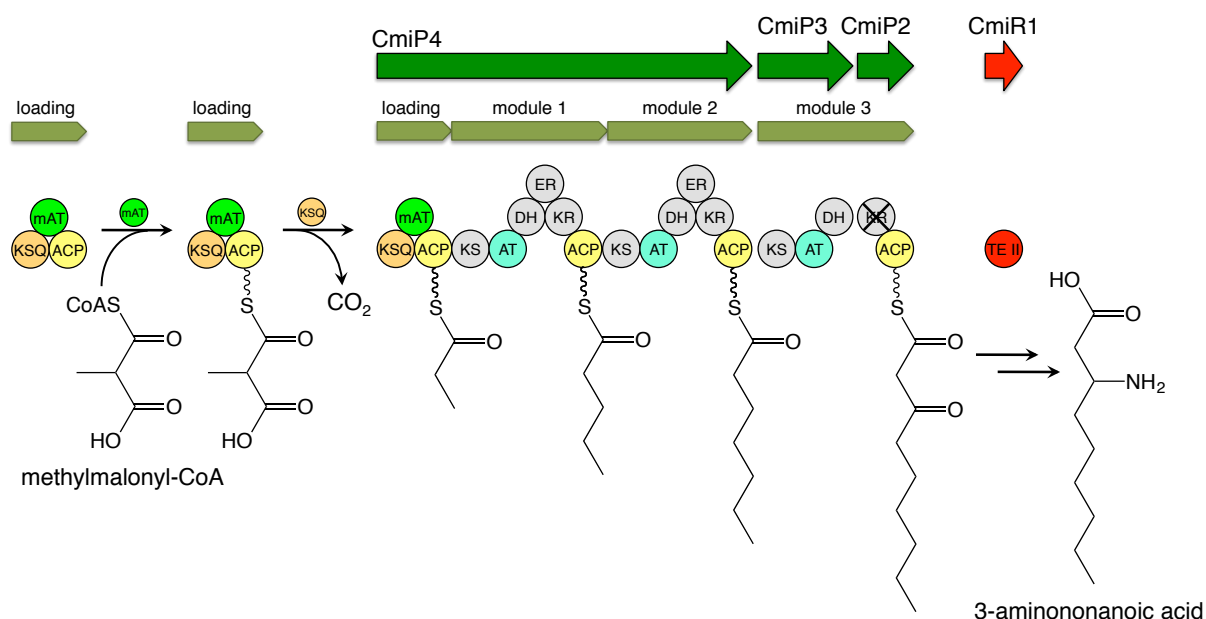


Fig. 54 PKS のドメイン解析から考えられるクレミマイシン開始基質の予想生合成機構

以上の PKS ドメイン解析と、クレミマイシン生合成予想経路を合わせると、以下のような構成でクレミマイシンの骨格が生合成されていくと考えられた。すなわち CmiP4_ACP1 にメチルマロニル CoA が脱炭酸を伴いながらロードされることによってクレミマイシン開始基質の生合成が開始される。その後 CmiP4 のモジュール内で 2 回の伸長反応が進行し、トリケチドが生じる。その後の伸長反応はモジュール構造が不完全である CmiP3 と CmiP2 が何らかの相互作用にて互いに補完し合って行われると考えた (Fig. 54)。CmiP2_KR は不活性と判断したため、クレミマイシン開始基質は 3-ケトノナン酸がアミノ化されて得られる 3-アミノノナン酸だと考えた。

CmiP4, CmiP3, CmiP2 により生成したポリケチド鎖にアミノ基が導入され、3-アミノノナン酸が生じる機構については、Jørgensen らの提唱を基に推定した。すなわちアミノ基の供給源はグリシンであり、グリシン酸化酵素と相同性を有する CmiS2 がこれを FAD を用いて酸化、アンモニアとグリオキシル酸及び FADH₂ を生じる。このアンモニアを PKS により生成した 3-ケトノナノイル-ACP に求核攻撃させ、3-イミノノナノイル-ACP へと変換する。これを CmiS2 内の FADH₂ 還元し、3-アミノノナン酸チオエステルが生合成される。その後加水分解反応を受けて 3-アミノノナン酸が生じると考えたが、CmiP2 には TE ドメインが存在しない。そこで II 型の TE である CmiR1(58 % の相同性) がこれを触媒すると考えた。通常 II 型の TE は PKS に間違っってロードされてしまったアシル基の除去等の機能を持つと考えられているが、他にポリケチド鎖を切り出す機能を有する酵素をコードしている遺伝子をこの時点では探し出すことが出来なかったため、この II 型 TE が開始基質生合成終了後にチオエステルから開始基質を切り出すと予想した (Fig. 55)。

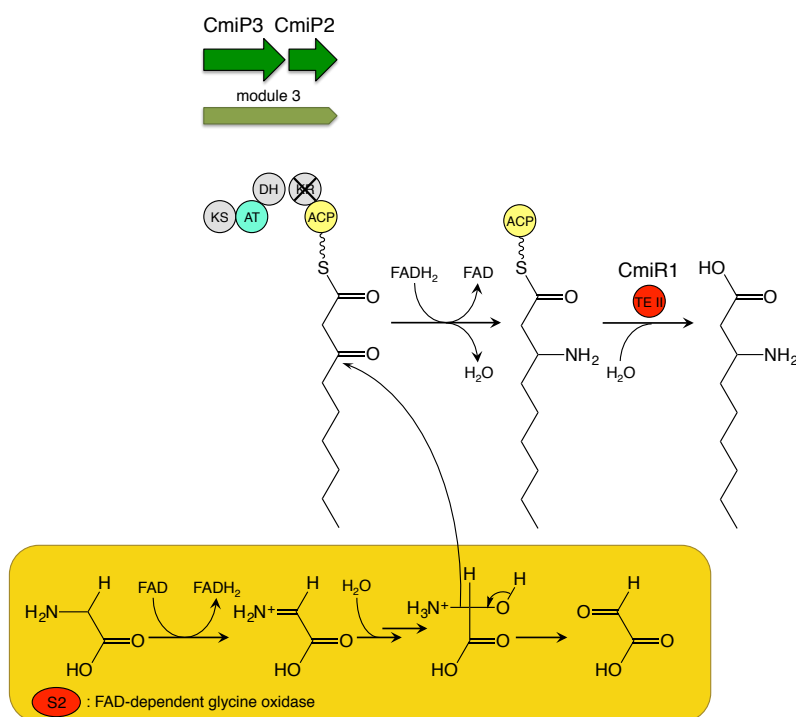


Fig. 55 3-アミノノナン酸の予想生合成機構

3.4.2 クレミマイシンアグリコン骨格の生合成機構

このように生合成された 3-アミノノナン酸は、*vin* クラスターに存在している酵素遺伝子と高い相同性を有する *cmiS* 遺伝子群から翻訳された CmiS3-7 によって、次の PKS へ導入されるための修飾反応を受けると考えた。すなわち VinN ホモログである CmiS6 によりアデニル化を経て 3-アミノノナン酸は PCP である CmiS4 へとロードされる。そして VinM ホモログである CmiS3 がアミノ基に他のアミノ酸を付加することにより、アミノ基を「保護」する。これがアシル基転移酵素 VinK のホモログである CmiS5 により続く PKS へと導入される、という機構である (Fig. 56)。この時にアシル基が導入される PKS は、N 末に ACP ドメインのみで構成されるモジュールを有する CmiP1 であると考えた。

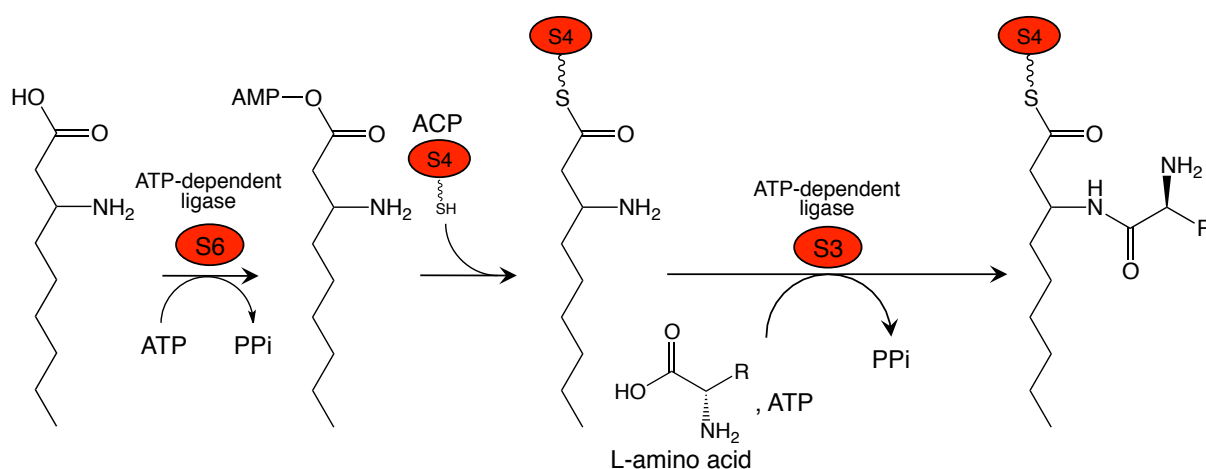


Fig. 56 3-アミノノナン酸への修飾反応

その後は CmiP5 → CmiP8 → CmiP7 → CmiP6 の順で次々とポリケチド鎖伸長反応が進行していく (Fig. 57)。そして最後に CmiP6 の C 末に存在する TE ドメインによるラクタム環化を受けるため、VinJ ホモログである CmiM6 が CmiS3 によって付加されたアミノ酸を「脱保護」し、ラクタム環化が生じると考えられる (Fig. 58)。モジュール 10 における二重結合の生成では、クレミマイシンの構造を考える限りシス配置のオレフィンが生成されなければならないが、DH ドメインのアミノ酸配列の解析のみではシス配置オレフィンを生成させる十分な論拠が無いため、現時点では未解明である。

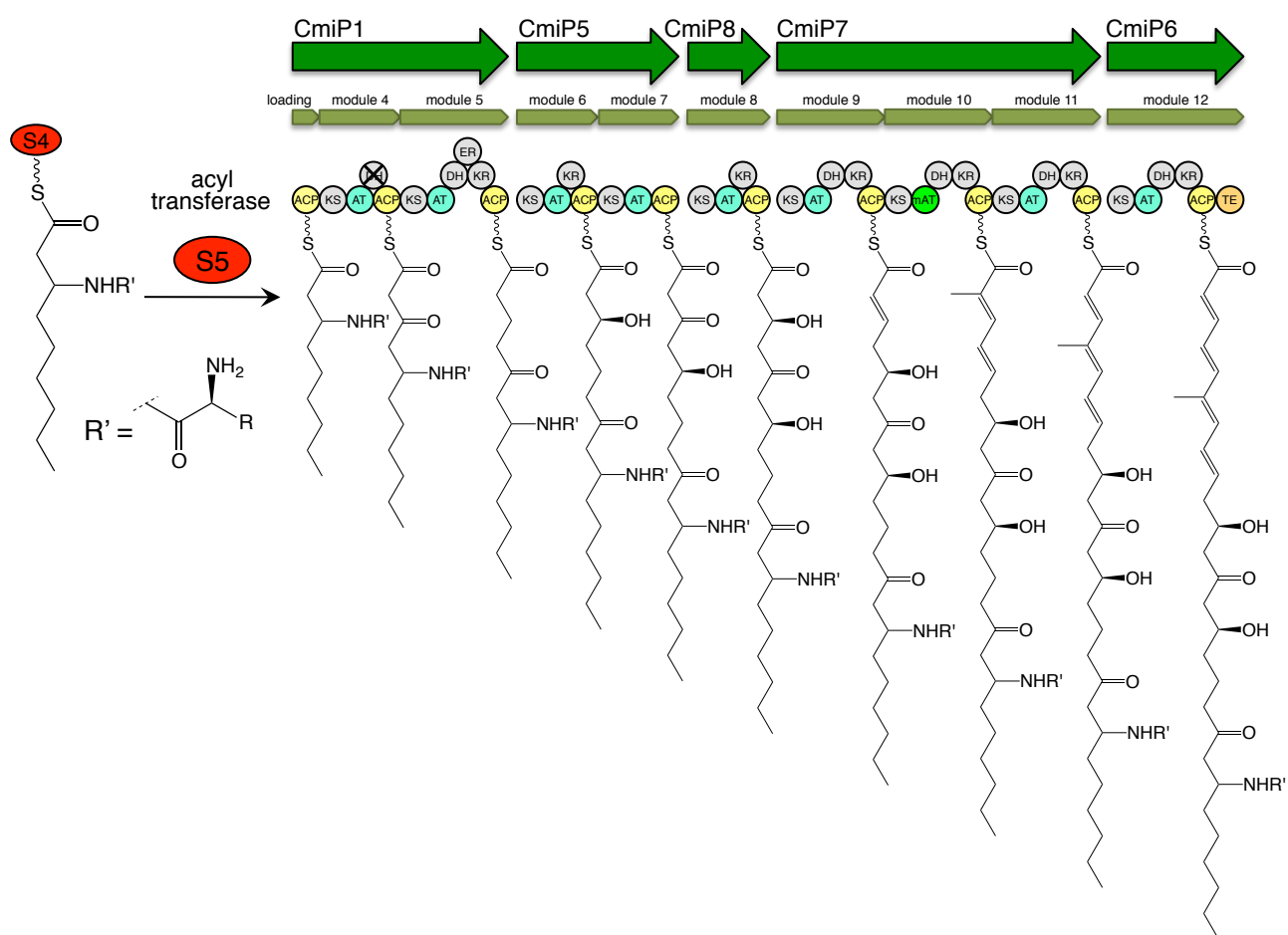


Fig. 57 PKS によるアグリコン骨格の構築

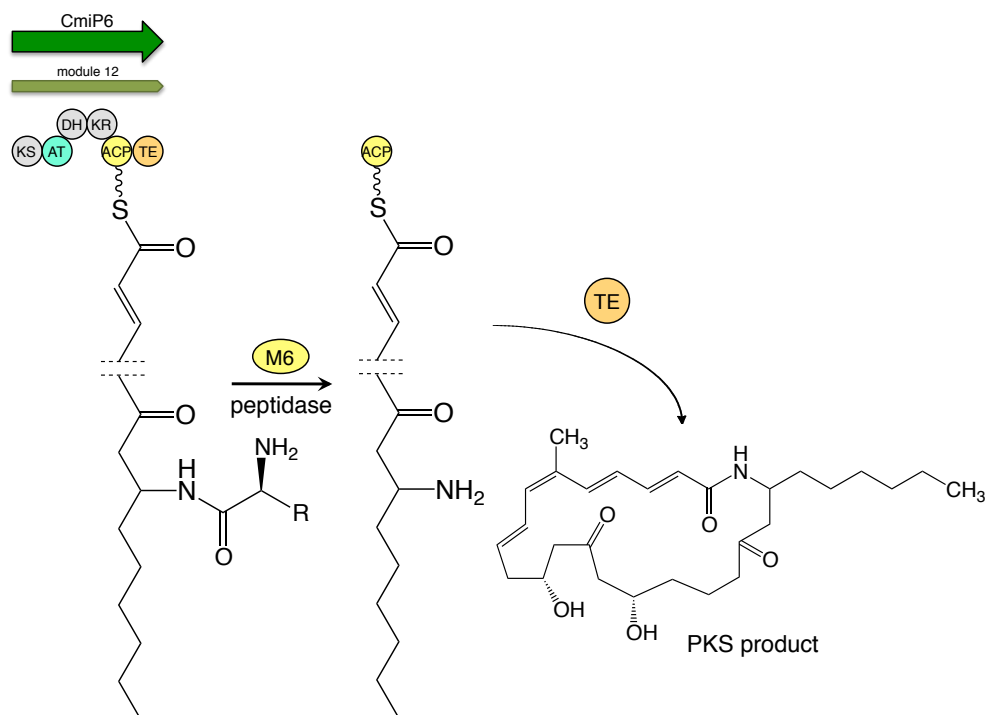


Fig. 58 CmiM6 によるアミノ酸の除去、ラクタム環化

次に PKS 産物は各種修飾酵素によって二環化、配糖化を受けると考えられる。二環性のラクタム環構築には 2 つないし 4 つの酵素が関わりとされる。まずシトクローム P450 酸化酵素である CmiM4 がクレミマイシンアグリコン骨格 10 位を酸化し、この部分に水酸基が導入される。さらに NAD 依存型酸化還元酵素である CmiM3、もしくは同じく CmiM4 がさらにこの水酸基を酸化し、10 位にはカルボニル基が生成すると考えた。すると 8, 9, 10 位部分で α, β -不飽和のケトンが生じる。12 位の水素が引き抜かれ、12, 13 位部分でエノラートが生じて求核性を生じた場合、これが 8 位炭素に求核攻撃を行い、マイケル付加型の反応により五員環が構築されると考えた。その後、ケト-エノール互変異による二重結合の移動等が生じ、最終的にクレミマイシンのアグリコン骨格が完成すると考えられる (Fig. 59)。

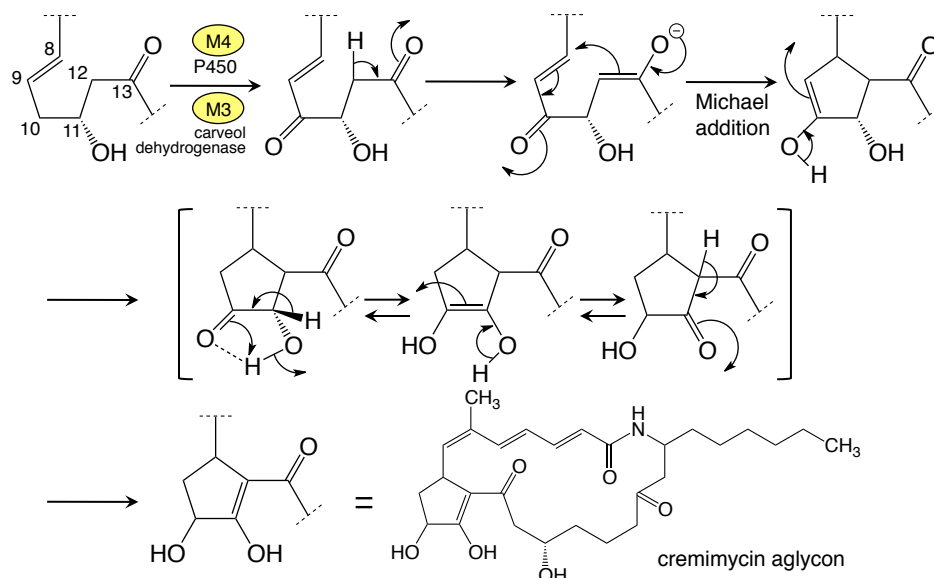


Fig. 59 ポスト PKS 修飾酵素による二環性マクロラクタムの予想生成機構

3.4.3 シマロースの生合成機構

シマロースはジギトキソース構造の 3 位水酸基がメチル化されている構造となっているため、ジギトキソースの構築機構を基にその生合成機構を推定した (Fig. 60)。すなわち、まず一次代謝経路で生じた D-グルコース-1-リン酸を、CmiC7 がチミジン-二リン酸 (dTDP) を付加することにより活性化させる。これを CmiC6, CmiC5 がそれぞれ 6 位, 2 位を脱水し、2,6-ジデオキシ-3,4-ジケト-D-グルコースが生じる。これを 3-ケトレダクターゼである CmiC3 がエピメリ化を伴いながら還元を行うと考えた。得られた 2,6-ジデオキシ-4-ケト-D-アロースは 3,5-エピメラーゼによって反転すると考えられる。その後 4 位カルボニル基は 4-ケトレダクターゼ CmiC2 により還元され、dTDP-L-ジギトキソースが生成する。3 位水酸基に対するメチル化がいつ生じるかについては今のところ不明であるが、当研究室において酵素レベルで解明された FD-594 生合成における配糖化機構では、dTDP-D-オリボースが FD-594 アグリコン骨格に結合した後に O-メチル化が生じてオ

レアンドロース部位となることが分かっている [64]。すなわち、クレマイシンの場合も CmiC1 による *O*-メチル化は配糖化の後に起こるものと考えられる。一方、塩基配列・アミノ酸配列解析から得られた情報ではシマロースは L 糖となっているが、これを実際の構造と比較すると疑問が生じる。クレマイシンのシマロース部位の絶対立体配置は未解明であるが、仮に遺伝子情報の通り L 糖であるとするならば、二次代謝産物生合成で見られる糖転移酵素は反転型であることが多いため、そのグリコシド結合様式は α 結合となる。しかし、クレマイシンの $^1\text{H-NMR}$ スペクトルではシマロース 1 位に明らかにアキシアル-アキシアル水素による大きなカップリング定数が存在し ($J = 10 \text{ Hz}$) [26]、 β 結合であると言わざるを得ない。そこで考えられるのが CmiM5 が保持型の糖転移酵素であるということであるが、現時点ではアミノ酸配列から CmiM5 が反転型・保持型、どちらの糖転移反応を触媒するのかは判断出来ない。よって可能性として挙げられるのは、ジギトキソースが L 糖として生合成され、CmiM5 は保持型の糖転移反応を触媒し、その後 *O*-メチル化が進行するという経路である。これを実証していくにはシマロースの立体絶対配置を決定し、その後 CmiM5 の機能解析を行っていくことが必要である。

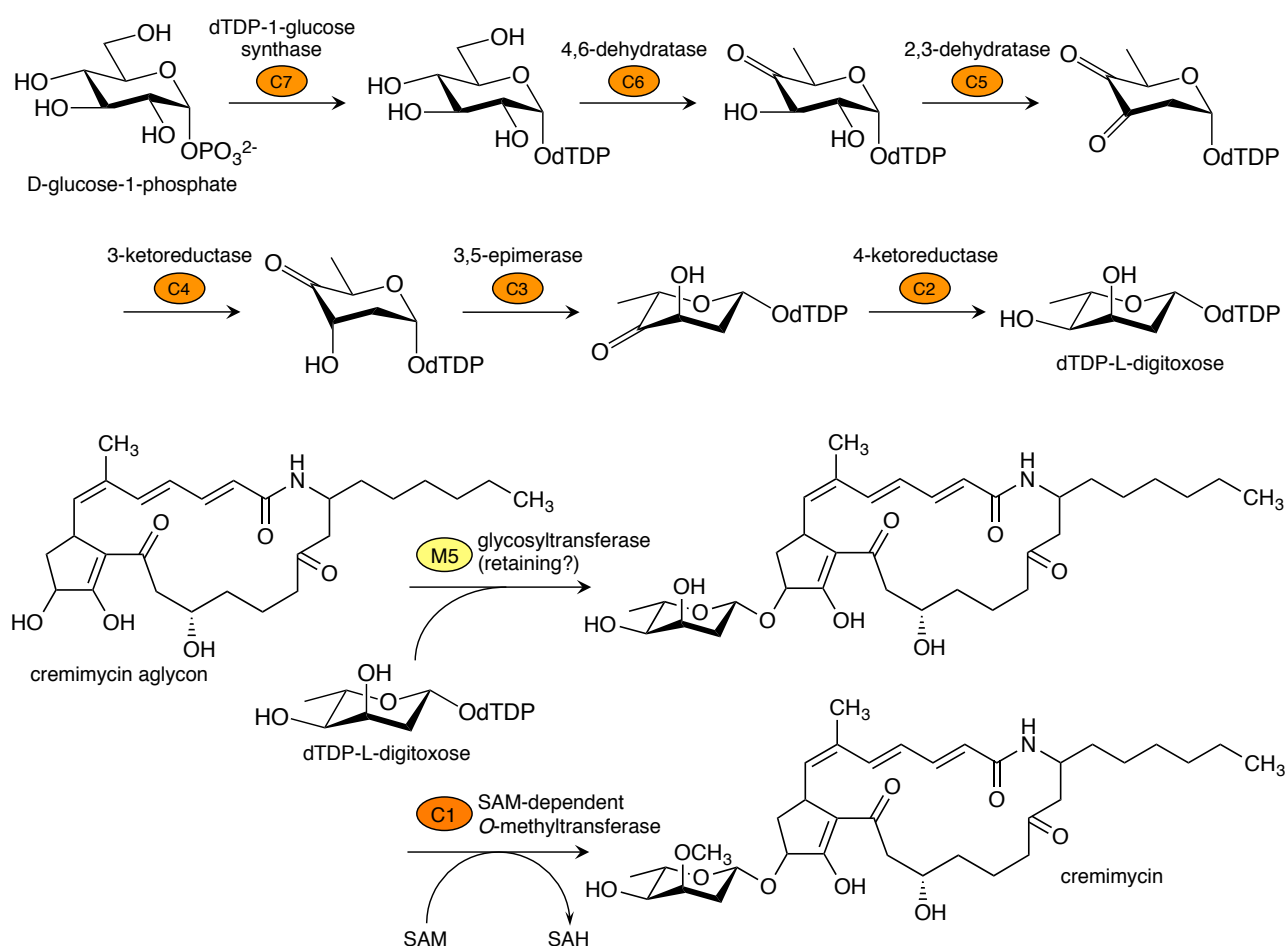


Fig. 60 TDP-L-ジギトキソースの予想生合成機構ならびに予想される糖転移・メチル化機構

3.5 遺伝子破壊実験

3.2 で得られたポリケチド生合成遺伝子クラスターはその酵素遺伝子の組み合わせからクレミマイシンの生合成に関わっていることが強く示唆された。しかし、実際にこのクラスターがクレミマイシン生合成に関与していることを示すためには、このクラスターに何らかの操作を施し、クレミマイシン生産に影響するか否かを確認する必要がある。そのため遺伝子破壊実験を試みることにした。一般的に放線菌ゲノム DNA の遺伝子組換えは外来遺伝子を導入し、相同組換えを引き起こさせることによって生じることが知られている [65]。放線菌における外来遺伝子の導入には、今まで以下のような手法が報告されている。

プロトプラスト-PEG 法

外来遺伝子を導入したい放線菌の細胞壁をリゾチームで分解 (プロトプラスト化) し、ポリエチレングリコール (PEG) 存在下、外来遺伝子を加えることによって導入する手法。様々な菌種において実績があるが、その詳細な導入機構については不明な部分がある。

エレクトロポレーション法

外来遺伝子を導入したい放線菌の細胞壁をリゾチームで部分的に分解してコンピテントセルを作製し、電圧を掛けることによって細胞壁・細胞膜に穴を空け、そこから外来遺伝子を導入する手法。大腸菌の形質転換法としては非常によく用いられる手法であるが、放線菌での報告例は少ない [66]。

接合法 (コンジュゲーション法)

導入したい外来遺伝子を予め F 因子陽性の⁺大腸菌へ導入しておき、一般的には F 因子陰性の放線菌と混合することによって異種間での遺伝子伝達を行わせる手法。プロトプラスト化やコンピテントセルの調製等の操作を必要とせず、比較的簡便に行えるため、近年の相同組換えでは非常に多くの報告例がある。

破壊する標的遺伝子については以下に示す理由からシトクローム P450 酵素をコードする遺伝子 *cmiM4* を選択した。

1. *bec* クラスターにおけるホモログ遺伝子 *becO* の破壊実験は成功しており、BE-14106 の 8 位が水酸化されていない BE-14106 誘導体の取得に成功している。
2. *cmiM4* 近傍の遺伝子は何れも翻訳方向が逆であり、*cmiM4* を破壊しても他の遺伝子の転写に影響を与えないと考えられる。
3. *cmiM4* はクレミマイシン 10 位の酸化反応に関わると考えられ、二環性マクロラクタムの構築や配糖化に対して大きな役割を持っていると考えられ、この遺伝子を破壊すればクレミマイシンの構造類似体が得られると考えた。

3.5.1 クレミマイシン生産菌の抗生物質耐性

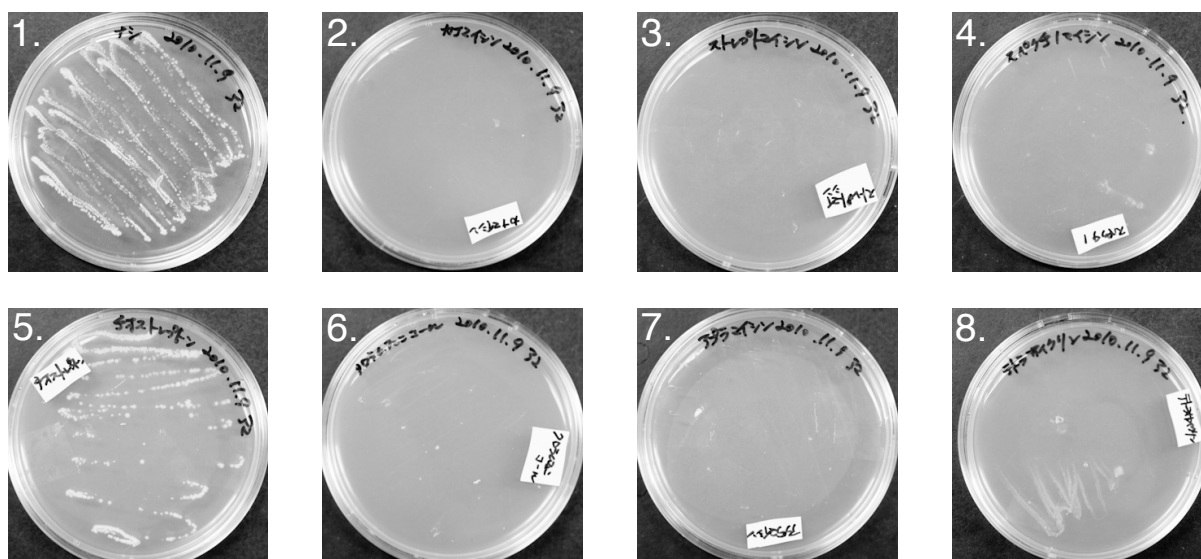
通常、放線菌の遺伝子破壊株を構築する際に用いられる外来遺伝子は抗生物質耐性遺伝子である。何故なら放線菌ゲノム DNA 上に抗生物質耐性遺伝子が組み込まれれば、その遺伝子組換え体は対応する抗生物質存在下でも生育出来るようになり、遺伝子組換えの可否が明確に判断出来るからである。しかし、クレミマイシン生産菌が元々これらの抗生物質に耐性を有していれば、この手法を適用することは出来ない。そこでまずクレミマイシン生産菌がどの程度抗生物質耐性を有しているかについて調べた。各抗生物質を加えた Yeast-Starch 寒天培地を作成し、これらにクレミマイシン生産菌を植菌、28°C で静置培養を行った。その結果、クレミマイシン生産菌はチオストレプトンに対して耐性を持ち、テトラサイクリンに対して弱いながら耐性を有した。一方、クロラムフェニコールやアミノグリコシド抗生物質に対しては感受性があり、遺伝子破壊株を構築するにはこれらの抗生物質耐性遺伝子を用いればよいことが分かった (Table 5, Fig. 61)。

Table 5 クレミマイシン生産菌の抗生物質耐性

Antibiotic	concentration ($\mu\text{g/mL}$)	sensitive?
kanamycin	200	○
streptomycin	50	○
spectinomycin	50	○
thiostrepton	3	×
chloramphenicol	170	○
apramycin	50	○
tetracycline	50	△

3.5.2 接合法による遺伝子破壊株の作成

本研究ではまず、当研究室で既にビセニスタチン・ハルストオクタコサノライド生産菌、FD-891 生産菌で遺伝子破壊株の作成実績があったプロトプラスト-PEG 法を検討した。大腸菌、放線菌、何れの細胞内でも複製可能なシャトルベクター pWHM3 をベースに破壊株作成用プラスミドを構築し、これをポリエチレングリコール存在下、プロトプラスト化したクレミマイシン生産菌へ導入した。その結果、目的の抗生物質耐性を示す遺伝子破壊株を得ることは出来たものの、目的の遺伝子型では無かった。また、エレクトロポレーション法による遺伝子導入も試みたが、目的の抗生物質耐性を示す株を得ることが出来なかった。そこで接合法による遺伝子導入を検討することにした。この際使用する大腸菌は、遺伝子伝達を触媒する酵素遺伝子を持つプラスミド pUZ8002 を保持し、細胞内の DNA をメチル化する活性を有しない (*dam*⁻) 大腸菌 *E. coli* ET12567 / pUZ8002 を使用するが、この菌種はテトラサイクリン耐性を有し (Tet^R)、また pUZ8002 によってカナマイシン耐性 (Km^R)、クロラムフェニコール耐性 (Cml^R) を有することが知られている。すなわち、先



- | | |
|---|--------------------|
| 1. positive control (without any antibiotics) | 5. thiostrepton |
| 2. kanamycin | 6. chloramphenicol |
| 3. streptomycin | 7. apramycin |
| 4. spectinomycin | 8. tetracycline |

Fig. 61 植菌して 28°C, 4 日間培養後の各寒天培地におけるクレミマイシン生産菌の生育状況

に用いてきた破壊株作成用プラスミドでは交差耐性の問題が生じ、プラスミドを導入しても保持出来ない可能性があった。そこで新しく ReDirect 法 [67] を用いて破壊株作成用のプラスミドを構築することにした。

3.5.3 ReDirect 法による破壊株作成用プラスミドの構築

ReDirect 法とは標的遺伝子を含んだプラスミドを保持した大腸菌内で、線状遺伝子の相同組換えを促進させる λ ファージ由来の 3 つの酵素 Red α (5'-3' エキソヌクレアーゼ), Red β (一本鎖 DNA 結合タンパク質), Red γ (宿主細胞のエキソヌクレアーゼ阻害酵素) を発現させておき、そこへ標的遺伝子部分を抗生物質耐性遺伝子カセットに置換した遺伝子断片を PCR で増幅させて導入し、大腸菌内で相同組換えを生じさせて破壊株作成用プラスミドを構築する手法である。2003 年に Gust らにより発表されたこの手法は、制限酵素サイトによる制限が生じないため、比較的自由に破壊株作成用プラスミドを設計することが可能である。そのため現在、遺伝子破壊株作成用プラスミドを作成する際に一般的に用いられる手法であり、また組換え効率が非常に高いことから、コスミド遺伝子などの大きな遺伝子断片を結合し、遺伝子クラスターを再構築する研究にも応用されている [68]。本研究では *cmiM4* をほぼ中心に含む約 15 kbp の Cosmid106 *Xho* I 断片を汎用のベクター pBlueScript SK II (+) にクローニングしたもの (pBlueScript-106*Xho*I) をベースとして、ReDirect 法による *cmiM4* 破壊株作成用プラスミドを構築することにした。まず、ReDirect 法の実験の流れをまとめると Fig. 62 のようになる。

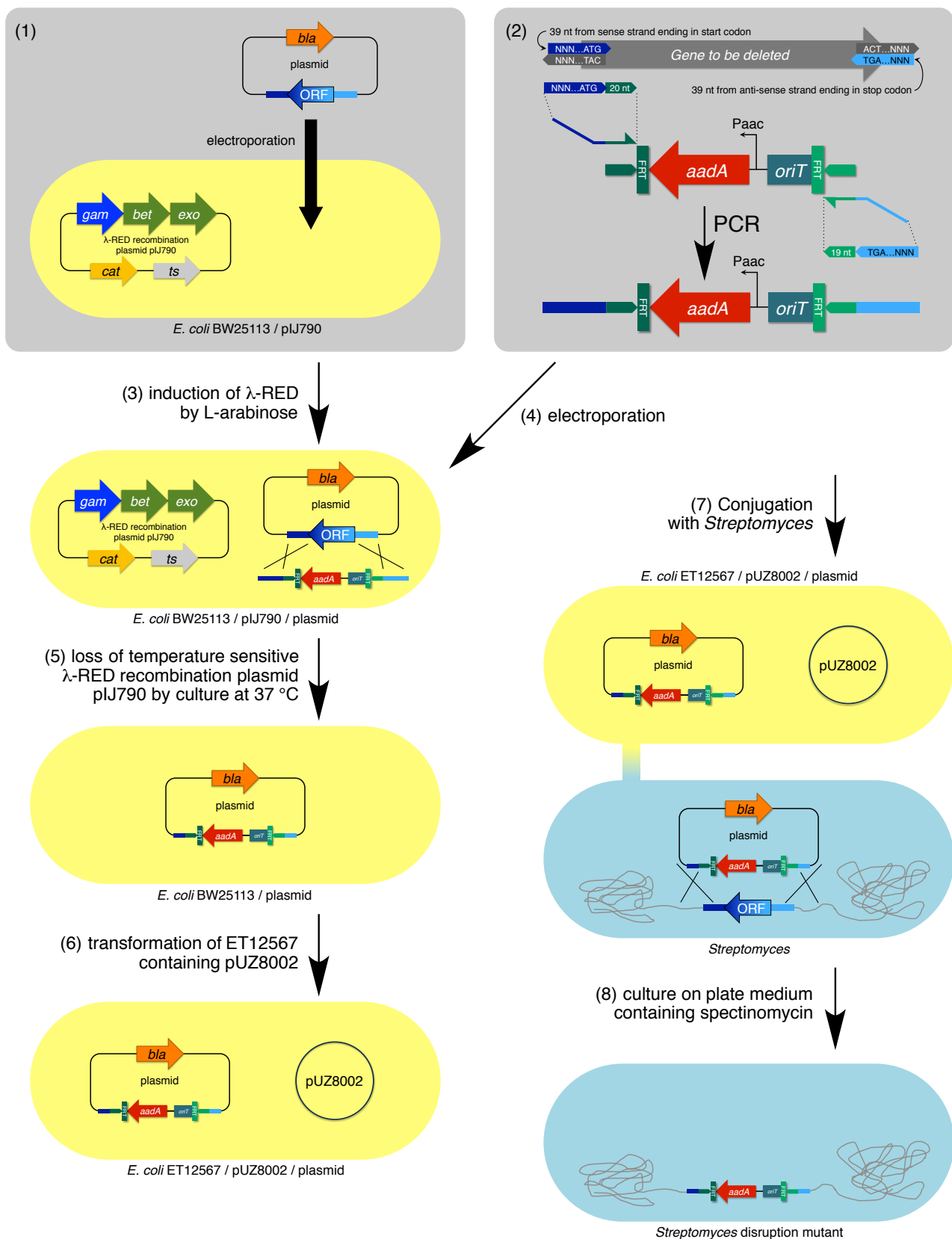


Fig. 62 ReDirect 法による遺伝子組換え (後の簡条書きと図の番号は一致している)

すなわち、

1. 相同組換えを促進させる酵素遺伝子を有するプラスミド pIJ790 を保持している大腸菌 *E. coli* BW25113 に標的遺伝子を含むプラスミドを導入する。
2. *oriT* 配列と両脇に FRT サイトを含む抗生物質耐性遺伝子マーカーを鋳型とし、標的遺伝子近傍の塩基配列を有するプライマーを用いて PCR を行う。
3. アラビノースで組換え酵素の発現を誘導して培養、エレクトロコンピテントセルを作製する。
4. PCR で得られた断片をエレクトロポレーションにて導入する。
5. 大腸菌内で標的遺伝子と抗生物質耐性マーカーの相同組換えが起こる。37 °C で培養し、温度感受性のプラスミド pIJ790 を欠損させる。
6. 組換えったプラスミドを *E. coli* ET12567 / pUZ8002 へ導入する。
7. 標的遺伝子を有する放線菌との接合を行う。
8. 抗生物質入りの培地で選択培養し、目的の表現型・遺伝子型を有する株を探索する。

本研究で行ったことを示すと Fig. 63 のようになる。まず pBlueScript-106XhoI を *E. coli* BW25113 / pIJ790 に導入し、L-アラビノース存在下で培養して組換え酵素を発現させた後、エレクトロコンピテントセルを作製した。一方プラスミド pIJ778 を制限酵素 *Hind* III, *Eco*R I で消化して得られたスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*aadA*) カセットを鋳型として、*cmiM4* 両脇 39 bp を有するプライマーを用いて PCR を行い、*cmiM4* 遺伝子をスペクチノマイシン耐性遺伝子カセットへ置換するための DNA 断片を得た。この際のプライマーには *cmiM4* 近傍の塩基配列と抗生物質耐性カセットに結合する部位の境界に制限酵素 *Hpa* I が認識するサイト (5'-GTTAAC-3') を設計しておき、遺伝子組換えが起こった後に抗生物質耐性マーカーを除去出来るようにした。これをエレクトロポレーションにて *E. coli* BW25113 / pIJ790 / pBlueScript-106XhoI へ導入し、大腸菌内で *cmiM4* 遺伝子をスペクチノマイシン耐性遺伝子カセットへ置換した (106XhoI-*aadA*)。次に抗生物質での選択培養時に煩雑になるのを防ぐために、プラスミドベクターをアンピシリン耐性遺伝子を有する pBlueScript SK II (+) から、カナマイシン耐性遺伝子を有する pET28 へ交換した。このプラスミドでは遺伝子組換え体が出来た場合、シングルクロスオーバー体とダブルクロスオーバー体の判別を付けることが出来ないため、別の抗生物質耐性マーカーを DNA 断片の外へ付加する必要があった。そこで pIJ773 からアプラマイシン耐性遺伝子 (*aac(3)IV*) を pBlueScript SK II (+) へクローニングし、得られたプラスミドと先の pET28-106XhoI-*aadA* をそれぞれ制限酵素 *Hind* III で消化してライゲーションし、アンピシリン存在下で破壊株作成用プラスミド 106XhoI-*aadA*-*Hind*III+pBlueScript-*aac(3)IV* を保持する大腸菌を選択培養、プラスミドを抽出した。

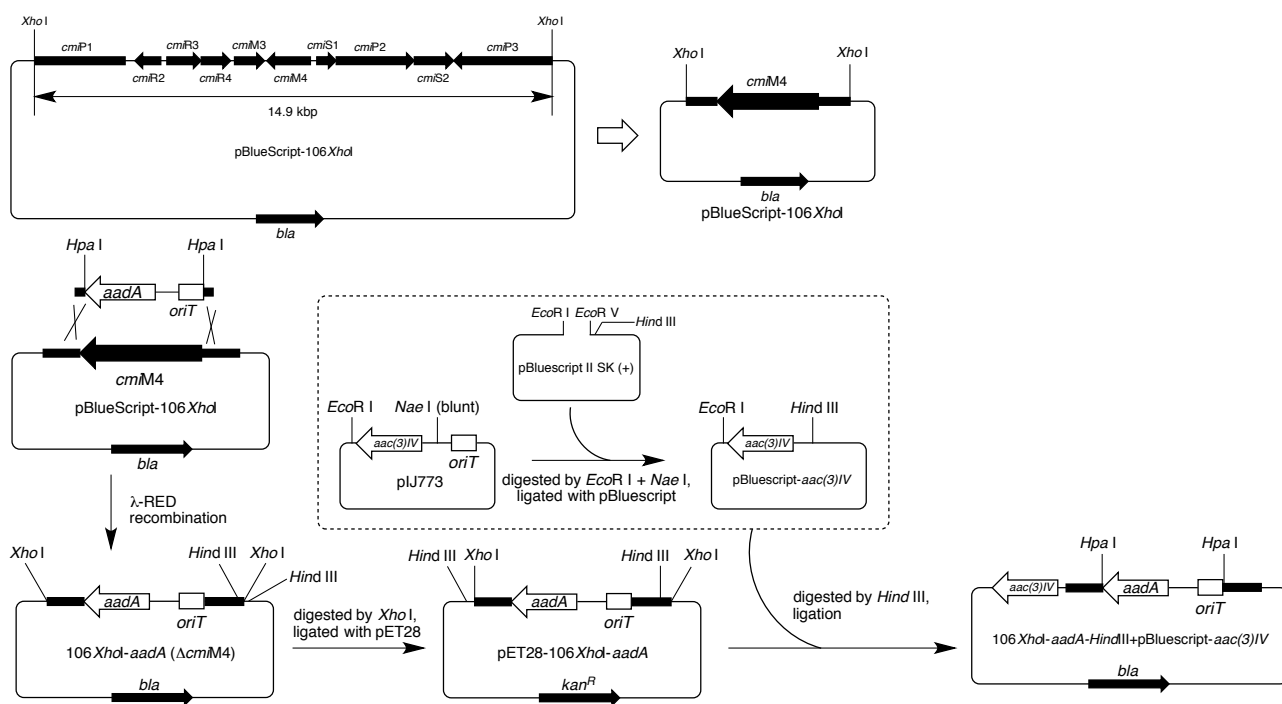


Fig. 63 ReDirect 法による *cmim4* 破壊株作成用プラスミド作製の手順

こうして得られた *cmim4* 破壊株作成用プラスミドを *E. coli* ET12567 / pUZ8002 へ導入し、クレマイシン生産菌との接合に用いた。

3.5.4 接合法による遺伝子導入条件検討

一般的な *E. coli*–*Streptomyces* 属の接合法では、一時的に熱を加えて (ヒートショック)、発芽を促した放線菌孢子懸濁液と、破壊株作成用プラスミドを保持した大腸菌の細胞数をほぼ等量に揃えて混合し、マンニトール-ソーヤ (MS) 寒天培地へ植菌、培養する。その後、遺伝子組換えがなされた放線菌のみを選択培養するため、大腸菌を含むグラム陰性菌に抗菌活性を有するナリジクス酸 (Fig. 64) 及び抗生物質耐性遺伝子カセットに応じた抗生物質を溶かした水を培地に与える。この手法により遺伝子組換え体のみが生育する。

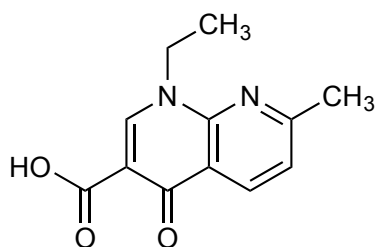


Fig. 64 ナリジクス酸の構造

しかしながら、クレマイシン生産菌の場合、上記条件での接合を何度か行ったが、全く遺伝子組換え体を得ることは出来なかった。また抗生物質添加後 10 日以上培養すると、ナリジクス酸

に耐性を持った大腸菌が生育してしまった。

そこで、上記条件とは異なる手法で異種接合による遺伝子組換えに成功した文献をまとめたところ、Table 6 のようになった。

Table 6 異種接合による遺伝子組換え条件を検討した報告例

	vector	strain	heat shock	medium	MgCl ₂	ratio (donor : recipient)	Ref.
0.*	SuperCos 1	<i>S. coelicolor</i>	50 °C, 10 min.	MS	10 mM	1 : 1	[67]
1.	pSET152	<i>K. setae</i>	no effect	ISP4	30 mM	250 : 1	[69]
2.	pSET152	<i>S. natalensis</i>	45 °C, 10 min.	MS	10 mM	3 : 1	[70]
3.	pSET152	<i>A. teichomyceticus</i>	no effect	MS, ISP4	40 mM	1250 : 1	[71]
4.	pSET152	<i>S. ipomoeae</i>	50 °C, 10 min.	MS, ISP4	20 mM	44 : 1	[72]
5.	pSET152 derivative	<i>S. pristinaespiralis</i>	50 °C, 10 min.	MS, ISP4	30 mM	125 : 1	[73]
6.	pSET152	<i>N. sp. ATCC 39727</i>	n.d.	V0.1	10 mM	1 : 1	[74]
7.	pIJ8600, pIJ8655	<i>S. rimosus</i>	40 °C, 10 min.	TSA (Oxoid)	10 mM	n.d.	[75]

* ReDirect 法での通常のプロトコル

これらの報告から類推すると、接合時に使用する培地は比較的貧栄養のものを用いており、MgCl₂ の添加は必須であると思われる。また常法で遺伝子伝達がうまく行われなかった場合には、大腸菌の細胞数を放線菌に対して過剰量加えると改善することが予想出来た。そこでこれらを参考に再度接合法による遺伝子伝達の検討を行った。

まず接合に用いるクレミマイシン生産菌の孢子懸濁液を調製するための培地の検討を行った。今まで最も簡便に孢子を得ることの出来た培地は ISP2 寒天培地であったが、MS, SK2, ベネット, V0.1, YS の各寒天培地に植菌し、その生育を観察した。しかし、何れにおいても ISP2 よりも孢子形成が効率よく行われることは無く、結局孢子懸濁液は ISP2 培地から得られる孢子から調製することにした。

次に接合条件の検討を行った。放線菌のヒートショック時間を 10 分から 5 分に短縮し、またヒートショックを行っていない孢子懸濁液も試験した。大腸菌と放線菌の細胞数の比率は 10 : 1 – 2 : 1 まで変化させた。また接合時の培地を 6 種類使用し、それぞれスペクチノマイシン耐性を有するコロニーが生育してくるかを観察した (Fig. 66)。

その結果、ヒートショックを行った孢子懸濁液に対して大腸菌を過剰量混合し (Table 7)、MS 培地上で接合を行うと、スペクチノマイシン耐性を示す放線菌コロニーが多く得られることが分かった (Table 8)。この条件で得られたコロニーは、スペクチノマイシンを含む ISP2 寒天培地とスペクチノマイシンとアプラマイシンを含む ISP2 培地の双方に植菌し、ダブルクロスオーバーが起こった遺伝子組換え体をスクリーニングした。

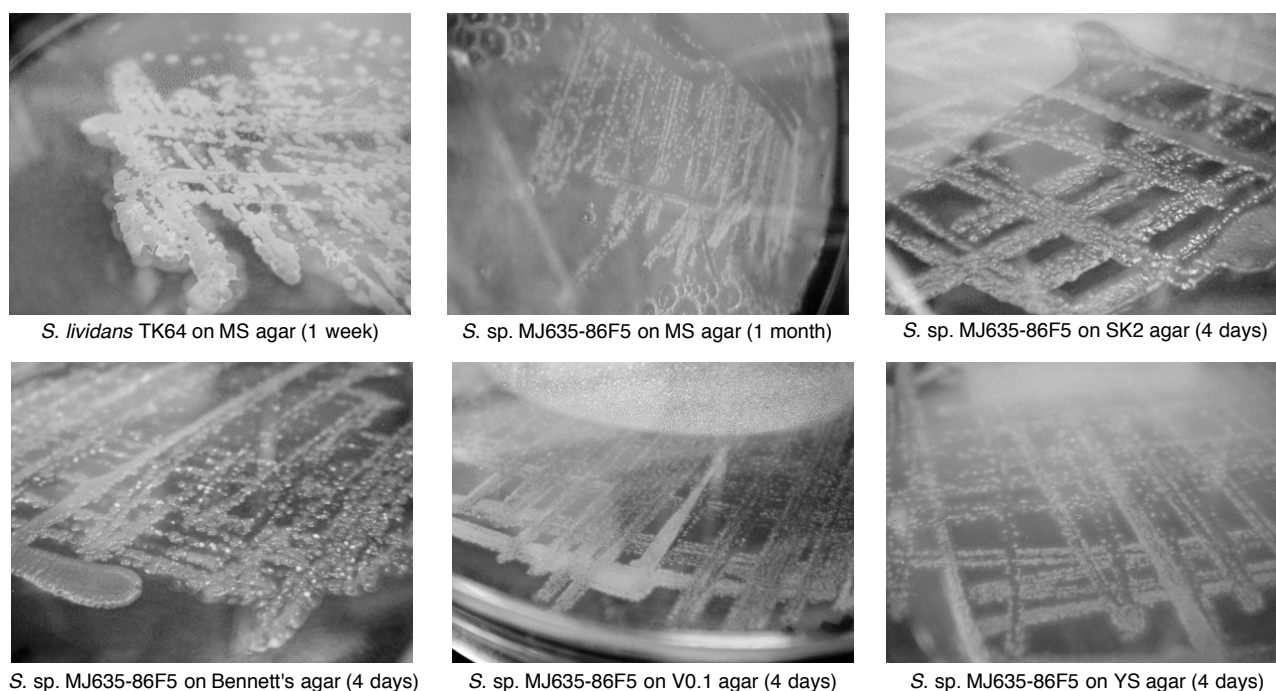


Fig. 65 各寒天培地におけるクレマイシン生産菌の生育の様子 (左上は比較のため *S. lividans* TK64 を MS 寒天培地に植菌したもの)

Table 7 ヒートショックと細胞数の比率の影響

CFU of recipient spores	Transconjugation frequency	
	CFU of <i>E. coli</i> donor cells	
	5×10^7	5×10^8
10^8	×	×
10^8 (heat shock)	×	1.2×10^{-7}
10^9	×	—
10^9 (heat shock)	×	—

3.5.5 遺伝子破壊株の遺伝子型の確認

スペクチノマイシン耐性 (Spec^R), アプラマイシン感受性 (Apra^S) を示すコロニーは 9 個得られ、まずこれらの遺伝子型をコロニー PCR で解析した。先に設計した抗生物質耐性遺伝子カセット増幅用のプライマー、*cmiM4* 増幅用のプライマー、またコントロールとして糖転移酵素遺伝子 *cmiM5* 増幅用のプライマーを使用してそれぞれ PCR を行ったところ、3 つのコロニーにおいて明確な遺伝子断片増幅の応答があった (Fig. 67)。すなわち抗生物質耐性遺伝子カセットは増幅され、*cmiM4* 遺伝子は全く増幅されなかった。また *cmiM5* 遺伝子は増幅されたのでクレマイシン生

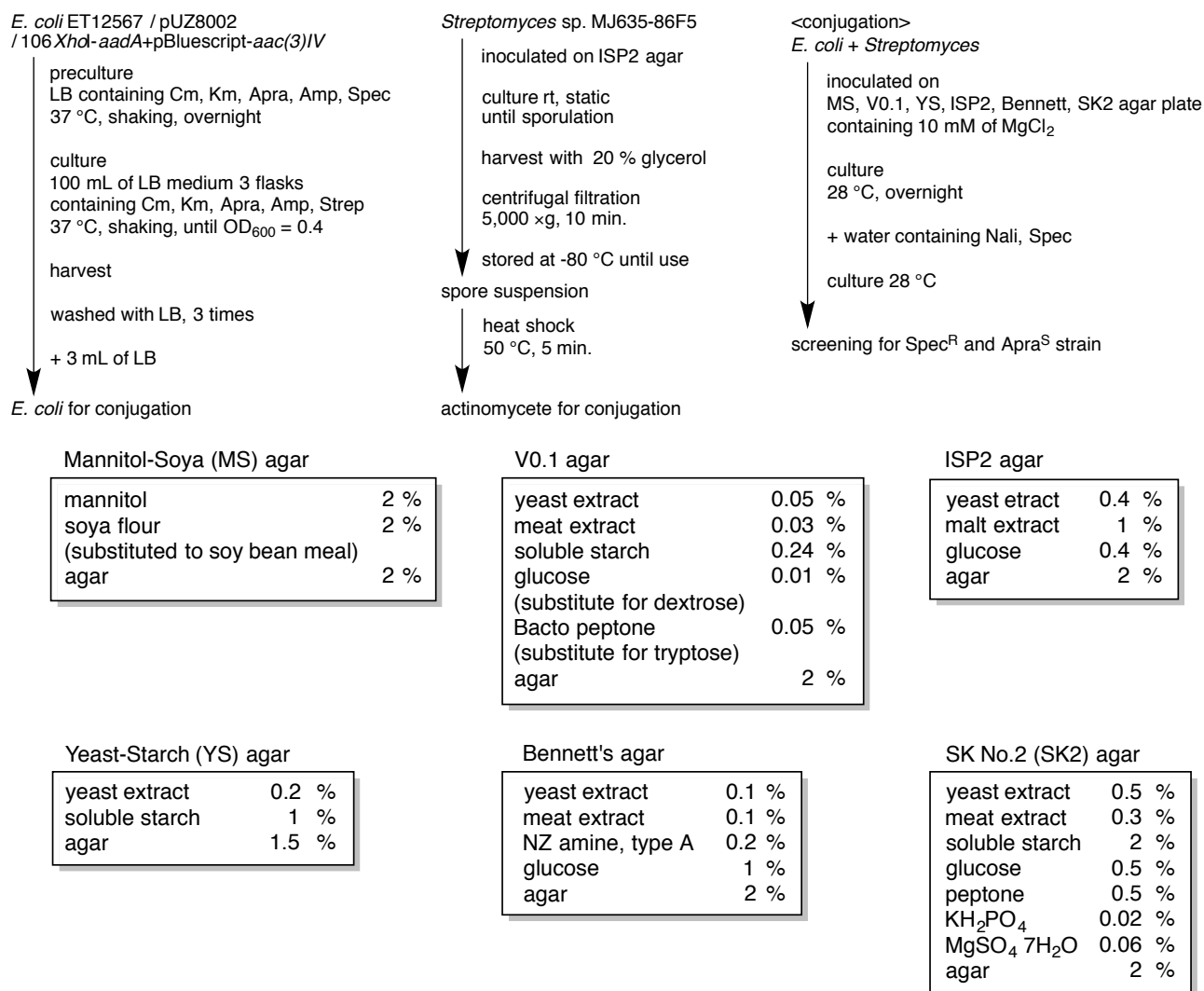


Fig. 66 接合法の実験手順と検討に用いた培地の組成

Table 8 接合時の培地の影響

Medium	Spec ^R Colonies	Transconjugation Frequency *
MS	> 64	> 7.1 × 10 ⁻⁷
YS	n.d.	n.d.
V0.1	> 16	> 1.8 × 10 ⁻⁷
ISP2	n.d.	n.d.
Bennett	n.d.	n.d.
SK2	n.d.	n.d.

* *E. coli* : *Streptomyces* = 10 : 1

産菌の遺伝子組換え体であることを確認した。よってこれら 3 つの菌株をスクリーニングした時の番号から $\Delta cmiM4$ -1, 3, 8 と名付け、さらに解析を行った。

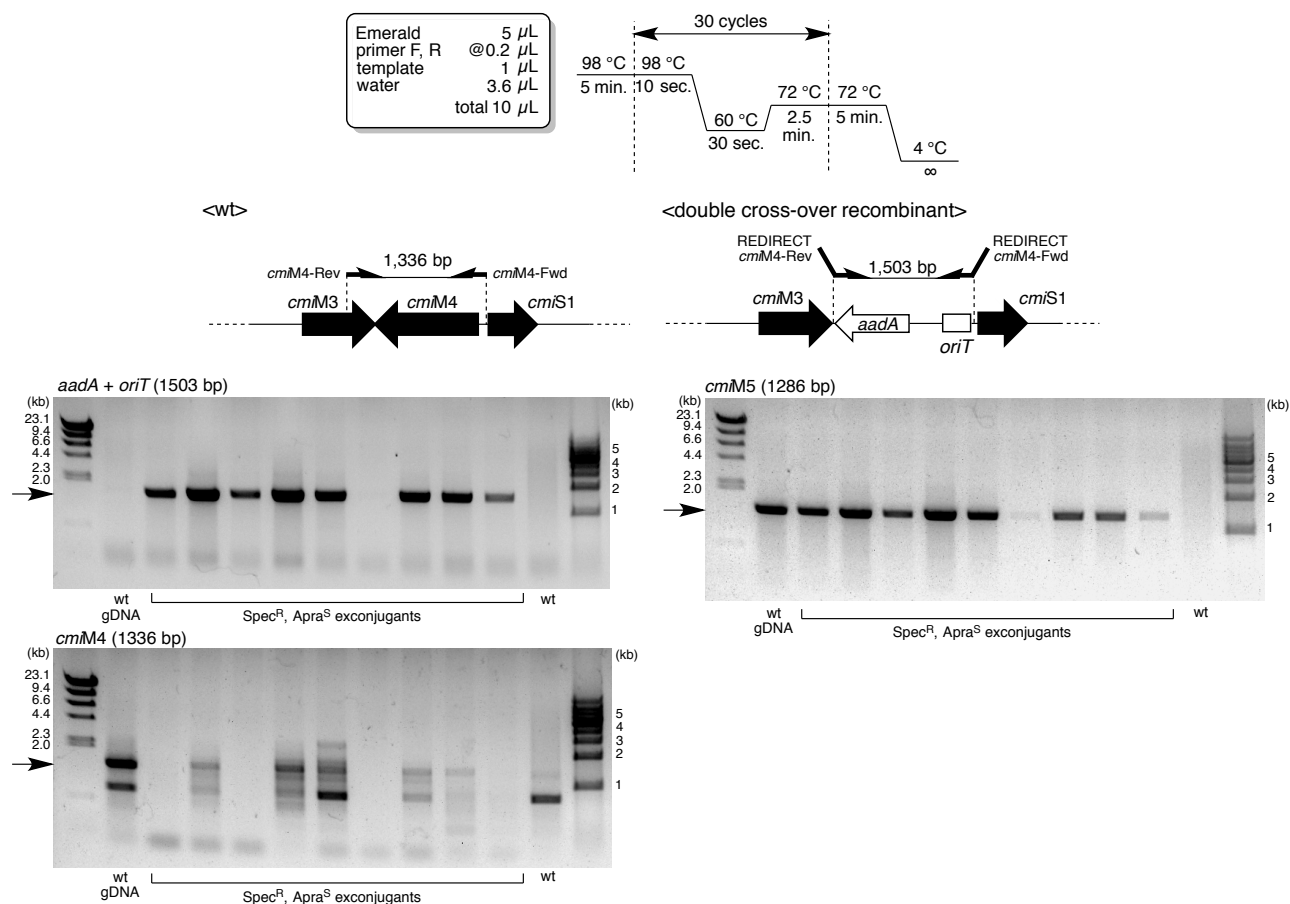


Fig. 67 スペクチノマイシン耐性、アプラマイシン感受性を示した放線菌コロニーの PCR による解析

3 つの菌株をそれぞれ培養し、ゲノム DNA を抽出した。これを用いて再度 PCR を行ったところコロニー PCR と同じ応答を示した (Fig. 68)。次に抗生物質耐性遺伝子カセットがクレミマイシン生産菌染色体ゲノム DNA 上、*cmiM4* の位置に適切に挿入されたかどうかを確認するため、サザンハイブリダイゼーションを行った。各々のゲノム DNA を制限酵素 *Mlu* I のみ、もしくは *Mlu* I と *Hpa* I を用いて完全消化し、アガロースゲル電気泳動によって DNA 断片を分離した。これをメンブレンに転写、*cmiM4* 下流に存在する *cmiS1* 遺伝子を標識 DNA とし、サザンハイブリダイゼーションを行った。すると野生株では *cmiM4* 近傍に *Hpa* I サイトが存在しないため何れの制限酵素処理断片においても約 6.4 kb の断片が発色したが、3 つの *cmiM4* 破壊株では破壊株作成用プラスミドを構築するプライマーに設計した *Hpa* I サイトが存在しているため、*Mlu* I 消化のみでは 6.4 kb の断片に、*Mlu* I, *Hpa* I, 2 つの制限酵素で消化したものでは約 2.4 kb の断片が発色した。この結果より 3 つの遺伝子破壊株は全て *cmiM4* の位置に抗生物質耐性遺伝子カセットが置換されたダブルクロスオーバーの遺伝子組換え体であるということを示すことが出来た (Fig. 69)。

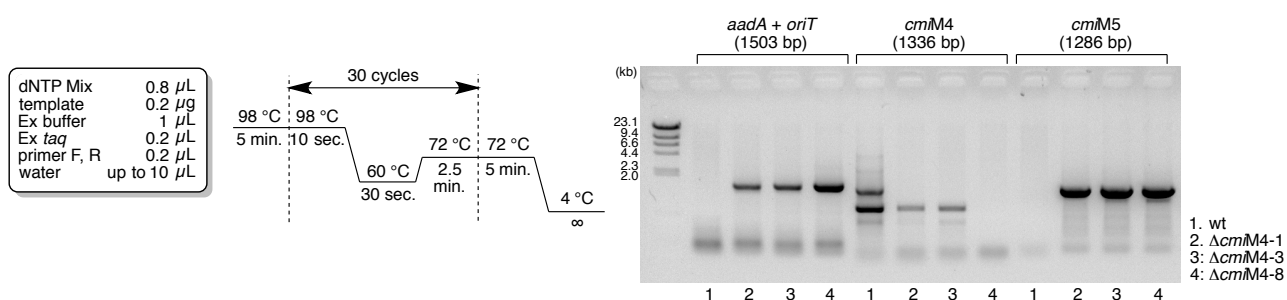


Fig. 68 $\Delta cmIM4$ -1, 3, 8 から抽出した gDNA を鋳型として行った PCR

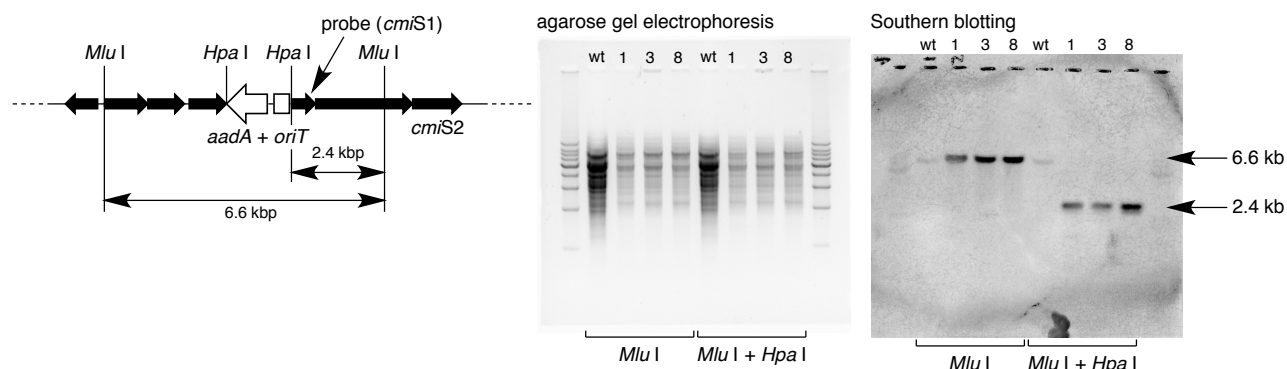


Fig. 69 $\Delta cmIM4$ -1, 3, 8 のサザンハイブリダイゼーション

3.5.6 遺伝子破壊株培養抽出物の解析

最後にこれら *cmiM4* 破壊株をクレミマイシン生産菌野生株と同じ手法で前培養・本培養し、得られた菌体からクレミマイシンを抽出してくる時と同じ手法で抽出した。得られた培養抽出物を水洗せずにそのままフィルター濾過し、LC/MS で解析した。その結果、クレミマイシンを検出することは出来ず、生産能を完全に失っていることがわかった。しかし、他のピークについて UV 吸収の極大値を調べたところ、クレミマイシンと同じ極大値 300 nm を示すピークは存在せず、250 nm 以下に極大を持つ夾雑物が少量得られるにとどまった。すなわち、*cmiM4* を破壊することによって、クレミマイシン生合成中間体を取得することは出来なかったが、クレミマイシン生産能を失わせることに成功し、得られた遺伝子クラスターがクレミマイシン生合成に関わることを実証することが出来た (Fig. 70)。

Streptomyces sp. MJ635-86F5 $\Delta cmM4$ mutant

preculture
100 mL, 2 flasks
+ Spec, Nali

30 °C, 200 rpm
4 days

Tryptone	0.85 %
Soytone	0.15 %
NaCl	0.25 %
KH ₂ PO ₄	0.125 %
D-glucose	2 %
pH 7.3	

culture 100 mL,
12 flasks

27 °C, 200 rpm
3 weeks

0.3× BPS medium (modified)

D-glucose	1 %
oatmeal	0.9 %
malt extract	0.15 %
yeast extract	0.09 %
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.012 %
NaCl	0.03 %
CaCO ₃	0.15 %
soluble starch	0.9 %
MOPS	1.1 %
propionate	0.5 %
pH 7	

wet cells

+ 200 mL of CHCl₃ : MeOH = 1 : 1
rt, overnight

filtration and concentration

+ 200 mL of MeOH : hexane = 1 : 1
concentration of MeOH layer

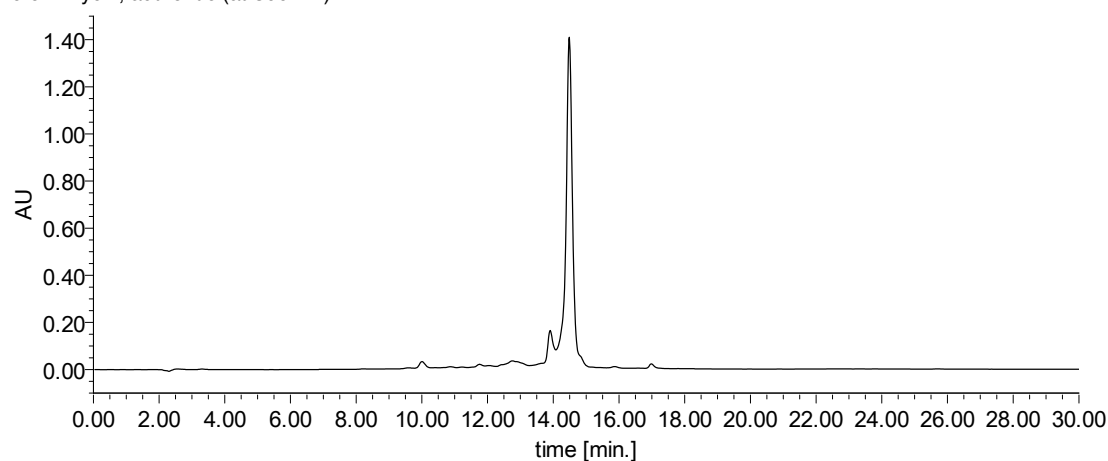
+ 100 mL of CHCl₃ : MeOH = 4 : 1

concentration

PDA analysis

phenomenex Luna 3u C18(2) 100A, 150 × 4.6 mm
30 % CH₃CN (0 min.) → 100 % CH₃CN (20 min.)
0.01 % TFA, linear gradient, 40 °C

cremimycin, authentic (at 300 nm)



extract from $\Delta cmM4$ mutant (at 300 nm)

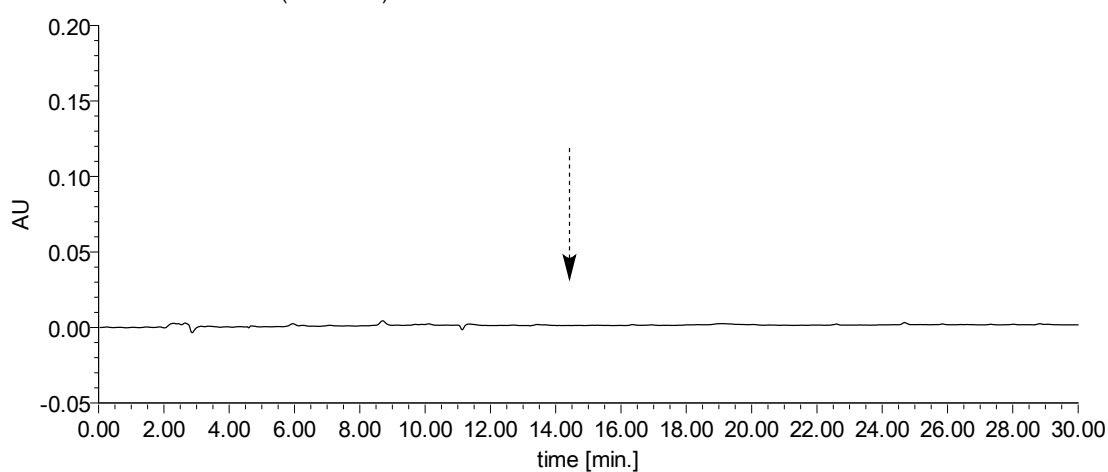


Fig. 70 $\Delta cmM4$ 破壊株培養抽出物の PDA による解析

3.6 まとめ

本章ではクレミマイシンの生合成経路を酵素・遺伝子レベルで解明するため、クレミマイシン生産菌 *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 からジデオキシヘキソース合成酵素群に含まれる 2,3-デヒドラターゼ, 4,6-デヒドラターゼ遺伝子を手掛かりにして遺伝子クラスターの探索を行った。その結果、クレミマイシン生産菌染色体ゲノム DNA 上約 95 kb の領域に *cmi* クラスターを見出した。この遺伝子クラスターには β -アミノ酸含有型ポリケチド化合物の生合成酵素遺伝子に共通して見られる遺伝子群が存在していた。また、そのクラスターの構成は Fig. 71 で示すように BE-14106 生合成に関わる *bec* クラスターや、ML-449 生合成に関わる *mia* クラスターと類似性が見出された。

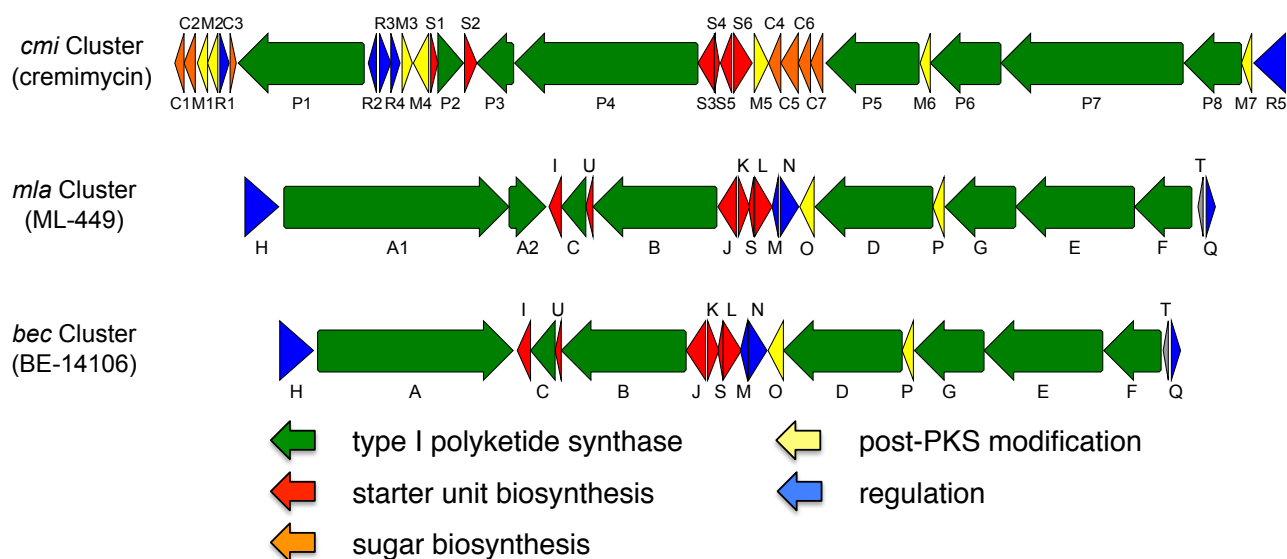


Fig. 71 *cmi*, *mia*, *bec* クラスターの比較

Table 9 *cmi*, *mia*, *bec* クラスターにおける相同性のある遺伝子

cremimycin	ML-449	BE-14106	Proposed Function
<i>cmiR1</i>	<i>miaQ</i>	<i>becQ</i>	type II TE
<i>cmiP1</i>	<i>miaB</i>	<i>becB</i>	type I PKS
<i>cmiR2</i>	<i>miaM</i>	<i>becM</i>	TetR-type transcriptional regulator
<i>cmiM4</i>	<i>miaO</i>	<i>becO</i>	P450 monooxygenase
<i>cmiS1</i>	<i>miaU</i>	<i>becU</i>	fatty acyl-CoA thioesterase
<i>cmiP2</i>	<i>miaC</i>	<i>becC</i>	type I PKS (truncated)
<i>cmiS2</i>	<i>miaI</i>	<i>becI</i>	FAD-dependent glycine oxidase
<i>cmiP3</i>	<i>miaA2</i>	(<i>becA</i>)	type I PKS (truncated)
<i>cmiP4</i>	<i>miaA1</i>	(<i>becA</i>)	type I PKS
<i>cmiS3</i>	<i>miaL</i>	<i>becL</i>	amino group protection
<i>cmiS4</i>	<i>miaS</i>	<i>becS</i>	acyl carrier protein
<i>cmiS5</i>	<i>miaK</i>	<i>becK</i>	acyltransferase
<i>cmiS6</i>	<i>miaJ</i>	<i>becJ</i>	adenylation and loading to ACP
<i>cmiP5</i>	<i>miaD</i>	<i>becD</i>	type I PKS
<i>cmiM6</i>	<i>miaP</i>	<i>becP</i>	deprotection of β -amino acid moiety
<i>cmiP6</i>	<i>miaG</i>	<i>becG</i>	type I PKS
<i>cmiP7</i>	<i>miaE</i>	<i>becE</i>	type I PKS
<i>cmiP8</i>	<i>miaF</i>	<i>becF</i>	type I PKS
<i>cmiR5</i>	<i>miaH</i>	<i>becH</i>	LuxR-type transcriptional regulator

3つのクラスターにおいて相同性のある遺伝子をまとめると Table 9 のようになる。アルキル側鎖を有する β -アミノ酸開始基質の構築に関わるのは、*cmi* クラスターでは *cmi*P2, P3, P4, S2 の四つであり、これらと各々高い相同性を有し、同じ機能を持つと考えられる酵素をコードしている遺伝子が *mia* 及び *bec* クラスター上にも同じ並び方で配置されている (*mia*A1, A2, I, C と *bec*A, I, C)。また開始基質構築後、アミノ基への修飾反応及びアグリコンを構築する PKS へのアシル基転移反応を触媒する酵素群をコードしている遺伝子群はクラスターのほぼ中央に同じような並び方で配置されているのも分かる (*cmi*S3–S6 と、*bec*JKSL, *mia*JKSL)。更にアグリコン構築に関わる PKS 遺伝子及び最後に脱保護を行う酵素遺伝子においてもその配置はほぼ同一であった (*cmi*P1, *mia*B, *bec*B と、*cmi*P5, M6, P6-P8 と *bec*DPGEF, *mia*DPGEF)。他にも遺伝子発現に関わると考えられる転写因子 (*cmi*R5, *mia*H, *bec*H)、P450 酵素遺伝子 (*cmi*M4, *mia*O, *bec*O)、II 型チオエステラーゼ遺伝子 (*cmi*R1, *mia*Q, *bec*Q) 等、相同性の高い遺伝子が共通して見られる。このような類似性から判断すると、これら 3つの β -アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質生合成遺伝子には、祖先となる共通の遺伝子クラスターが存在し、分化することによって独自構造を持ったポリケチド生合成遺伝子クラスターになったと考えられる。また PLP 依存型アミノ基転移酵素をコードする遺伝子が存在しておらず、代わりに FAD 依存型グリシン酸化酵素をコードする遺伝子 *cmi*S2, *mia*I, *bec*I がクラスター内に存在しているのもこれら 3つのクラスターに共通して見られる特徴である。

また、この *cmi* クラスターがクレミマイシン生合成に関わることを実証するため、*cmi*M4 遺伝子破壊株実験を行った。その結果、*cmi*M4 遺伝子をスペクチノマイシン耐性遺伝子に置換した株の作成に成功した。この遺伝子破壊株はクレミマイシン生合成能を完全に失ったため、*cmi* クラスターがクレミマイシン生合成に関わることを確かめることが出来た。しかし、この実験を行うことで期待されたクレミマイシン生合成中間体の取得は成し得ることが出来なかった。これは *cmi*M4 遺伝子をまるごとスペクチノマイシン耐性遺伝子に置換してしまったために、周辺の酵素遺伝子の転写が正常に行われなくなってしまった(極性効果)、もしくは CmiM4 による酸化反応がポリケチド伸長反応の途中で行われており、生合成中間体が PKS 上で蓄積してしまい、以降の生合成が進行しなくなってしまったことを示唆している。これを検証するためにはリアルタイム PCR で *cmi*M4 以外のクレミマイシン生合成遺伝子が正しく転写されているかを確認する、もしくは CmiM4 自身の酵素機能解析を行うことが必要であると考えられる。

本章序盤で掲げたクレミマイシン開始基質の窒素原子導入機構に関する知見は結局のところ遺伝子解析では解明することが出来なかったが、BE-14106 や ML-449 の生合成遺伝子と同様に FAD 依存型グリシン酸化酵素がアミノ基転移反応に関わっていることが示唆された。そこでクレミマイシン開始基質アミノ基転移反応の解明を目指し、CmiS2 の機能解析を中心とした研究に着手することにした。

第4章 開始基質におけるアミノ基導入機構の解明

4.1 序

第3章で示したようにクレマイシン生合成遺伝子クラスターには、開始基質である 3-アミノノナン酸を構築するための PKS, アグリコン骨格を構築するための PKS, シマロース部分を構築するためのジデオキシ糖生合成酵素群をコードする遺伝子が存在していた。また他の β -アミノ酸含有型マクロラクタム生合成遺伝子と同様、*cmi* クラスター中には開始基質をアグリコン骨格を構築する PKS にロードするための一連の酵素遺伝子が存在していた。以上については、既に一般的な見解であるとともに、実際にこれらの酵素を発現させ、機能解析を行ったという報告も存在する。しかし、クレマイシン開始基質生合成におけるアミノ基導入機構については殆ど知見が得られていない。先に述べたようにクレマイシンと類似した構造の開始基質を有する BE-14106 や ML-449 においてはその生合成遺伝子クラスターは取得され、開始基質のアミノ化に関する研究も行われている [24,25]。

Jørgensen らが BE-14106 開始基質生合成においてアミノ基転移反応に関与するとし、酵素機能解析の対象としたのは FAD 依存型グリシン酸化酵素と相同性の高かった BecI である。そして *cmi* クラスター中にもこの酵素と非常に相同性の高い酵素 CmiS2 が存在する。

グリシン酸化酵素は、D-アミノ酸酸化酵素のグループに属する酵素の 1 つである。その名の通りグリシンを酸化し、生じたイミンが加水分解されることによってグリオキシル酸とアンモニアが生成されることが知られている。また基質特異性は比較的低く、D-アラニン等に対しても触媒活性を示す。その触媒機構は Fig. 72 のように提唱されている。すなわち酵素内に保持された FAD がアミノ基の結合したメチレンのヒドリドを引き抜きグリシンを酸化する。これにより生じたイミンは非酵素的に水分子による求核攻撃を受けてグリオキシル酸とアンモニアへ変換されると考えられている。一方ヒドリドによって還元された FAD は溶存酸素を用いて自己酸化し、元の酸化型へと戻る。

このような反応機構を有するグリシン酸化酵素のうち、最も研究されているものはチアミン生合成経路中に存在する ThiO である。現在までに *Bacillus* 属や *Geobacillus* 属由来の ThiO について機能解析が行われている [76–87] が、これらがアミノ基転移反応に関わるという報告は今までになされていない。しかしクレマイシン開始基質前駆体の炭素原子は全て酢酸、プロピオン酸ユニットから構成されているという実験的事実 [88] と、*cmi* クラスター中にアミノ基転移酵素と相同性を有する酵素遺伝子が存在せず、Jørgensen らがアミノ基導入に関わると予想した BecI に相同性を持つ CmiS2 がクレマイシン生合成遺伝子クラスター中に存在したことから、この酵素がアミノ基導入に関わる可能性が考えられた。

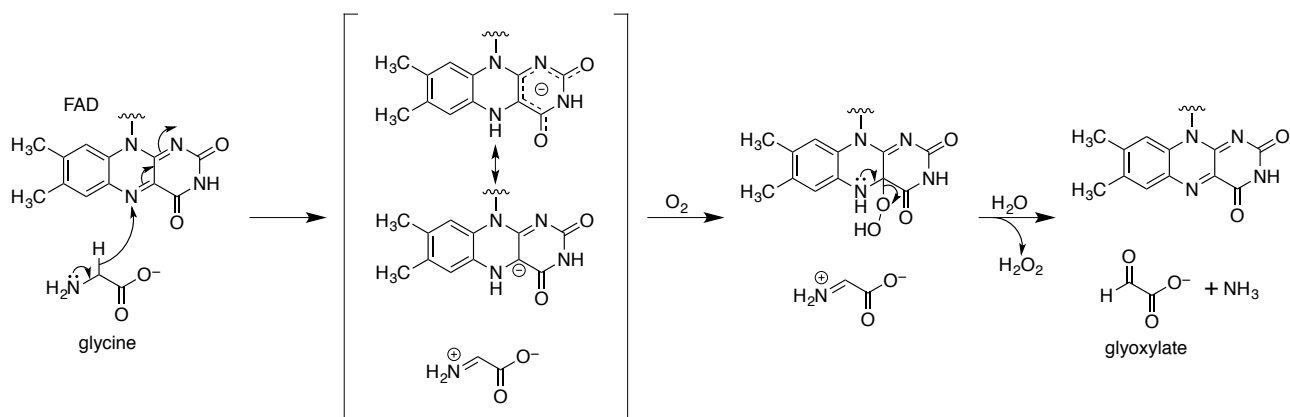


Fig. 72 グリシン酸化酵素の触媒メカニズム [76]

そこで、この非常に興味深いアミノ基転移反応に関わると予想した CmiS2 を実際に発現させて *in vitro* での機能解析を行うことを目的とし、本章の研究に着手した。

4.2 酵素発現系の構築

cmiS2 は第 3 章で獲得したコスミド遺伝子をテンプレートとし、PCR にて増幅した。得られた DNA 断片を制限酵素 *EcoR* V と脱リン酸化酵素で処理したクローニングベクター pBlueScript SK II (+) にクローニングした。そして、大腸菌内で N 末にヒスチジントグを融合させた酵素として大量発現させるため、プラスミドベクターを pCold I に交換した。これらをそれぞれ酵素発現用大腸菌 *E. coli* BL21 (DE3) へと導入し、酵素発現系とした (Fig. 73)。

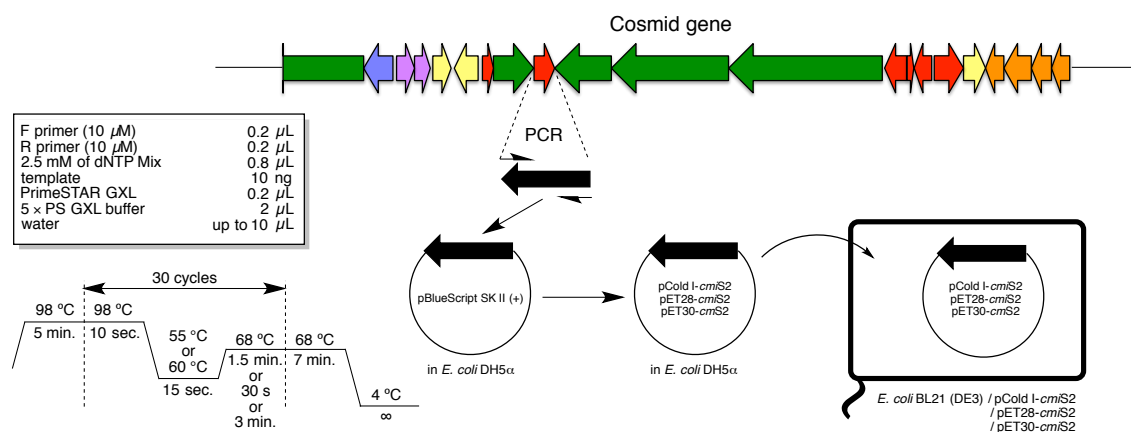


Fig. 73 *cmiS2* 酵素発現系の構築

しかし、種々検討を行っても、十分な量の可溶化した CmiS2 を得ることが出来なかった。これは N 末のヒスチジントグがタンパクの可溶化に影響している可能性があると考えた。そのため pET30 へのクローニングも行い、C 末にヒスチジントグを融合したタンパクとして発現させることも検討した。さらに大腸菌内での酵素発現に最適化された人工遺伝子を用いた CmiS2 発

現系をも構築した (Fig. 74)。以上得られた発現系を用いて CmiS2 を発現させ、SDS-PAGE で解析を行うと、以下のような結果が得られた。

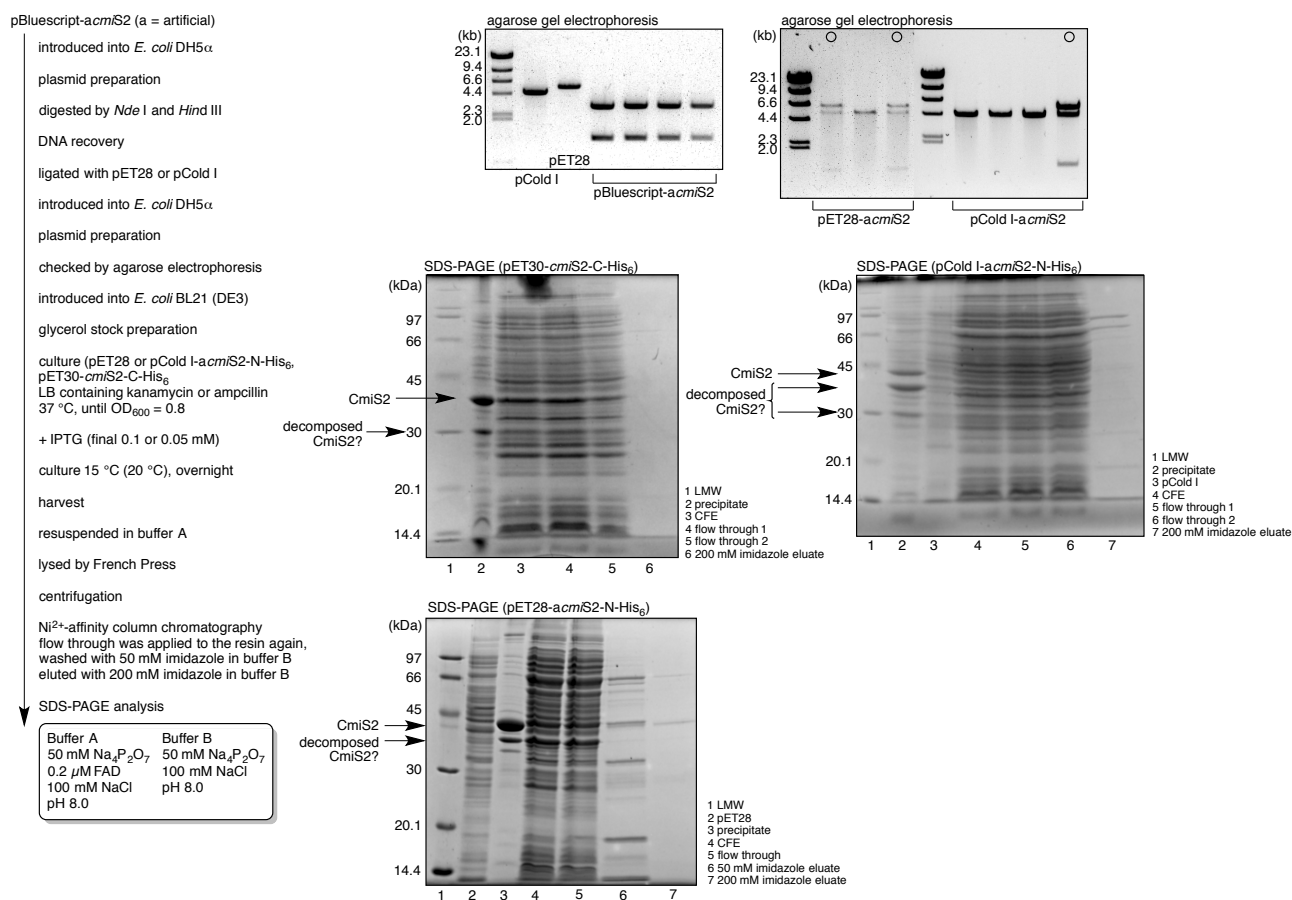


Fig. 74 人工遺伝子を用いた CmiS2 発現系の構築と C 末ヒスチジインタグ融合タンパクとして得るための CmiS2 発現系の構築

1. C 末ヒスチジインタグ融合タンパク質を発現させた場合、SDS-PAGE 上で予想したタンパクの大きさ (41 kDa) よりも小さい値を示す部分にバンドが現れた。
2. pCold I で発現系を構築し、低温で長時間培養した場合、目的タンパクより小さなバンドが確認出来た。
3. pET28 で発現系を構築した際には pCold I で構築した時よりも小さなバンドは出現しにくくなった。

これは CmiS2 が発現された後、長時間大腸菌内に存在することによって細胞内のプロテアーゼ等の酵素により N 末部分が切断され、小さなタンパクになってしまったことを示唆する結果であった。他のグリシン酸化酵素においても同様の観測がなされており、そのような場合、N 末にベクター由来のアミノ酸配列 (ヒスチジインタグを含む) が多めに存在する条件で発現系を構築しておき、低濃度の IPTG で発現誘導し (0.05 mM 程度)、37 °C のまま短時間培養することで可溶化し

たグリシン酸化酵素が得られている [89]。そこで CmiS2 に対しても同様の条件で培養し、タンパク可溶性の改善につながるかを検討した。

Table 10 CmiS2 培養条件 (*cmiS2* の前の “a” は人工遺伝子であることを示す。)

Entry	Plasmid	temperature & time	IPTG	additive	result
1	pET28- <i>acmiS2</i> (N-His)	37 → 15 °C, 15–20 hrs	0.1 mM	none	slightly soluble, decomposed
2	pColdI- <i>acmiS2</i> (N-His)	37 → 15 °C, 15–20 hrs	0.1 mM	none	slightly soluble, decomposed
3	pET30- <i>cmiS2</i> (C-His)	37 → 15 °C, 15–20 hrs	0.1 mM	none	decomposed
4	pET28- <i>acmiS2</i> (N-His)	37 °C, 4–5 hrs	0.05 mM	none	reasonably soluble
5	pET28- <i>acmiS2</i> (N-His)	37 °C, 4–5 hrs	0.05 mM	FMN	reasonably soluble
6	pET30- <i>cmiS2</i> /pGro7	37 °C, 4–5 hrs	0.05 mM	none	reasonably soluble
7	pET28- <i>acmiS2</i> /pGro7	37 °C, 4–5 hrs	0.05 mM	FAD	reasonably soluble (the best of them)

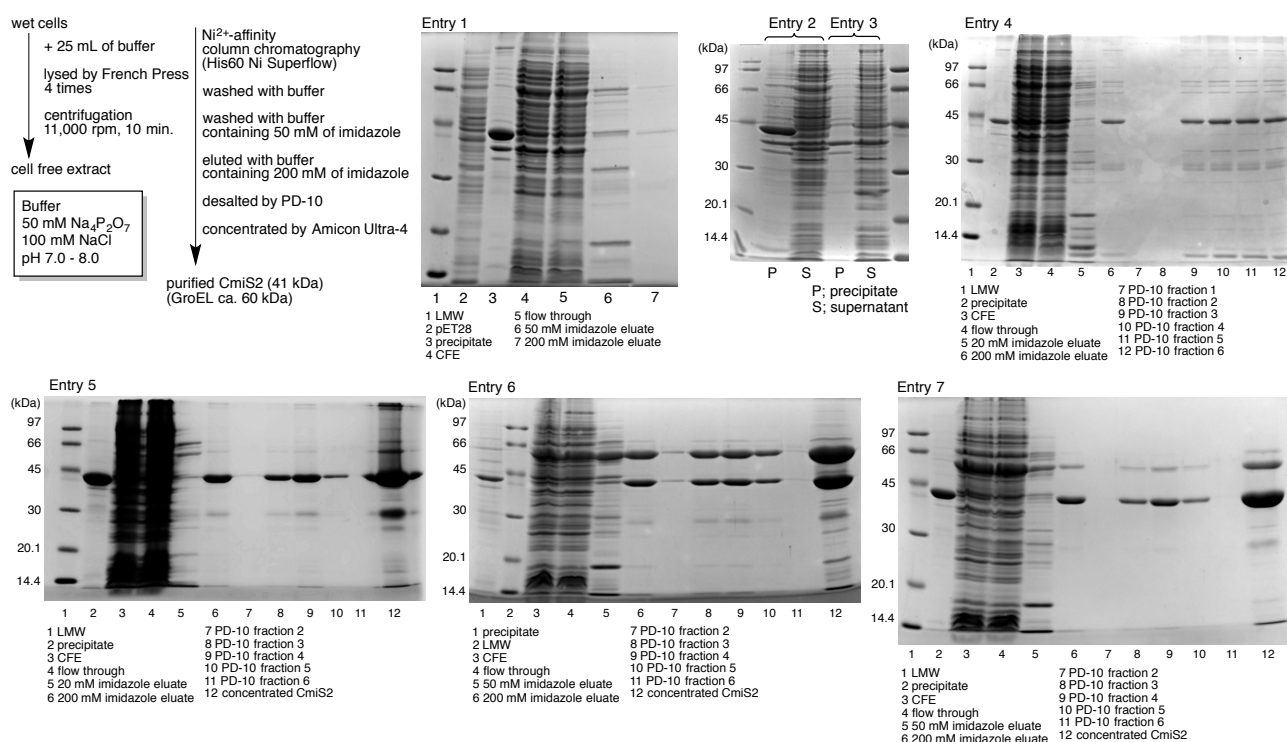


Fig. 75 CmiS2 培養条件の検討

すると僅かではあるが、可溶化した CmiS2 を得ることが出来た (Fig. 75)。さらに種々検討を行った結果、人工遺伝子の *cmiS2* を pET28 にクローニングして発現系を構築し、シャペロンタンパクである GroEL/ES と共発現させた場合に CmiS2 は最も可溶化した。精製の際、樹脂、もしくは CmiS2 に非特異的に吸着してしまった GroEL は、2.5 mM の ATP を加えた緩衝液で洗浄することにより取り除くことが出来た (Fig. 76)。

また、同様にしてクレミマイシン開始基質生合成に関わると予想される CmiS1, CmiS3, CmiS4, CmiS5, CmiS6, CmiM6 についても各々 pCold I を用いて大量発現用のプラスミドを構築した。

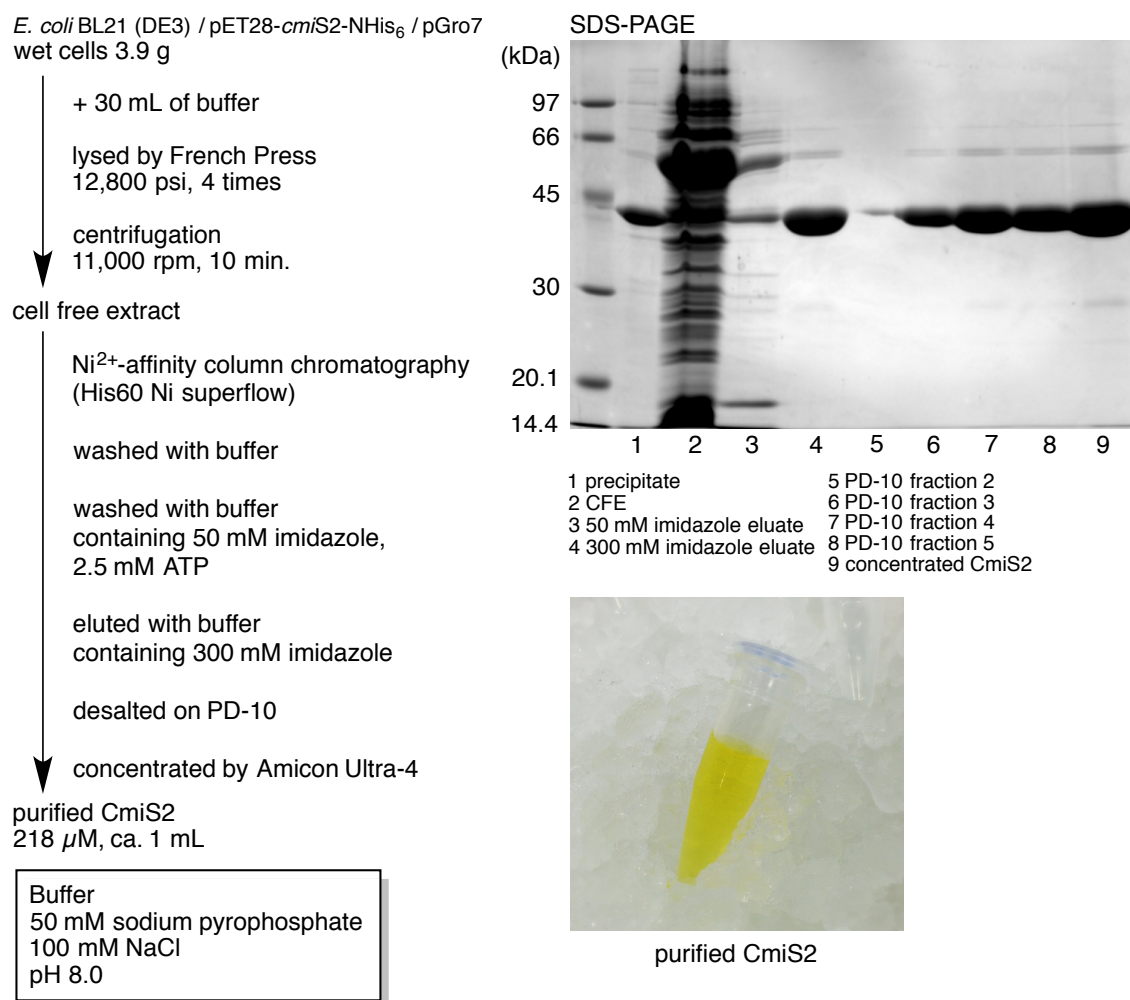


Fig. 76 CmiS2 の発現・精製

4.3 グリシン酸化活性の検出

まず CmiS2 が BecI と同様にグリシンの酸化活性を有するか、ペルオキシダーゼアッセイによって評価することにした。FAD 依存型グリシン酸化酵素はその反応の過程で FADH₂ が酸化される時に過酸化水素を生成することが知られている。そこでこの過酸化水素とペルオキシダーゼを用いて、4-アミノアンチピリンとフェノールから 510 nm に極大吸収を有するキノンイミンを生じさせ、その生成量によって酵素活性を検出出来ることが知られている (Fig. 77 上)。このアッセイ法はグリシン酸化酵素や他の D-アミノ酸酸化酵素の酵素反応速度を解析するのに汎用されている手法であることから、CmiS2 の活性を観測するのに最適であると判断した。

CmiS2 に対するペルオキシダーゼアッセイは Fig. 77 に示すような条件で行った。グリシン、4-アミノアンチピリン、フェノール、西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを混合させたところに CmiS2 を加えることにより反応を開始させた。そして 1 時間から 3 時間まで各時間毎の 510 nm の吸光度変化を、グリシンを加えずにインキュベートさせたものとの比較で評価した。その結果、

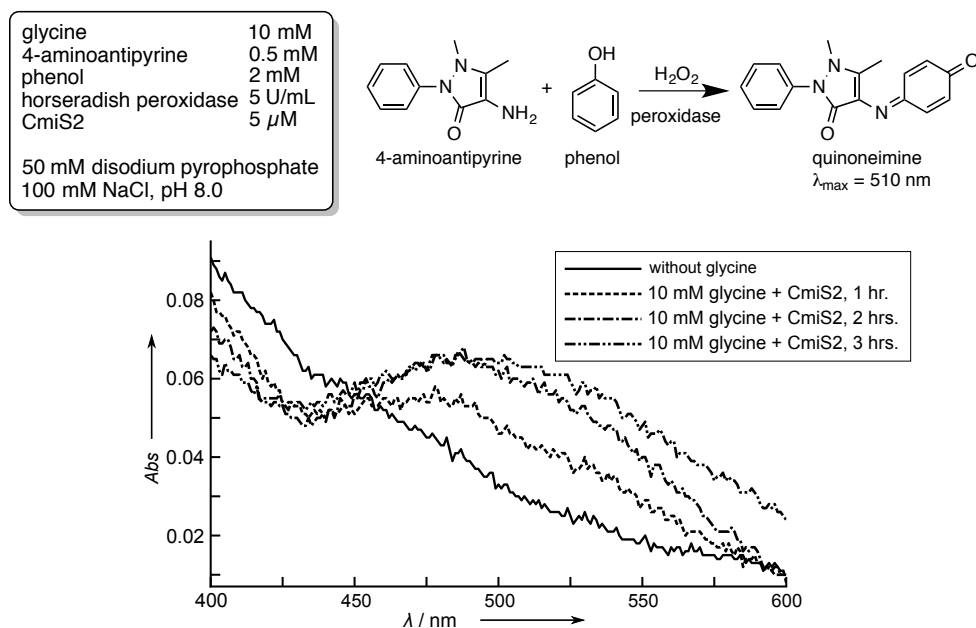


Fig. 77 ペルオキシダーゼアッセイの原理と反応条件、この手法による CmiS2 の触媒活性の検出

CmiS2 はグリシンを酸化し、過酸化水素を生じさせる触媒活性があることを検出した。しかしその酵素活性は非常に弱く、キノンイミンに由来する色素を視認出来るようになるまでには3時間以上を要した。これはアミノ基受容体である3-ケトノナン酸チオエステルが存在しなかったためにその反応が殆ど進行しなかったと考え、本来のアミノ基転移反応を検出する実験を開始した。

4.4 酵素反応基質の合成

第3章 3.4.1 で示したように、クレマイシン開始基質を生合成すると考えられる PKS は CmiP4, CmiP3, CmiP2 であり、このうち CmiP2 の KR ドメインは、先のドメイン解析で不活性であると予想した。すなわち、これらのポリケチド鎖伸長反応が完結した後に得られるのは、3-ケトノナン酸-ACP であると考えられる。しかし、活性に必須なチロシン残基は保存されており、活性型である可能性も残されていた。その場合、その後の DH ドメインは活性型であると考えられたことから、CmiP2 の ACP 上にできるのは2-ノネン酸-ACP となる。そこで本研究では3-ケトノナン酸-ACP、もしくは2-ノネン酸-ACP がアミノ基導入反応の基質であるとして Fig. 78, 79 に示すように合成し、酵素反応の検討を行うことにした。

まず、2-オクタノンを出発物質とし、これに炭酸ジエチルを作用させることにより3-ケトノナン酸エチルエステルを得た。これを塩基で加水分解し、3-ケトノナン酸を得た。最後に *N,N'*-ジシ

クロヘキシルカルボジイミド (DCC) と *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) 存在下、*N*-アセチルシステアミンと縮合させることにより、3-ケトノナン酸の NAC チオエステルを得ることが出来た。

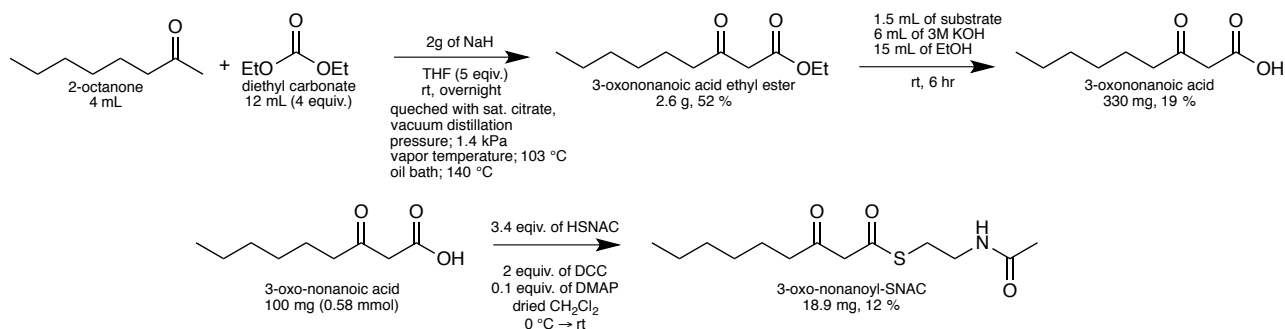


Fig. 78 3-ケトノナノイル-SNAC の合成

2-ノネン酸 NAC チオエステルは 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (EDCI) と DMAP 存在下、2-ノネン酸と *N*-アセチルシステアミンの縮合反応により容易に得ることが出来た (Fig. 79)。

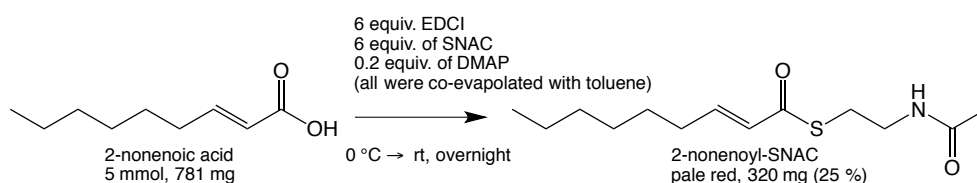


Fig. 79 2-ノネノイル-SNAC の合成

4.5 酵素反応生成物解析時における HPLC 標準物質の合成

本酵素反応で生成されるクレマイシン開始基質は、第 3 章 61 ページの Fig. 54 や Fig. 55 で予想したように 3-アミノノナン酸であると考えられるが、これは紫外領域に吸収を殆ど持たないため、HPLC による検出を行うためには紫外領域に吸収を持つ誘導体へ変換する必要がある。そこで本研究ではアミノ酸を HPLC にて検出する際に汎用されるフェニルイソチオシアネート (PhenylIsoThioCyanate, PITC) を用いて、フェニルチオカルバミル (PhenylThioCarbamyl, PTC) 誘導体 ($\lambda_{\max} = 254 \text{ nm}$) とすることにした。そこで酵素反応に先立って標準物質である 3-PTC-ノナン酸を合成した。共同研究者により合成された 3-アミノノナン酸を、アセトニトリル:ピリジン:トリ

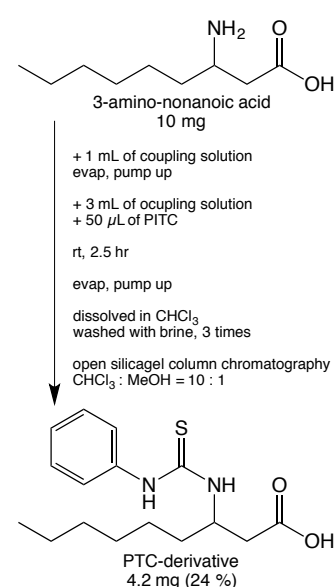


Fig. 80 3-PTC-ノナン酸の合成

エチルアミン:水 = 10 : 5 : 2 : 3 の割合で混合したカップリング溶液に溶解し、ここに過剰量の PITC を加え、室温で 2.5 時間攪拌した。これを減圧留去し、酢酸エチルと酸性水で分配し、有機層を減圧留去、順相シリカゲルクロマトグラフィーにて精製した (Fig. 80)。

4.6 3-ケトノナン酸 NAC チオエステルを用いたアミノ基導入反応の検討

4.6.1 3-ケトノナン酸 SNAC, グリシン, CmiS2 によるアミノ基導入反応検討

4.2 で得られた CmiS2 と 4.4 で合成した 3-ケトノナン酸 NAC チオエステルを用いて、アミノ基転移反応が実際に起こるかどうかが、酵素反応を検討した。3-ケトノナン酸-SNAC は緩衝液に殆ど溶けなかったため、DMSO を用いて酵素反応に用いる 10 倍濃度のストック溶液を調製、これを酵素反応に使用した。3-ケトノナン酸、グリシン、精製・脱塩・濃縮した CmiS2 をそれぞれ加え、28 °C で終夜インキュベートした。その後、酵素反応溶液と等量のアセトニトリルを加えることによって酵素反応を停止させ、得られた溶液を減圧留去、残渣に PITC による誘導体化を施すことによって、HPLC での検出を試みた。NAC チオエステルは誘導体化時に加水分解され、最終的に検出されるのは 3-PTC-ノナン酸になると考えた。しかし得られたピークは原料のグリシンによるものや未反応の誘導体化試薬由来と思われるものだけであり、3-PTC-ノナン酸と一致するピークを検出することは出来なかった。

Proposed catalytic mechanism

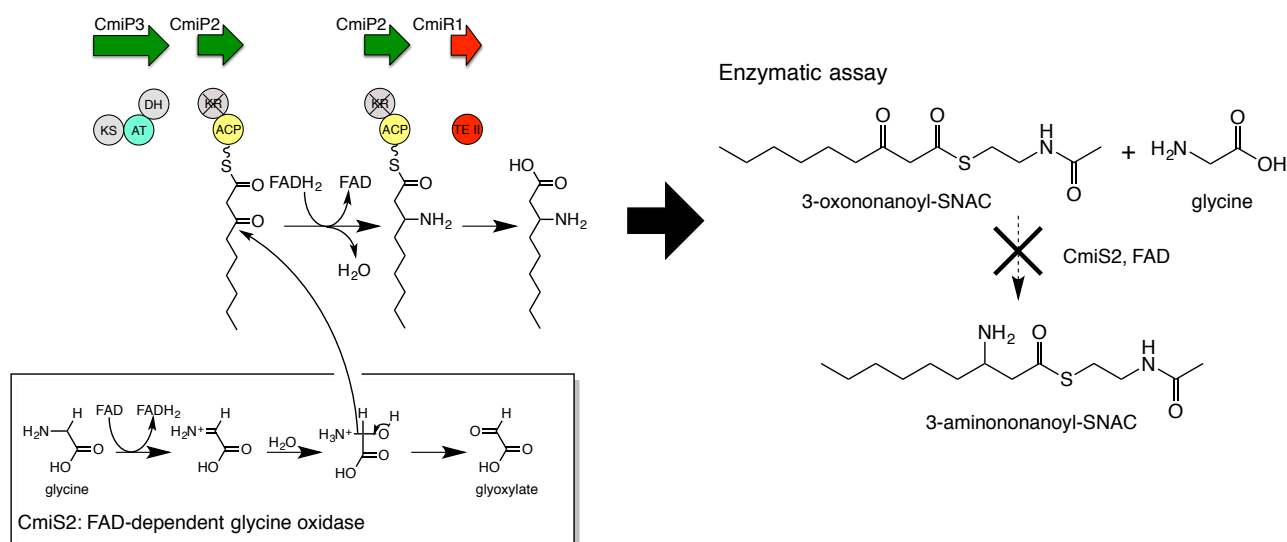


Fig. 81 4.6.1 において想定したアミノ基導入機構と実際に行った酵素反応

Table 11 4.6.1 における酵素反応条件

Entry	substrate	glycine	FAD	CmiS2
1	2.5 mM	5 mM	1 mM	10 μ M
2	2.5 mM	5 mM	1 mM	70 μ L of CFE
3	2.5 mM	5 mM	1 mM	10 μ M + 5 μ L of CFE
4	2.5 mM	5 mM	1 mM	×
5	×	5 mM	1 mM	10 μ M
6	2.5 mM	×	1 mM	10 μ M
7	2.5 mM	5 mM	×	10 μ M

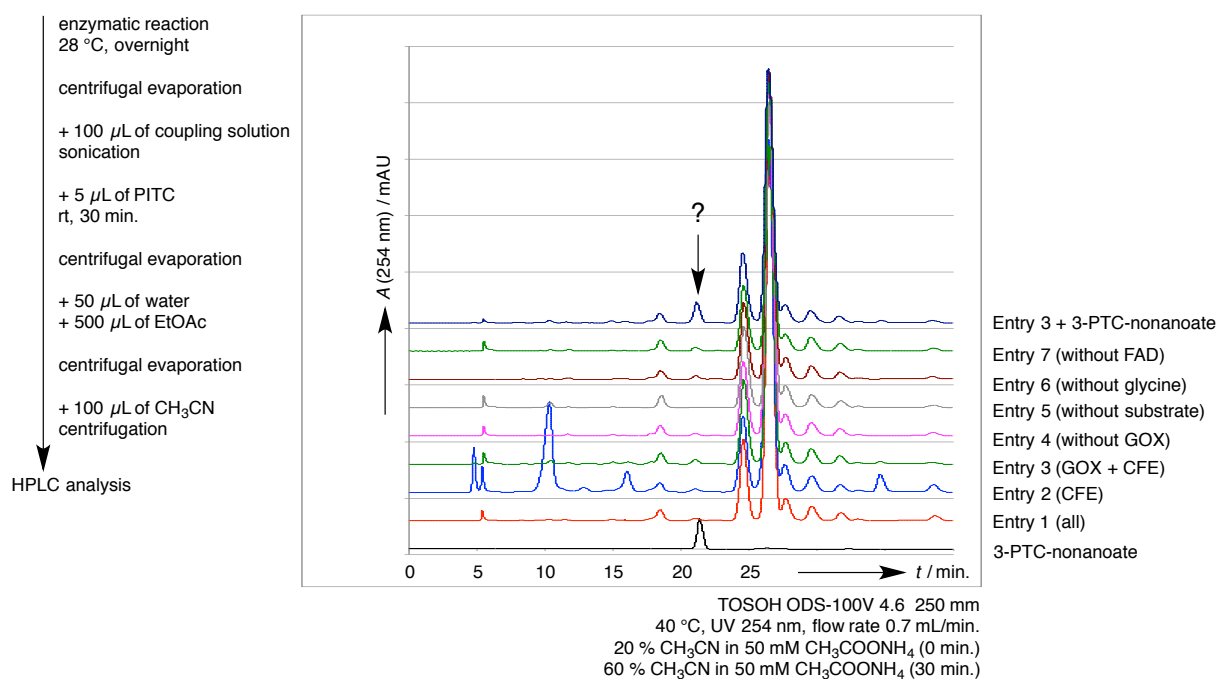


Fig. 82 4.6.1 における HPLC 分析の結果

4.6.2 アミノ基供与体及びパートナー酵素の検討

4.6.1 での結果と 4.3 においてグリシンを酸化する活性が弱かったことから、酵素反応が進行しない原因はグリシンが十分に酸化されないことにあったと考えた。また、ブタの腎臓由来の D-アミノ酸酸化酵素において逆反応が進行し、亜ジチオン酸ナトリウム (DTH) 存在下、クロロピルビン酸と硫酸アンモニウムから D-クロロアラニンが生成したという報告もなされている [90]。そこでアミノ基供与体としてグリシンと塩化アンモニウムの何れかを用いることにした。また、CmiS2 は何か他のタンパク質が存在することによって酵素活性が発現されるのでは無いかと考えた。ここで着目したのは *cmiS2* 及び *cmiC2* と同じオペロン上に存在している *cmiS1* の存在である。*cmiS1* 翻訳産物は 3.3.3 (50 ページ) で示したように、BecU, MlaU としか高い相同性を示さず、機能未知のタンパク質である。しかし Jørgensen らはこのタンパク質が NRPS-PKS ハイブリッド酵素において異種ドメイン間の相互作用に関わるだろうと提唱している。そこで CmiS1 は CmiS2 と何らかの相互作用をすることで CmiS2 を活性化すると予想した (Fig. 84)。このように不活性なタンパク質をコードする遺伝子近傍の機能未知遺伝子からの翻訳産物が、タンパク質の活性化に寄与したという報告も存在している。例えば NRPS である CmnO や VioO のアデニル化酵素ドメインは、単体で種々検討を行ってもその活性を検出することが出来なかったが、これらの酵素遺伝子の近傍に非常に小さな ORF を形成している遺伝子からタンパク質を発現させて CmnO や VioO とインキュベートさせたところ、アデニル化活性を検出することが出来た、というものである [91]。これら小さなタンパク質は MbtH-like protein と呼ばれ、最近ではアデニル化酵素との複合体の構造も解かれている [92]。以上から CmiS1 と CmiS2 を共にインキュベートさせ、その酵素反応生成物を解析した。CmiS1 の発現系は 4.2 で CmiS2 と同時期に構築した *E. coli* BL21 (DE3)/pCold I-*cmiS1* を使用した。pCold 発現ベクターにおける標準条件で培養、酵素発現の誘導を行ったところ、容易に可溶化した CmiS1 が得られたので、これを Ni²⁺ アフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製した。そしてこれを用いて Table 12 の条件で実験を行ったが、結局 3-PTC-ノナン酸を検出することは出来なかった。

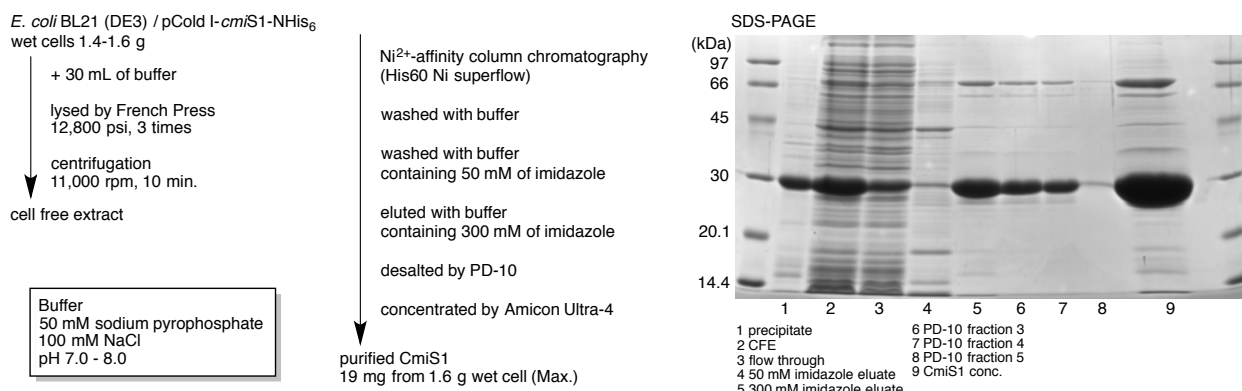


Fig. 83 CmiS1 の精製

Proposed catalytic mechanism

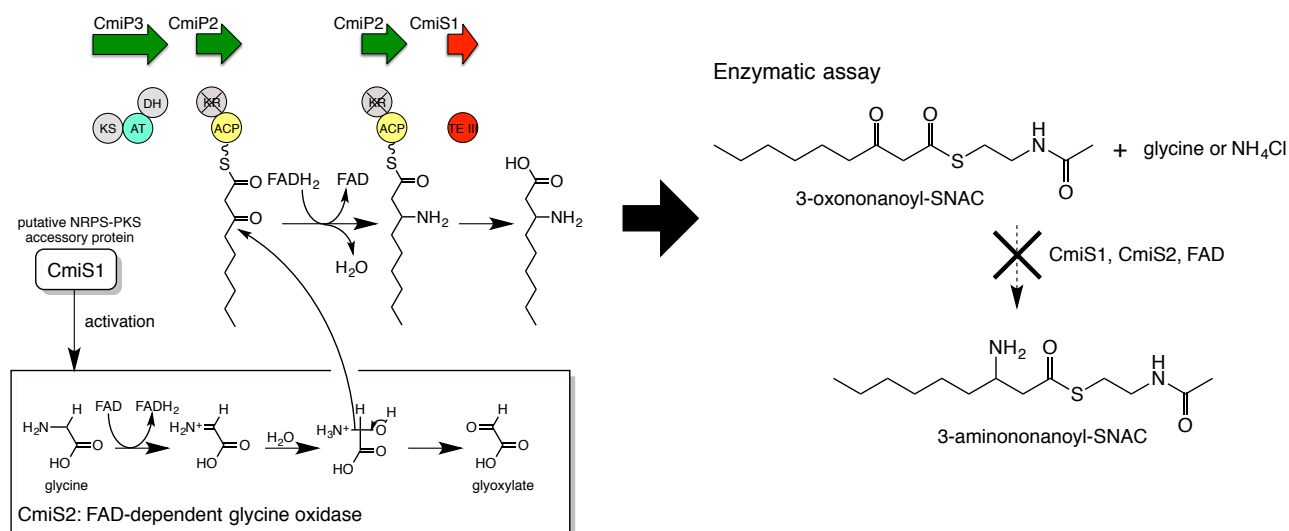


Fig. 84 4.6.2 において想定したアミノ基導入機構と実際に行った酵素反応

Table 12 4.6.2 における酵素反応条件

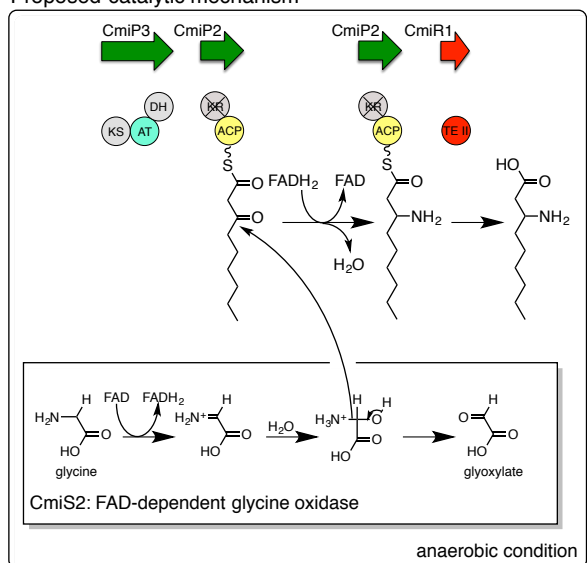
Entry	substrate	FAD	nitrogen source (10 mM)	CmiS2	CmiS1
1	2.5 mM	1 mM	Gly	5 μ M	5 μ M
2	2.5 mM	1 mM	NH ₄ Cl	5 μ M	5 μ M
3	2.5 mM	1 mM	Gly	5 μ M	×
4	2.5 mM	1 mM	NH ₄ Cl	5 μ M	×
5	2.5 mM	1 mM	Gly	×	5 μ M

4.6.3 嫌気条件下における酵素反応検討

4.6.1 において CmiS2 による酵素反応が進行しなかった理由として 1 つ考えられたのは、酸素の存在である。今までに報告されたグリシン酸化酵素の反応経路では反応が進行した際、還元された FAD は酸素によって再酸化され、触媒サイクルが完結する。しかし、今回の酵素反応で酸素が存在すると、もし 3-ケトノナン酸-SNAC へアミノ基が転移したとしても、そこで生成したイミンの還元を行う還元剤が存在しないことになり、再び原料に戻ってしまうと考えられた。そこでこれを実証するために CmiS2 を保持する大腸菌の破碎から CmiS2 の精製、酵素反応まで一連の操作を嫌気条件で行った (Fig. 85)。酵素精製・酵素反応に用いる緩衝液は凍結脱気とアルゴンによるバブリングを行って酸素を取り除き、酸素濃度が 0.1 ppm 以下に保たれたグローブボックス内で保存した。この緩衝液を用いてアルゴン雰囲気下大腸菌を超音波にて破碎、グローブボックス内で精製した。これを 4.6.1 と同様の条件で酵素反応に用いた。また、4.6.2 で用いた塩化アンモニウムもアミノ基供与体として用いてみた。しかし、HPLC 分析からは 3-PTC-ノナン酸と一致

するピークを検出出来ず、想定した CmiS2 の酵素活性を検出することは出来なかった。

Proposed catalytic mechanism



Enzymatic assay

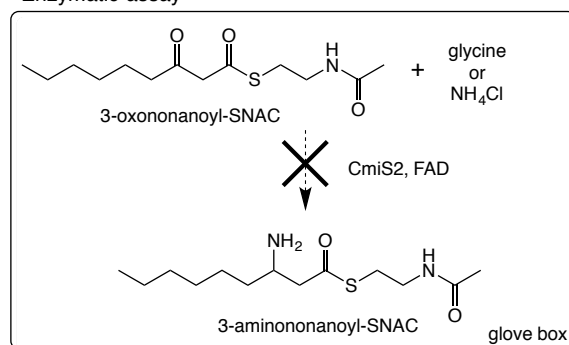


Fig. 85 4.6.3 において想定したアミノ基導入機構と実際に行った酵素反応

Table 13 4.6.3 における酵素反応条件

Entry	substrate	FAD	nitrogen source (10 mM)	DTH	CmiS2
1	2.5 mM	1 mM	Gly	10 mM	30 μ M
2	2.5 mM	1 mM	NH ₄ Cl	10 mM	30 μ M
3	2.5 mM	1 mM	Gly	×	30 μ M
4	2.5 mM	1 mM	NH ₄ Cl	×	30 μ M
5	2.5 mM	1 mM	Gly	10 mM	×
6	2.5 mM	1 mM	NH ₄ Cl	10 mM	×
7	×	1 mM	Gly	10 mM	30 μ M

4.7 2-ノネン酸 NAC チオエステルを用いたアミノ基導入反応の検討

以上の結果より、アミノ基導入反応における真の基質は 3-ケトノナン酸チオエステルでは無いことが示唆された。そこで、CmiP2 の KR ドメインは活性型であると仮定し、次に 2-ノネン酸チオエステルを基質とした酵素反応の検討に移ることにした。

4.7.1 2-ノネノイル-SNAC と CmiS2 での酵素反応検討

4.7 の考察より、アミノ基導入反応に必要なのは基質である 2-ノネノイル-SNAC とアミノ基供与体であるグリシンもしくはアンモニウムイオン、そして CmiS2 であると考えられた。そこでまず、CmiS1 を用いることなく酵素反応を行った。しかしこの条件下で反応の進行を確認することは出来なかった。

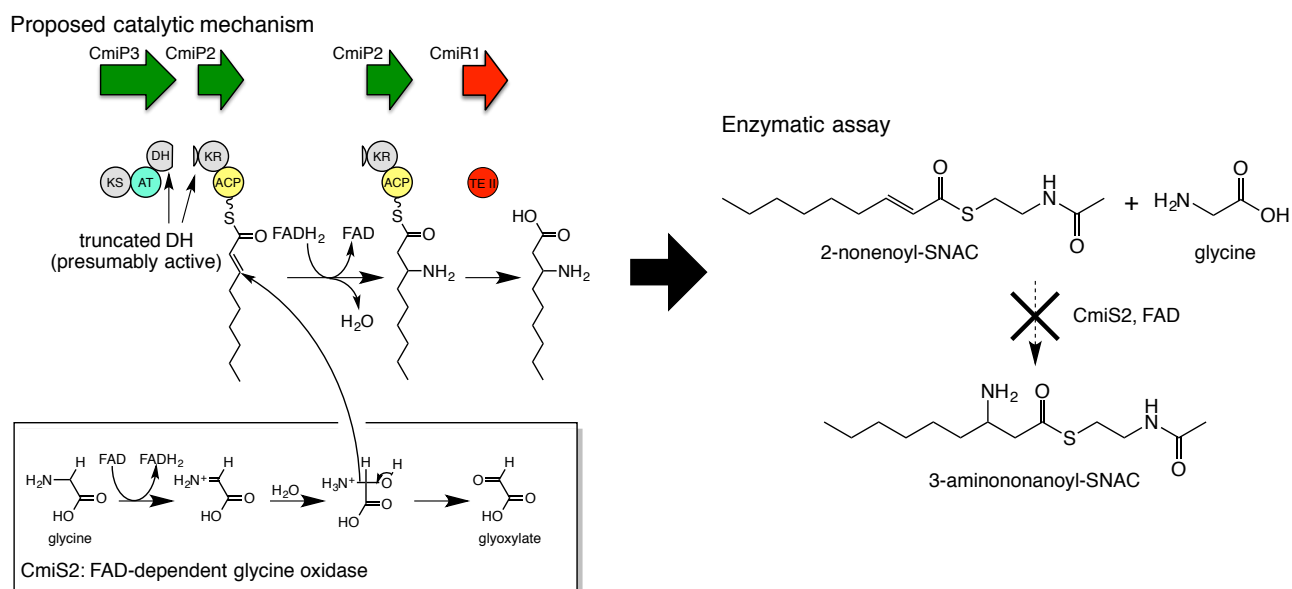


Fig. 86 4.7.1 において想定したアミノ基導入機構と実際に行った酵素反応

4.7.2 2-ノネン酸, CmiS1, CmiS2 での酵素反応検討

先の実験を踏まえ、さらにアミノ酸配列を Pfam や InterProScan を用いてドメイン毎の相同性検索を詳細に行ったところ、CmiS1 は脂肪酸 CoA 加水分解酵素 (Fatty acyl-CoA Thioesterase, FcoT) ファミリーに属する酵素群と相同性を有することが明らかとなった。FcoT に属するタンパクの中で始めて酵素活性検出が報告されたのは、結核菌 *Mycobacterium tuberculosis* 由来の Rv0098 である。このタンパクはアミノ酸配列の相同性からアシル-CoA デヒドラターゼとされてきたが、2007 年 Sacchettini らによって脂肪酸側鎖を有するアシル CoA の加水分解能を持つ酵素であると同定された [95]。また、その構造も明らかになっており、 α -ヘリックス構造に幾つもの

Table 14 4.7.1 における酵素反応条件

Entry	2-nonenoyl-SNAC	FAD	glycine	CmiS2	buffer (pH, etc.)
1	1 mM	1 mM	5 mM	25 μ M	pH 7
2	1 mM	1 mM	5 mM	25 μ M	pH 7 + 10 % glycerol
3	1 mM	1 mM	5 mM	25 μ M	pH 6
4	1 mM	1 mM	5 mM	25 μ M	pH 8
5	1 mM	1 mM	×	25 μ M	pH 7
6	×	1 mM	5 mM	25 μ M	pH 7
7	1 mM	1 mM	1 mM	25 μ M	pH 7
8	1 mM	1 mM	10 mM	25 μ M	pH 7
9	1 mM	1 mM	5 mM	×	pH 7
10	1 mM	1 mM	5 mM	100 μ M	pH 7
11	1 mM	1 mM	5 mM	75 μ L CFE	pH 7

β -シート構造が巻き付くように配置されていて、まるでホットドッグのような構造となっている。このようなホットドッグ構造を有するチオエステラーゼとして II 型のチオエステラーゼが知られているが、Rv0098 の触媒活性残基はそれらとは異なっているため、以後 III 型チオエステラーゼとも呼ばれている。

すなわち CmiS1 が Rv0098 と同様の触媒機能を有すると考えると、CmiS2 が 2-ノネノイル-ACP にアミノ基を転移し、生じた 3-アミノノナノイル-ACP を CmiS1 が加水分解し、3-アミノノナン酸へと導くという酵素反応様式が予測出来る (Fig. 87)。すなわち、4.7.1 にて 3-アミノノナン酸が生成されなかったのは、CmiS1 が存在しなかったことでチオエステル加水分解反応が進行せず、CmiS2 の酵素活性部位に 3-アミノノナン酸チオエステルが蓄積してしまったことが原因と考えられる。そこで 2-ノネノイル-SNAC とグリシン, CmiS1, CmiS2 を同時にインキュベートして酵素反応生成物の分析を行った。

Table 15 4.7.2 における酵素反応条件

Entry	2-nonenoyl-SNAC	FAD	glycine	CmiS2 (25 μ M)	CmiS1 (25 μ M)	substrate disappearance (TLC)
1	1 mM	1 mM	5 mM	○	○	○
2	1 mM	1 mM	×	○	○	×
3	1 mM	1 mM	5 mM	○	×	×
4	1 mM	1 mM	×	○	×	×
5	1 mM	1 mM	5 mM	×	○	○
6	1 mM	1 mM	×	×	○	×

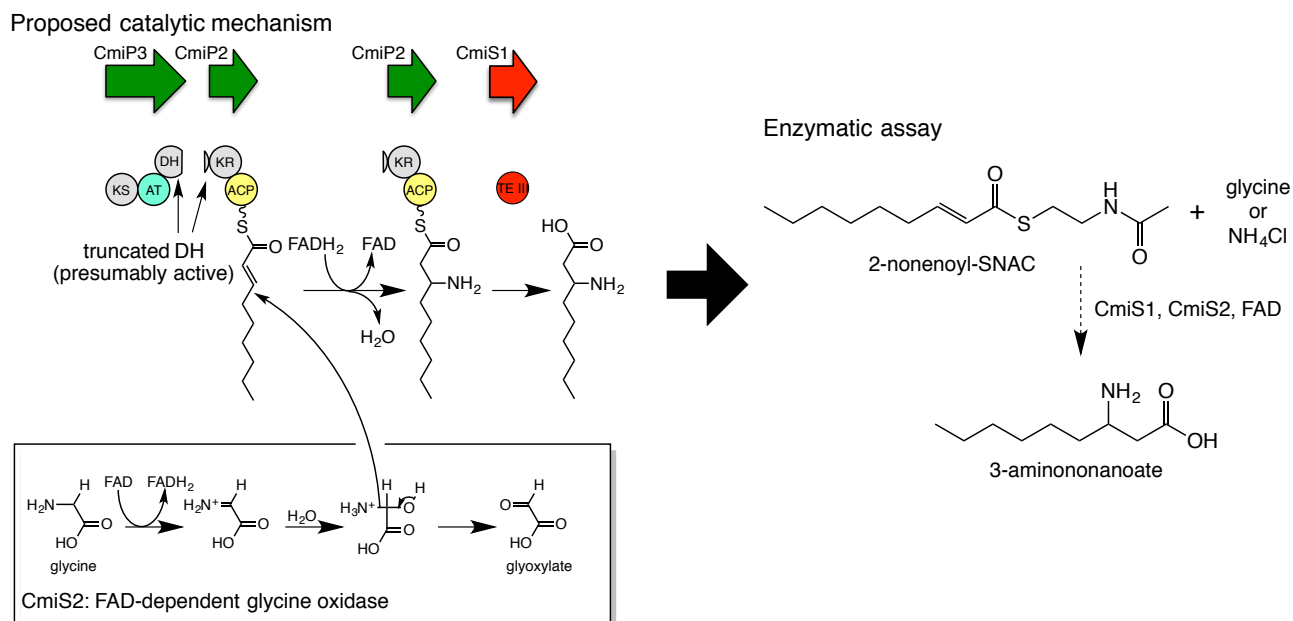
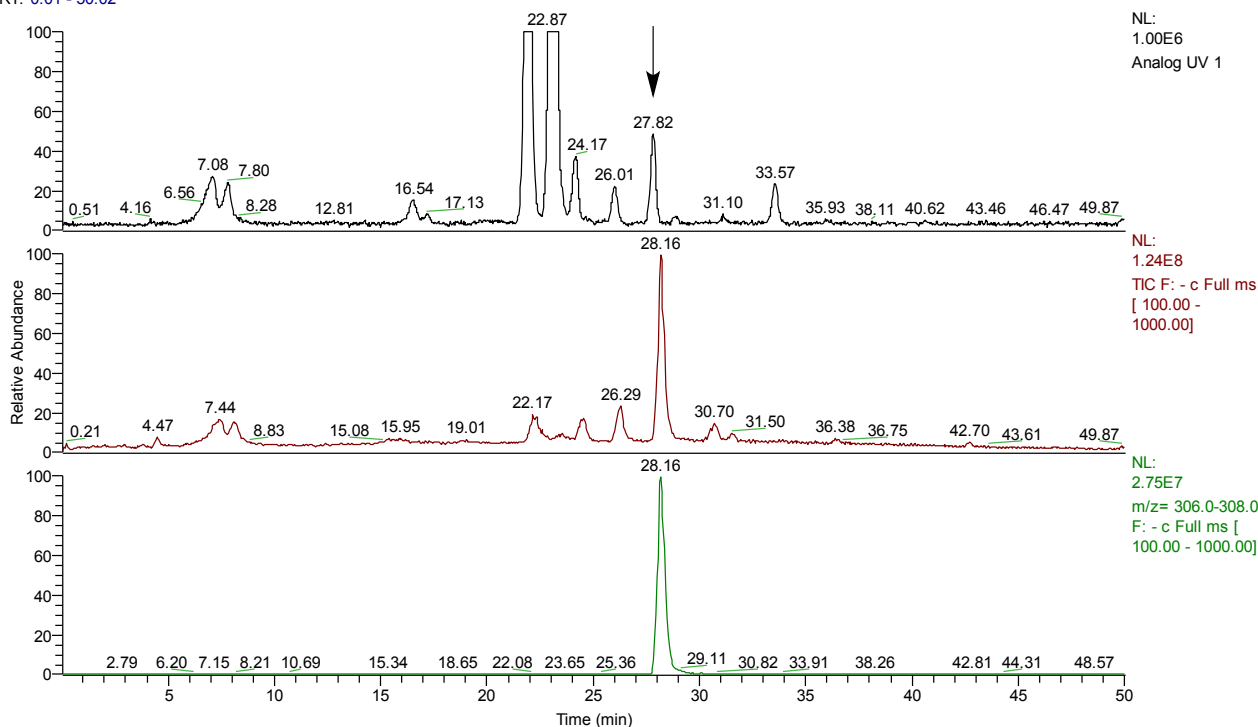


Fig. 87 4.7.2 において想定したアミノ基導入機構と実際に行った酵素反応

終夜インキュベート後の溶液を TLC で分析すると、基質である 2-ノネノイル-SNAC のスポットの消失が確認出来た。そこでこれらを PTC 誘導体化して LC/MS にて分析を行った。その結果、2-ノネノイル-SNAC とグリシン, CmiS1, CmiS2 を全て加えた場合に 3-PTC-ノナン酸と保持時間が同一で m/z 値が一致するピーク (m/z 307.1 $[M-H]^-$) を観測することが出来た。驚くべきことに CmiS2 非存在下の反応溶液中からは、 m/z 347.1 $[M-H]^-$ を示すピークを検出した。これはグリシンが 2-ノネノイル-SNAC に結合し、チオエステルが加水分解された CmiS1 酵素反応生成物だと考えられた。つまり CmiS1 はチオエステル加水分解反応を触媒するだけではなく、 α, β -不飽和エステルにグリシンをマイケル付加させる触媒活性をも有することが示唆された。

RT: 0.01 - 50.02



S#: 1092-1128 RT: 27.56-28.48 AV: 19 SM: 7B NL: 1.28E7
F: - c Full ms [100.00 - 1000.00]

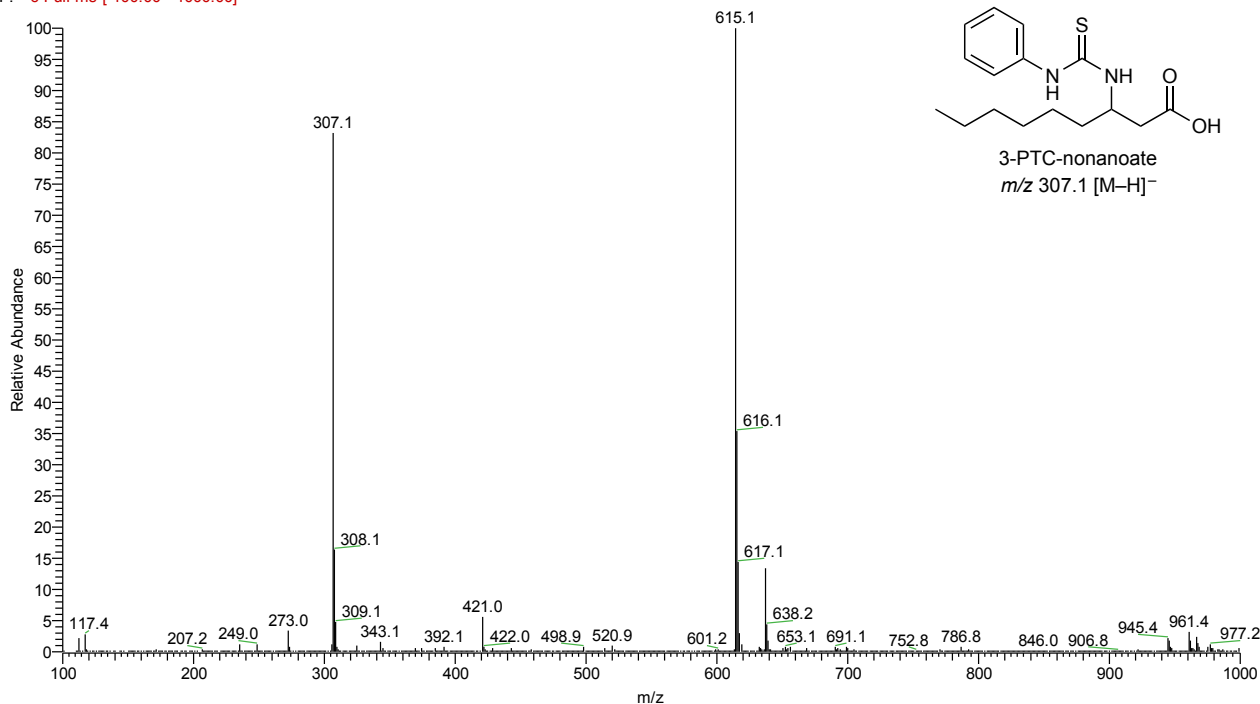
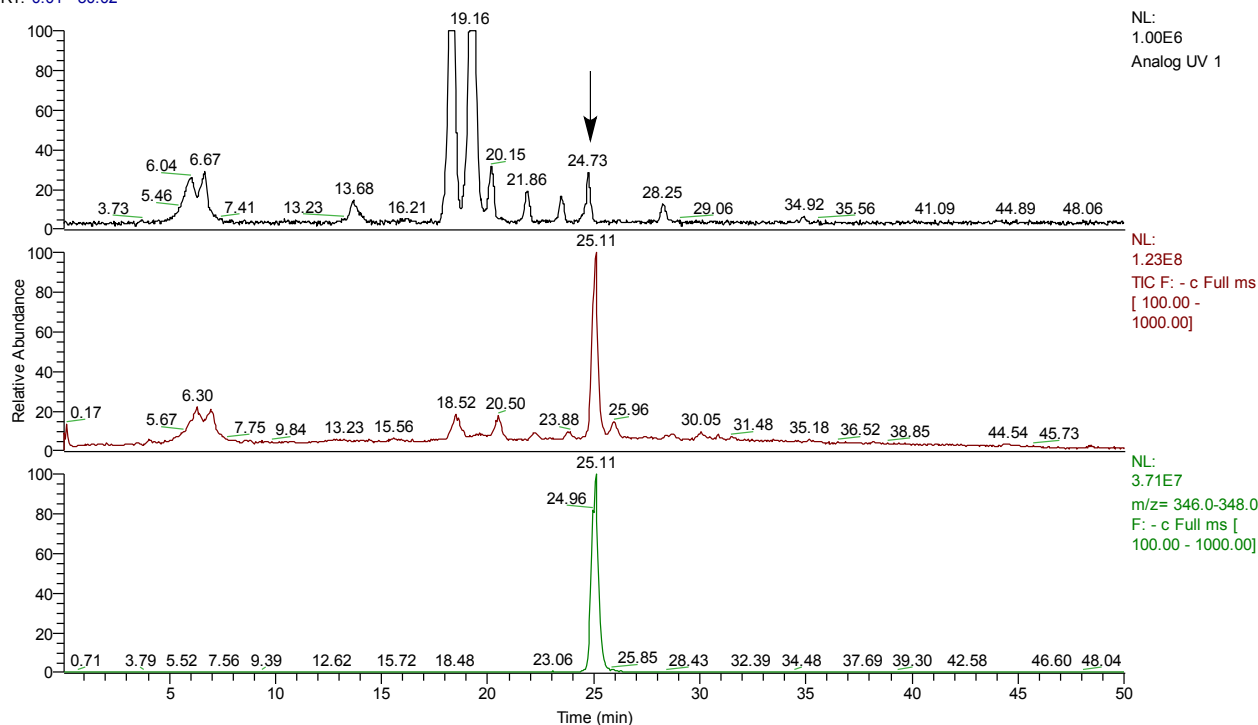


Fig. 88 4.7.2, Entry 1 の LC/MS 分析結果 分析条件: TOSOH TSK-gel ODS-100V column (2.0 × 150 mm), 40 °C, 30 → 100 % CH₃CN in H₂O (40 min.)

RT: 0.01 - 50.02



S#: 963-1007 RT: 24.43-25.57 AV: 23 SM: 7B NL: 1.22E7
F: - c Full ms [100.00 - 1000.00]

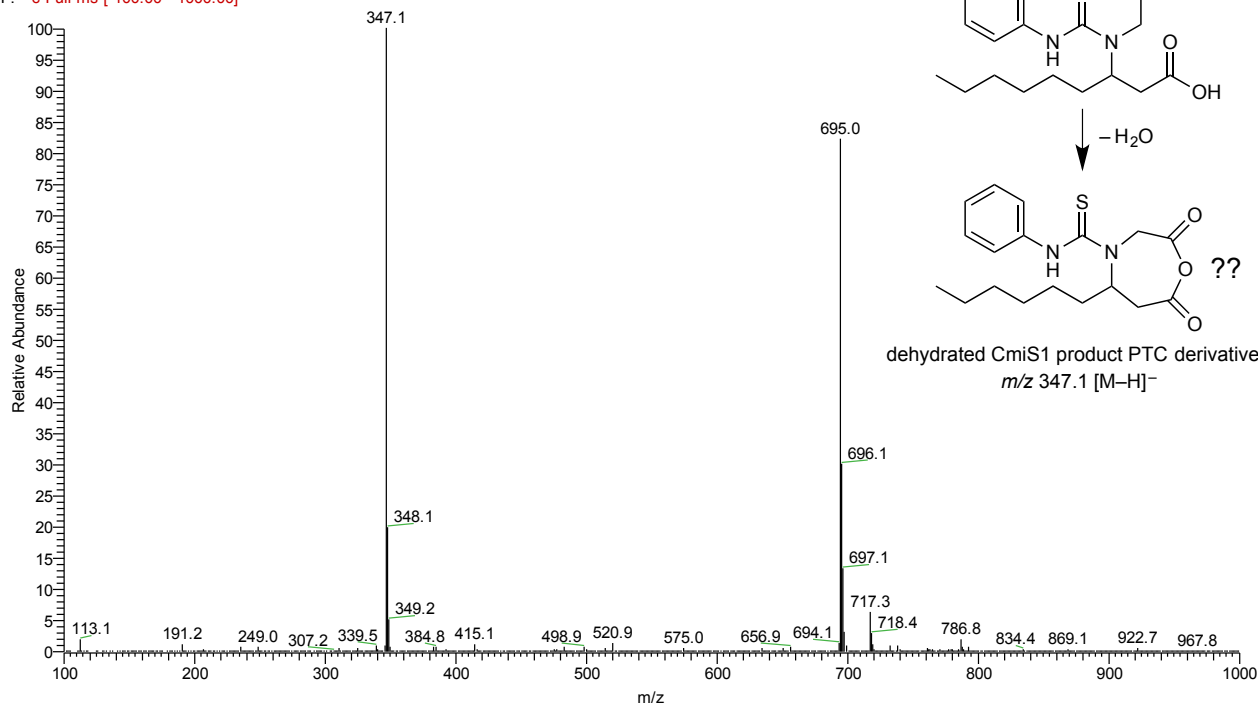


Fig. 89 4.7.2, Entry 5 の LC/MS 分析結果 分析条件: TOSOH TSK-gel ODS-100V column (2.0 × 150 mm), 40 °C, 30 → 100 % CH₃CN in H₂O (40 min.)

4.8 酵素反応生成物の構造決定

LC/MS 分析によって CmiS1 がグリシンを α,β -不飽和チオエステルにマイケル付加させ、チオエステル加水分解を触媒する酵素であることが示唆された。そこでこの生成物を同定するため、CmiS1 酵素反応生成物を単離し、NMR で構造決定を行った。

4.8.1 大スケールでの CmiS1 反応

まず NMR で酵素反応生成物を観測するためには生成物の絶対量を増加させる必要がある。そこで反応溶液量を 100 μL から 40 mL へとした。これは基質である 2-ノネノイル-SNAC の溶解性が非常に低く、10 % DMSO を含んだ緩衝溶液中でも 1 mM が限度であり、構造決定を行うためにスケールを上げ、基質を 10 mg 使用するには 40 mL の反応スケールが必要であったためである。また、DMSO 濃度をこれ以上上げたり、他の非プロトン性極性溶媒である *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) を用いると CmiS1 の活性が極端に減少してしまったため、この反応条件が最適であるとした (詳しくは 4.9.2 に後述)。

このまま精製して CmiS1 酵素反応生成物を直接観測することも考えたが、予想される生成物はジカルボン酸であり、極性が高いことが予想出来たため、先と同様 PTC 誘導体化したものの構造決定を行うことにした。PTC 誘導体化の行程は全て 400 倍にスケールアップした条件で行い、得られた粗製物を順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び逆相のフラッシュ ODS カラムクロマトグラフィーで精製した (Fig. 90)。

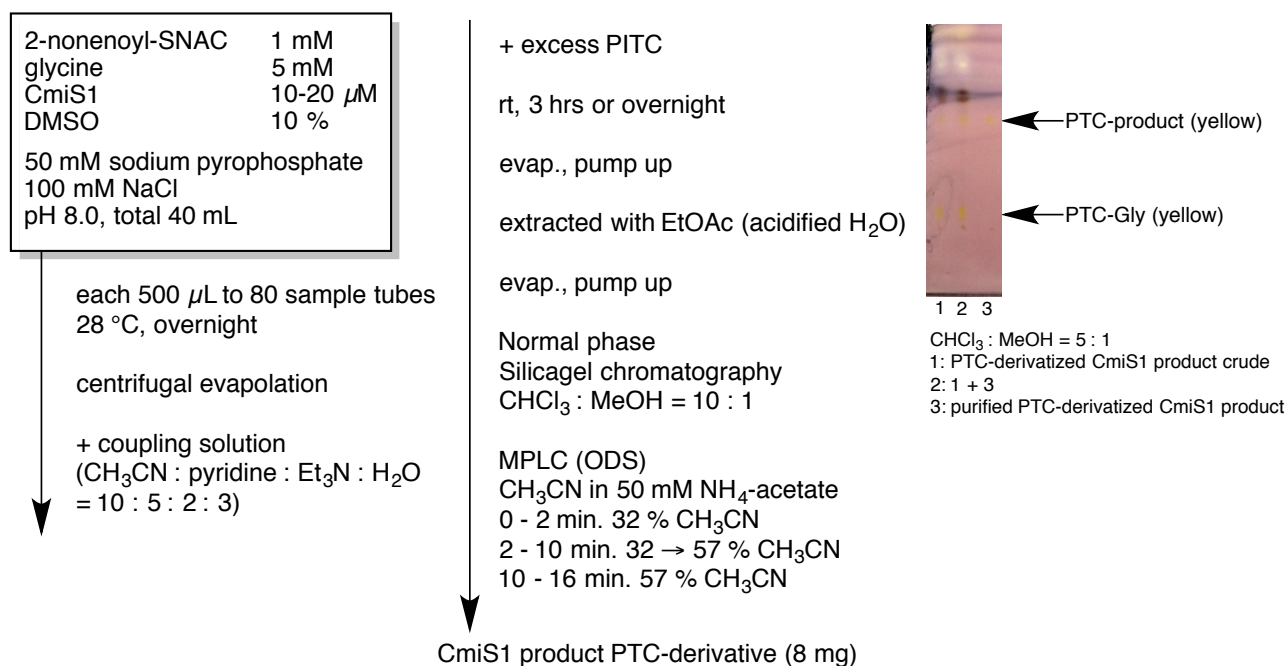


Fig. 90 CmiS1 酵素反応生成物の PTC 誘導体化・単離 (大スケール)

4.8.2 CmiS1 生成物の構造決定

得られた PTC 誘導体はまず LC/MS 分析にて先の反応生成物と同じ保持時間と m/z 値を有していることを確認した。これを ^1H -, ^{13}C -NMR および COSY, DEPT, HMQC, HMBC スペクトルを測定した。 ^1H -NMR, COSY により ^1H シグナルを帰属することが出来、 ^{13}C -NMR と HMQC, HMBC により H-C の相関を観測することが出来た。ここから見出される構造は、確かにグリシンと 2-ノネン酸がマイケル付加により縮合したものであったが、その後 PTC 誘導体化したことによってフェニルチオカルバミル基がグリシンと 5 員環を形成してフェニルチオヒダントイン (PTH) 化したものか、ノナン酸のカルボキシル基と 6 員環を形成したものかまでは HMBC で決定することが出来なかった。しかし LC/MS 分析において m/z 347.1 $[\text{M}-\text{H}]^-$ を親イオンとした時の MS/MS フラグメントイオンを分析したところ、 m/z 191.1 を観測し、これが PTH-グリシンと一致したことから、CmiS1 生成物の PTC 誘導体は 3-PTH-グリシニルノナン酸であると決定した (Fig. 91)。

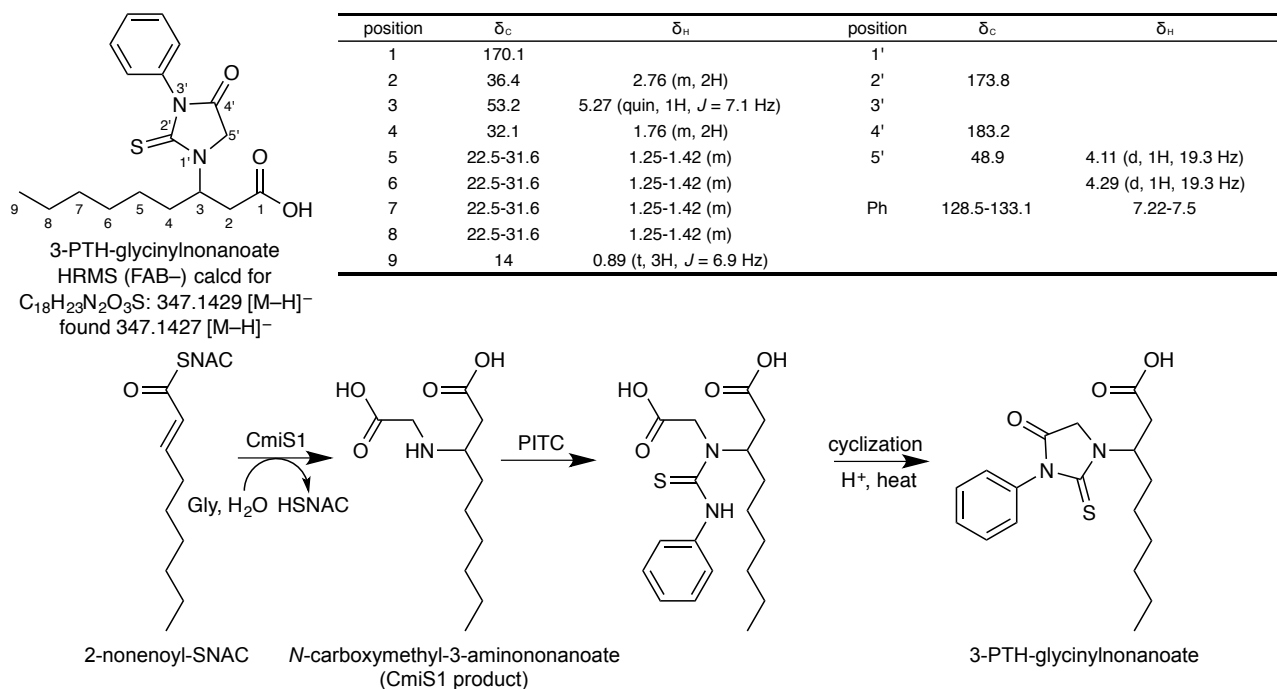


Fig. 91 CmiS1 酵素反応生成物の PTC 誘導体の NMR 帰属及び誘導体化時における PTH 環化

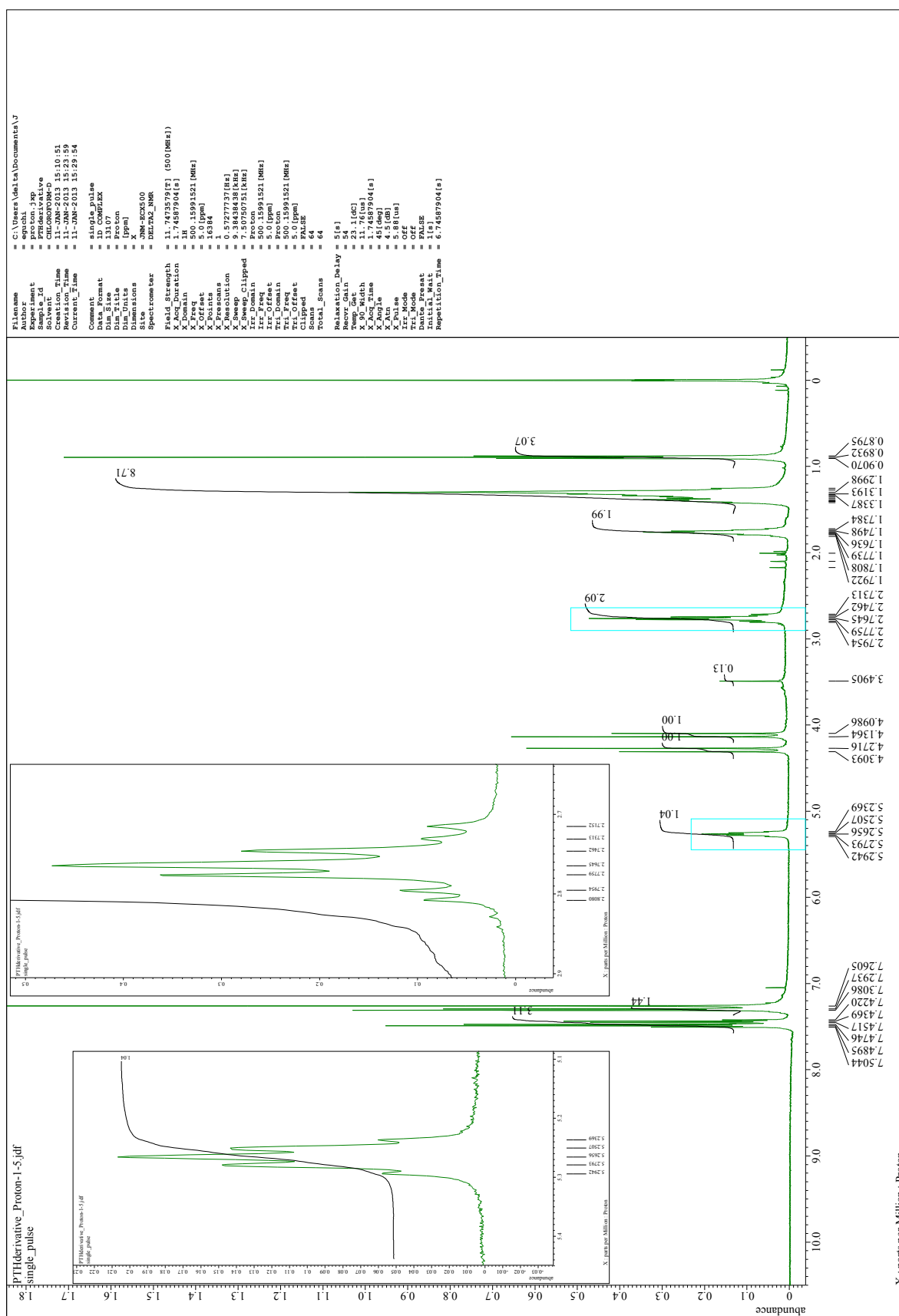


Fig. 92 CmiS1 酵素反応生成物 PTC 誘導体の $^1\text{H-NMR}$ スペクトル (500 MHz, in CDCl_3)

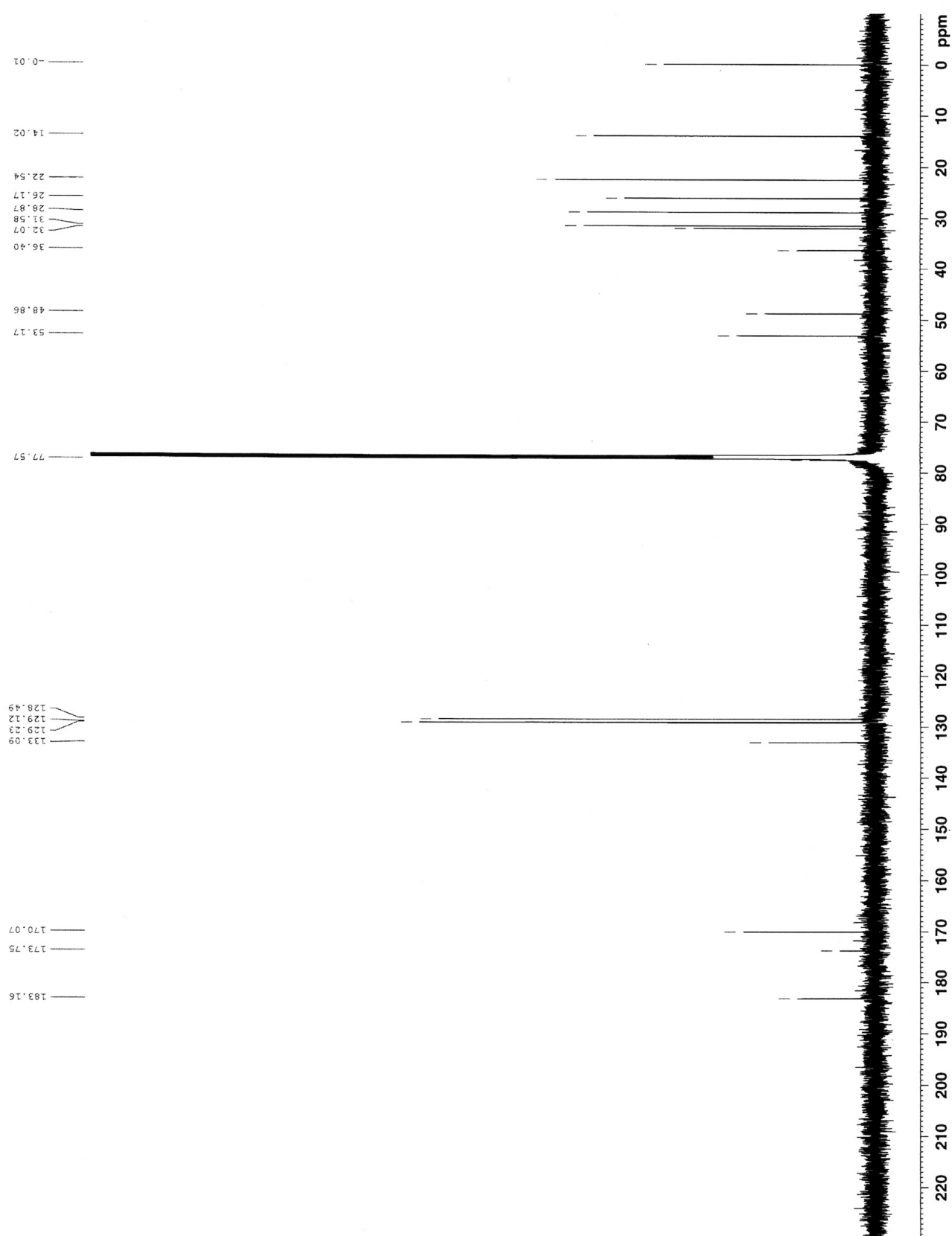


Fig. 93 CmiS1 醣素反応生成物 PTC 誘導体の ¹³C-NMR スペクトル (125 MHz, in CDCl₃)

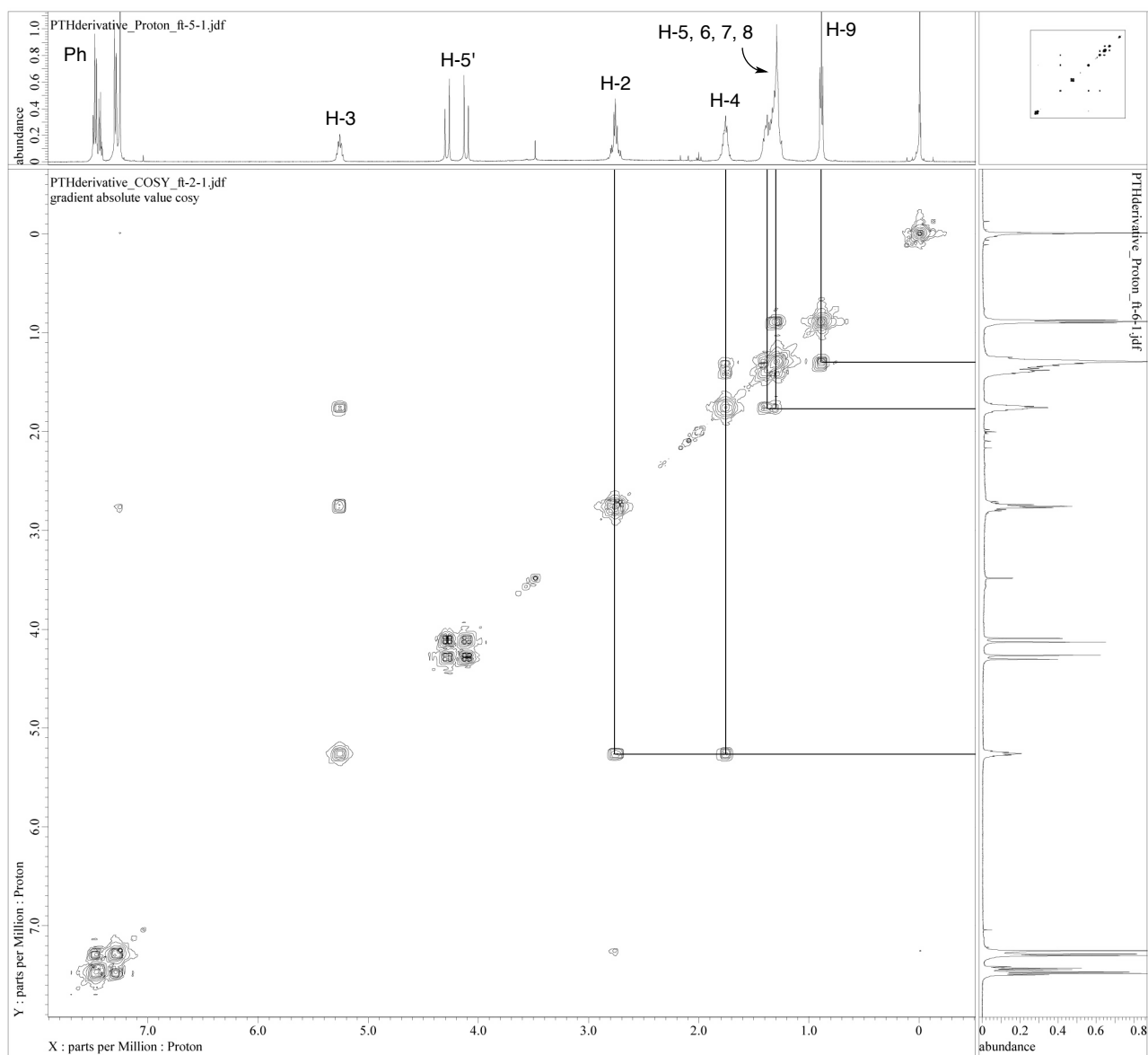


Fig. 94 CmiS1 酵素反応生成物 PTC 誘導体の COSY スペクトル (in CDCl_3)

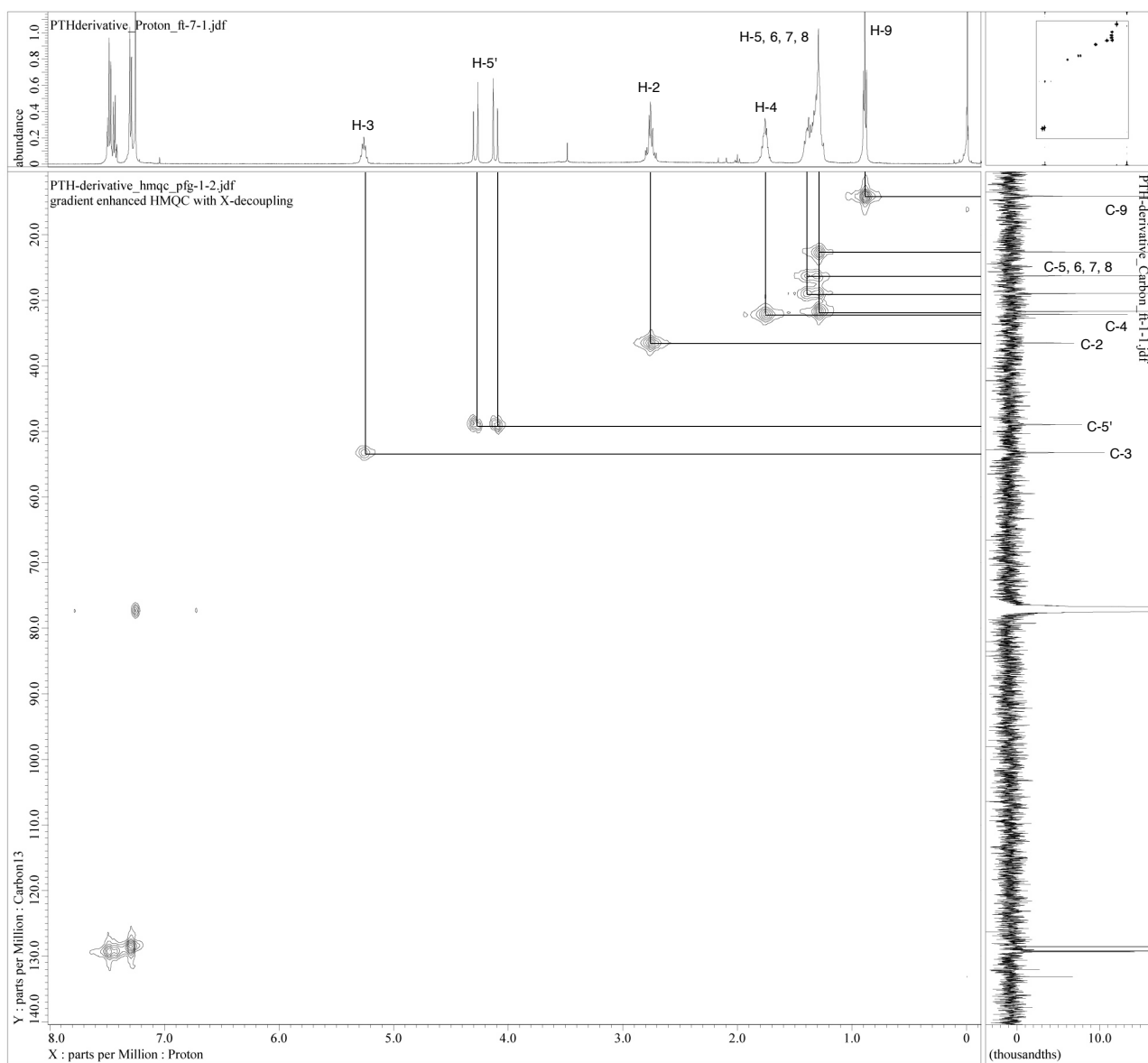


Fig. 95 CmiS1 酵素反応生成物 PTC 誘導体の HMQC スペクトル (in CDCl_3)

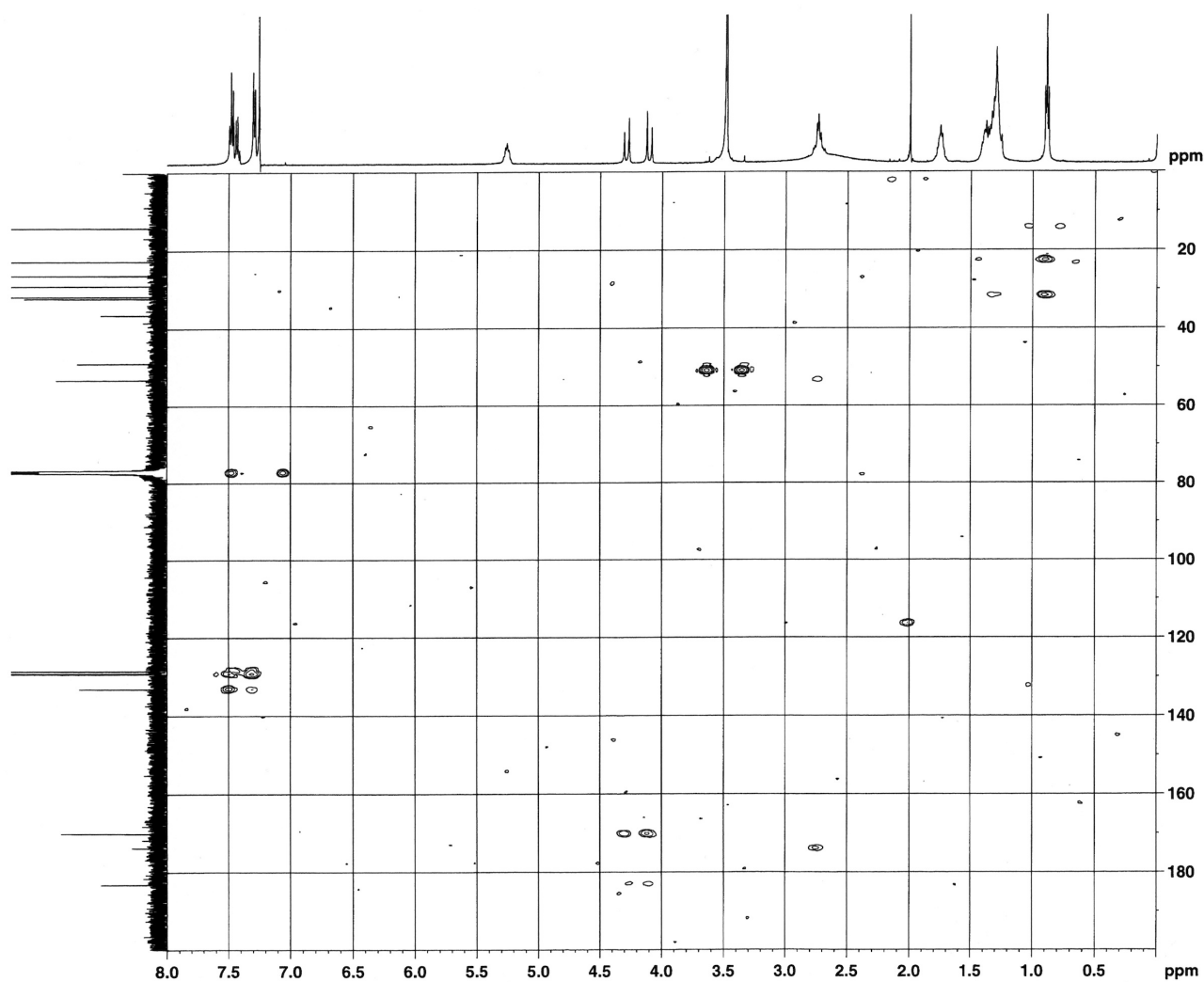


Fig. 96 CmiS1 酵素反応生成物 PTC 誘導体の HMBC スペクトル (in CDCl_3)

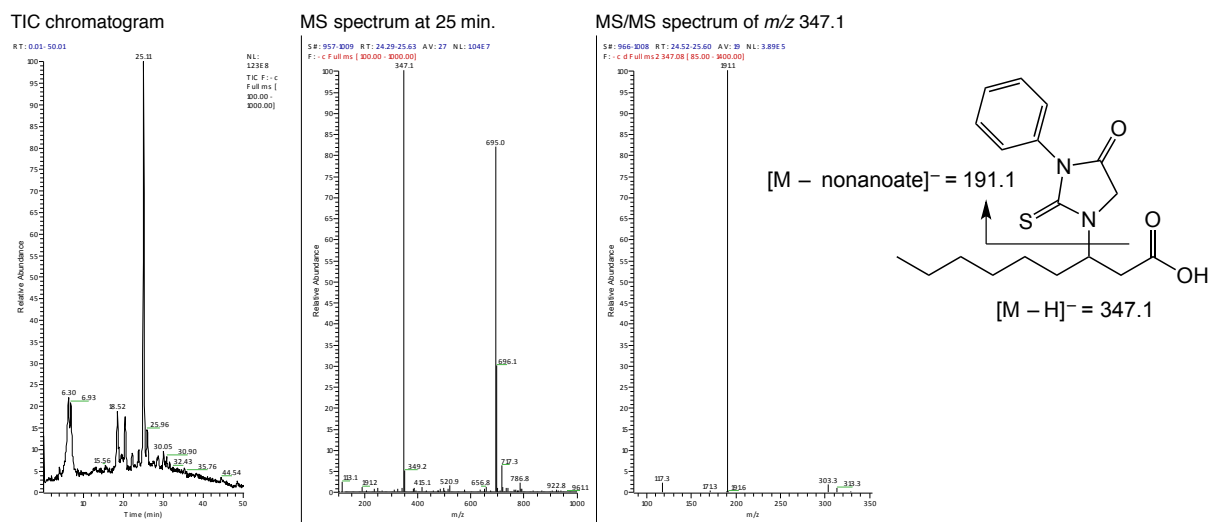


Fig. 97 CmiS1 酵素反応生成物 PTC 誘導体 LC/MS 分析時の Left: TIC クロマトグラム, Center: 保持時間 25.11 分部分の MS スペクトル, Right: $m/z = 347.1$ を親イオンとした時の MS/MS スペクトル (Left, Center は Fig. 89 のものと同一)

4.8.3 CmiS2 の基質が CmiS1 生成物であることの立証実験

以上の結果より、CmiS1 反応生成物はグリシンが 2-ノネノイル-SNAC にマイケル付加し、チオエステル加水分解を受けた *N*-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸であることが決定出来た。そこで、この化合物と CmiS2 をインキュベートし、この酵素反応から 3-アミノノネン酸が生成するかを観測した。合成した *N*-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸を、精製した CmiS2 と 28 °C で終夜インキュベートし、PTC 誘導体化して LC/MS で解析を行った。その結果 Fig. 98 に示すように CmiS2 は *N*-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸を認識し、3-アミノノナン酸へと変換した。UV クロマトグラム上のピーク面積から判断すると、合成によって得られた *N*-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸はその半分量だけ 3-アミノノネン酸に変換された。一方今までの LC/MS 分析では CmiS1, CmiS2 を同時に加えれば、酵素反応中間体である *N*-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸が残ることは殆ど無かった。これは合成化合物がラセミ体であり、CmiS2 はその一方しか認識しなかったのが原因だと考えられる。

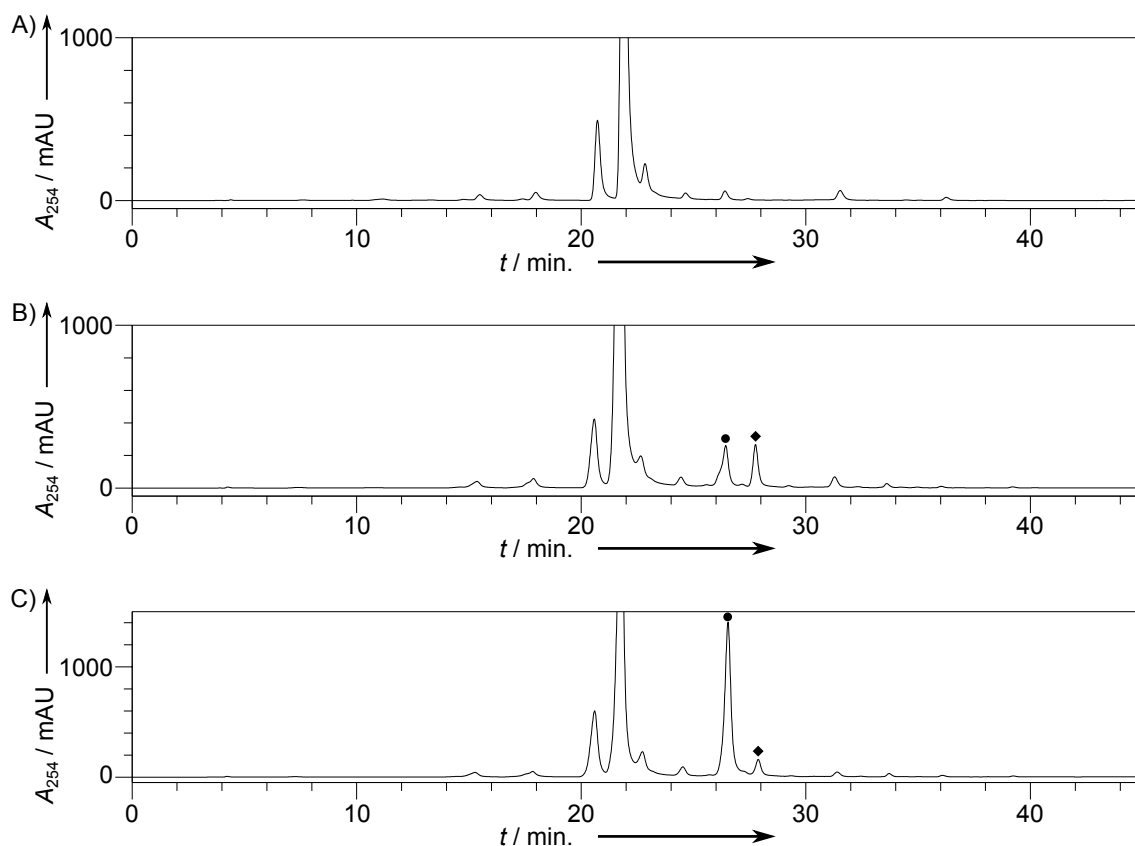


Fig. 98 CmiS2 予想基質と CmiS2 との酵素反応の HPLC 解析 (A) 基質無し (B) 全て入れた場合 (C) (B) に生成物標品である 3-PTC-ノナン酸を合わせうちしたもの 分析条件: TOSOH TSK-gel ODS-100V column (2.0 × 150 mm), 40 °C, 30 → 100 % CH₃CN in H₂O (40 min.) ◆は 3-PTH-グリシニルノナン酸 (CmiS2 酵素反応基質 PTH 誘導体), ●は 3-PTC-ノナン酸 (CmiS2 酵素反応生成物 PTC 誘導体) を示す。

4.9 アミノ基導入酵素群の生化学的性質

4.7, 4.8 によりクレマイシン開始基質生合成におけるアミノ基導入反応は、CmiS1, CmiS2 という一見アミノ基導入反応には全く関わらないと考えられた酵素によって触媒されることが明らかとなった。よってこれらの酵素がどのような反応経路でアミノ基導入反応を触媒していくのかについて知見を得るため、更に詳細な解析を行った。

4.9.1 CmiS1 の基質特異性

4.7 により、CmiS1 は 2-ノネノイル基にグリシンをマイケル付加することが明らかとなったが、他のアミノ酸でも同様の反応が進行するのか、その基質特異性について解析を行った。20 種類の L-アミノ酸, DL-アラニン, そして塩化アンモニウムをグリシンの代わりに酵素反応溶液に加えて終夜インキュベートし、PTC 誘導体化したものを LC/MS にて分析した。それぞれアミノ酸が付加された場合に得られる化合物の分子量から予想した m/z 値における抽出 MS スペクトルを観測したが、グリシンと構造が最も類似している DL-アラニンを用いた時でさえ生成物を検出することは出来ず、反応生成物が観測されたのはグリシンを用いた時のみであった。すなわち、CmiS1 はアミノ基供与体について非常に高い基質特異性を有することが明らかとなった。

また、2-ノネン酸自体を酵素反応の基質として用いた場合でも、3-PTH-グリシニルノナン酸を検出することは全く出来なかった。これは CmiS1 がチオエステル、もしくは *N*-アセチルシステアミンの部分認識して基質を酵素活性部位に導いていることを示唆している。

4.9.2 エルマンアッセイによる CmiS1 の反応条件検討

CmiS1 の触媒活性が最も高い条件を見出すため、種々の因子を変化させてインキュベートし、その活性をエルマン試薬を用いたアッセイ法で観測した。エルマン試薬は溶液中に遊離するチオールを捕捉すると分子内のジスルフィド結合が切れて、412 nm に極大吸収を有する 5-メルカプト-2-ニトロ安息香酸が等量生成する。この吸光度の変化を観測することで、チオールの定量を行うのがエルマンアッセイ法である。まず準備実験として 1 時間インキュベートした CmiS1 反応溶液中にエルマン試薬を加えたところ、反応溶液は黄色く呈色し、*N*-アセチルシステアミンが遊離していることが観測出来た (Fig. 99)。またグリシンを加えてない場合だと呈色の度合いは非常に小さくなり、また酵素のみの溶液にエルマン試薬を加えてもグリシンが無い場合と同程度の呈色を示したことから、CmiS1 に存在するチオール基とエルマン試薬が反応したものだと考えた。通常このアッセイ法ではエルマン試薬を混合した酵素反応溶液の吸光度を UV/Vis 検出器で経時的に観測するのが一般的だが、CmiS1 の場合エルマン試薬と酵素自体が反応して失活してしまい、このような測定法を行うことが出来なかった。そこで同じ酵素反応溶液を複数準備しておき、各

時間毎に反応溶液と等量のアセトニトリルを加えて酵素反応を停止させ、そこへエルマン試薬を加えたものの吸光度を測定した。

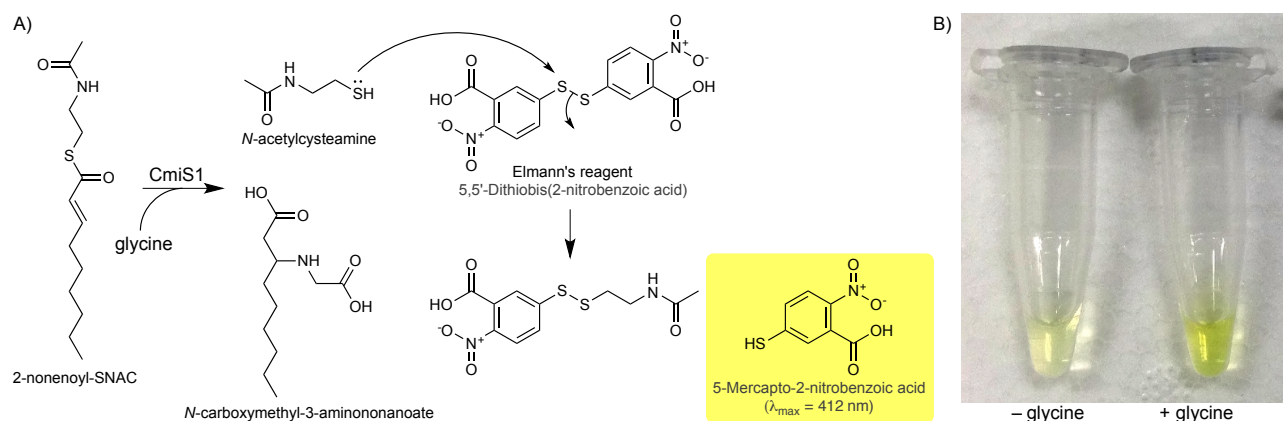


Fig. 99 A) 本実験におけるエルマンアッセイの原理, B) エルマン試薬を加えた時の CmiS1 反応溶液の呈色 – glycine: グリシンを加えずに 28 °C で 1 時間インキュベートしたもの + glycine: 最終濃度 5 mM になるようにグリシンを加え、28 °C で 1 時間インキュベートしたもの

まず、CmiS1 酵素活性の pH 依存性を検討した。リン酸緩衝液の緩衝能が保持される pH を考慮し、pH 6–8 での CmiS1 活性をエルマンアッセイで測定したところ、pH 6 では殆ど活性が無く、pH 8 で最も高い活性を示した。ただし反応温度を 37 °C に上げた場合では失活してしまった。また pH 7 の緩衝液にグリセロールを終濃度 10 % になるように添加したところ、何も入れてない時に比べて触媒活性は上昇した (Fig. 100)。

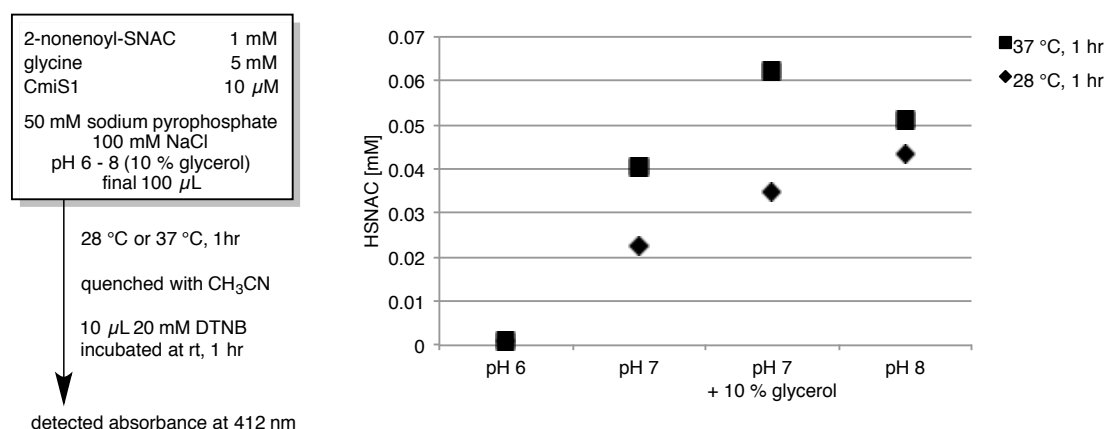


Fig. 100 CmiS1 活性の pH 依存性

次に、CmiS1 酵素活性の温度依存性について検討した。意外なことに CmiS1 は 20 °C という比較的低温で最も高い活性を示した (Fig. 101)。

また基質を溶解するために必要な非プロトン性極性溶媒の検討並びにエルマンアッセイにおいてもアミノ基供与体の検討を行った。その結果、DMSO 濃度を上げると CmiS1 は経時的に失活し、DMF を用いるとさらに失活の度合いが大きくなることが分かった (Fig. 102(A))。またアミノ

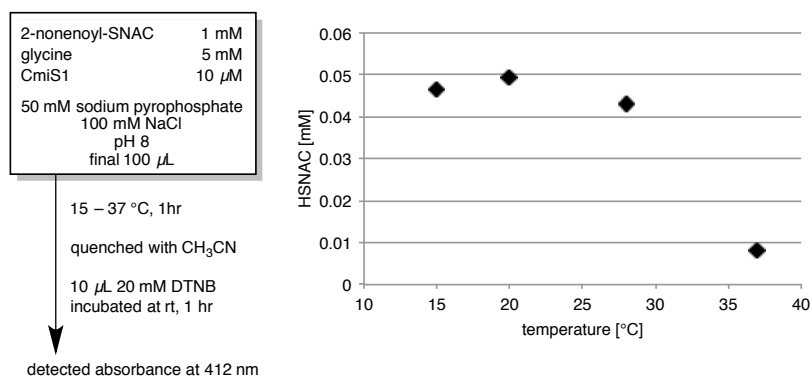


Fig. 101 CmiS1 活性の温度依存性

基供与体についてはやはりグリシンしか活性を示さず、L-または DL-アラニンを用いた場合、触媒活性は全く無いことが分かった (Fig. 102(B))。

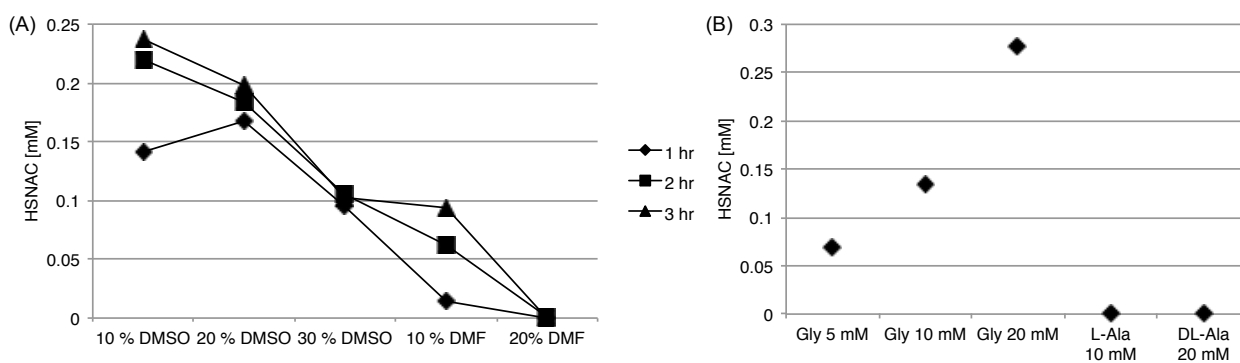


Fig. 102 (A) 非プロトン性極性溶媒の CmiS1 活性に対する影響 (B) CmiS1 のアミノ基供与体に対する特異性

以上の検討を行ったところで CmiS1 の至適反応条件は pH 8 の緩衝液中、20 °C でインキュベートすることであると分かったが、グリシンの濃度を 5–20 mM に上げていった場合、*N*-アセチルシステアミンの生成量がそれに応じて上昇していくことが分かったため、CmiS1 酵素活性のグリシン濃度依存性について調べた。すると驚くべきことに、この時使用した CmiS1 の濃度は 10 μ M であったにもかかわらず、最大活性を示した時のグリシン濃度は 200 mM 程度であった。また、グリシンを入れてない時は吸光度の変化が見られなかったことから、CmiS1 は 2-ノネン酸チオエステルにグリシンをマイケル付加させた後、加水分解反応を触媒することが示唆された。

4.9.3 CmiS1 反応速度

最後に CmiS1 の基質に対する酵素反応速度について分析した。0–1 mM の 2-ノネノイル-SNAC に対し、グリシンを 200 mM 加えて 10 分間、20 °C でプレインキュベートし、そこへ CmiS1 を加えて酵素反応を開始した。30 分後等量のアセトニトリルを加えて反応を停止させ、エルマンアッ

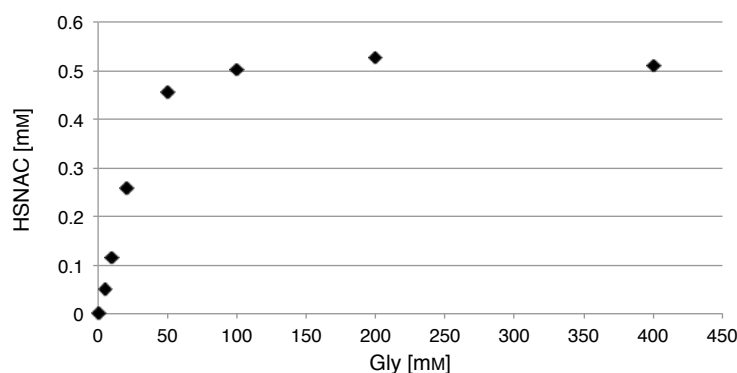


Fig. 103 CmiS1 活性のグリシン濃度依存性

セイにより触媒活性を測定した。その結果、CmiS1 の 2-ノネノイル-SNAC に対する K_m 値は $250 \mu\text{M}$ 、 k_{cat} は 1.21 s^{-1} 、 k_{cat}/K_m 値は $4.85 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ であった (Fig. 104)。これはホモログ酵素である Rv0098 の パルミトイル-CoA に対する k_{cat}/K_m 値と近い値 ($3.12 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$) であり [95]、二次代謝産物生合成に関わる加水分解酵素として同等の触媒効率を有していることが分かった。

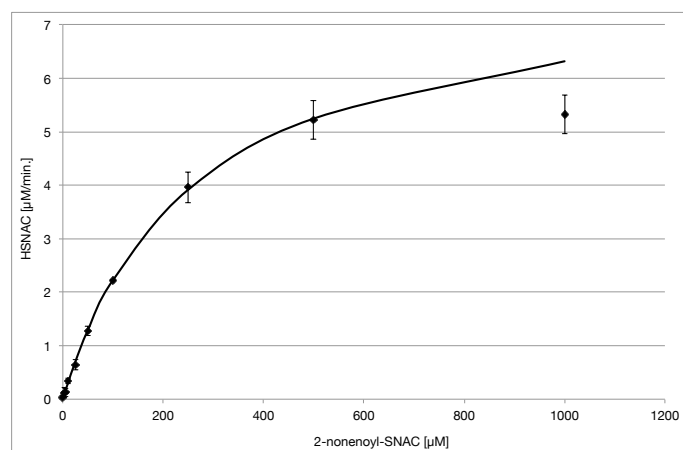
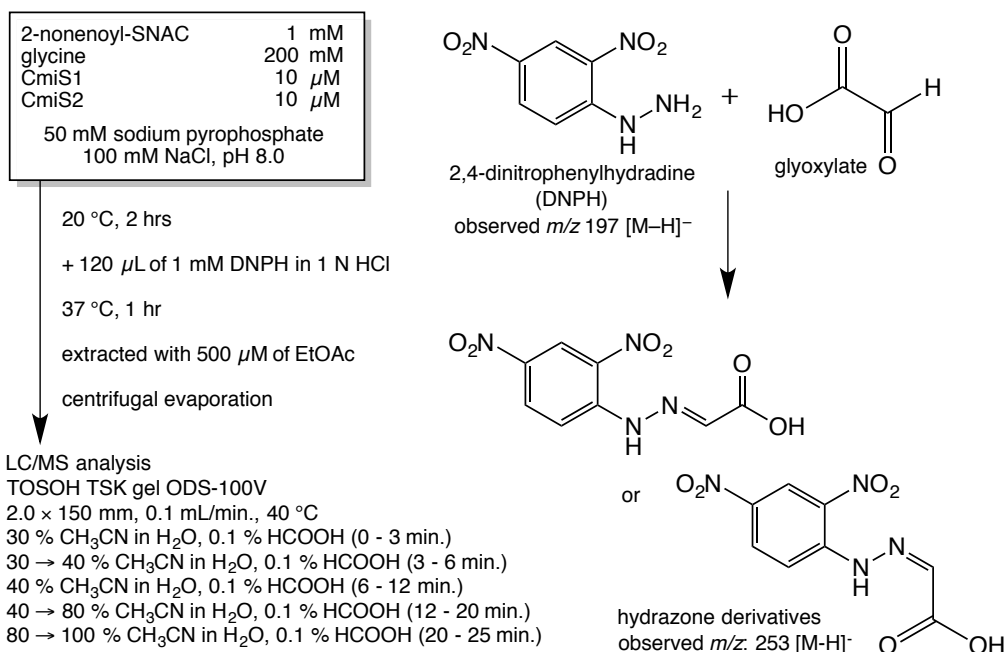


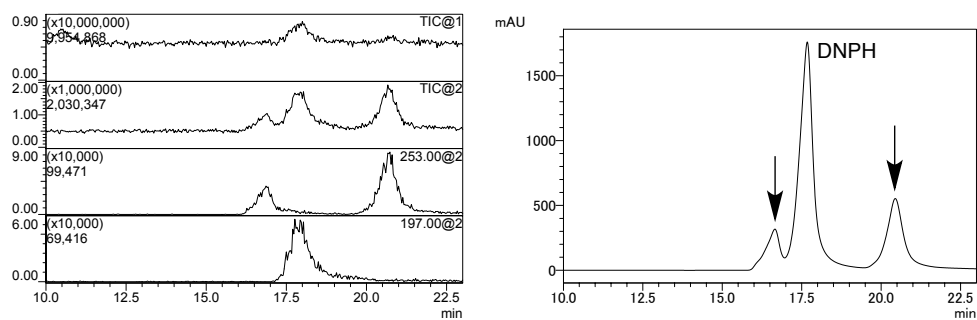
Fig. 104 CmiS1 の 2-ノネノイル-SNAC に対する酵素反応速度解析

4.9.4 グリオキシル酸の検出

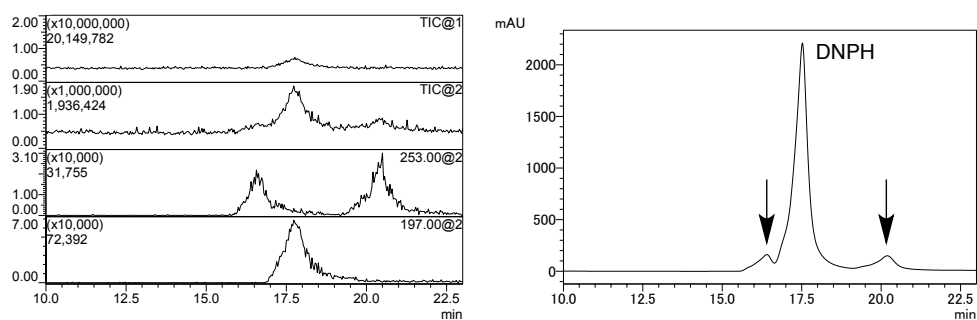
CmiS2 が他のグリシンオキシダーゼと同様の酸化反応を行っているとすれば、副生成物として グリオキシル酸が生成するはずである。グリオキシル酸などのアルデヒドを LC/MS で検出するには、ジニトロフェニルヒドラジン (DNPH) などで誘導体化し、得られたヒドラゾン誘導体を解析する手法が一般的である。そこで CmiS1, CmiS2 酵素反応溶液に DNPH を加えて誘導体化し、これらを LC/MS で解析した。その結果、 m/z 253 $[\text{M}-\text{H}]^-$ を示すグリオキシル酸ヒドラゾン誘導体を検出することが出来た。基質を加えてない時にもこのピークを検出したが、これは CmiS2 がグリシンに対して弱い活性を有することと対応しており、矛盾しない結果であると考えられる。



1 mM glyoxylate



all



without substrate

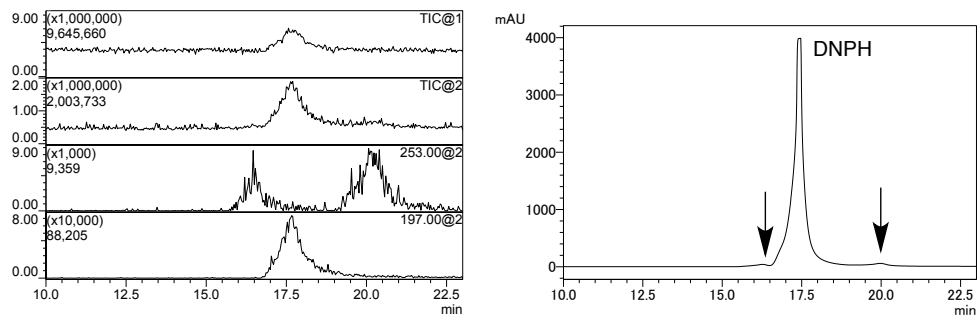


Fig. 105 グリオキシル酸の検出

4.10 まとめ

本章の研究をまとめると、投与実験や遺伝子解析では解明出来なかった、クレミマイシン開始基質合成におけるアミノ基導入反応が、CmiS1, CmiS2 によって触媒されていることを明らかにした。アミノ酸配列の相同性解析では、CmiS1 が脂肪酸-CoA チオエステラーゼである可能性が高いことが示唆されたが、驚くべきことにグリシンを 2-ノネン酸チオエステルヘマイケル付加させ、更にチオエステルを加水分解するという、2つの触媒機能を有していることを明らかにした。そして、CmiS2 は CmiS1 酵素反応生成物を酸化し、加水分解してグリオキシル酸を遊離させる役割を持っており、これら 2つの酵素によって 3-アミノノナン酸の生合成が行われることを見出した。

この 2つの酵素反応を試験管内で再現出来たことにより、CmiP2 の KR ドメイン、CmiP2, CmiP3 に跨がって存在している DH ドメインが、何れも活性型のドメインであることが強く示唆された。そこで、今までに構造が解かれている、エリスロマイシン生合成に関わる PKS の DH ドメイン EryDH4 や、キュラシン (curacin) 生合成に関わる PKS の各 DH ドメイン CurF, CurH, CurJ, CurK とのマルチプルアライメント解析を行ったところ、Fig. 106, 107 のようになった。CmiP2-CmiP3 DH ドメインは、それぞれ活性に必須なヒスチジンとアスパラギン酸を有しており、他の DH ドメインの N 末部分、C 末部分と高い相同性を示した。また $\beta 6$ シートと $\alpha L1$ ヘリックスの間のループ部分でこれらの部分ドメインは分断されている。この部分はキュラシン生合成における DH でも可動性が高く、構造が決定出来なかったものがあり、触媒活性およびタンパク質の構造の保持にはあまり寄与していないと考えられる。更に SWISS-MODEL を用いて CmiP2, CmiP3 の DH ドメインの三次元構造をモデリングしてみると、EryDH4 を鋳型とした予想構造を得ることができ、Fig. 108 の右側に示すように、それぞれ独立したホットドッグ構造を形成することが示唆された。これらは Fig. 108 中央に図示するようにヘテロダイマーを形成し、デヒドラターゼ活性を発現していると考えられる。BE-14106 及び ML-449 生合成に関わる BecA-BecC, MlaA2-MlaC の各酵素も同様の分断された DH ドメインが存在し、同じ部分で切断されていることから、その開始基質伸長反応は同様の機構で進行するものと考えられる。

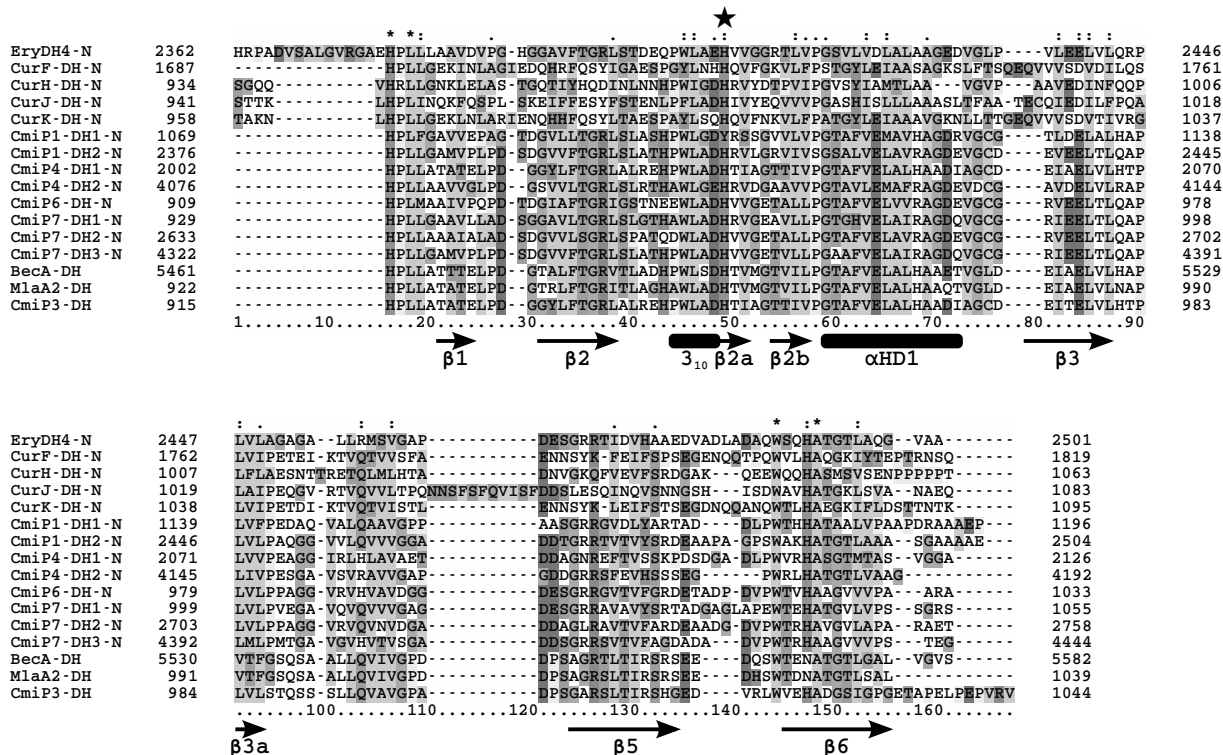


Fig. 106 EryDH4, CurF, CurH, CurJ, CurK の DH ドメイン N 末部分と BecA, MlaA2, CmiP3 に存在する DH ドメインとのマルチプルアライメント (星印は活性に必須な His 残基を、矢印および棒はそれぞれ結晶構造解析により解明された構造要素を示す。)

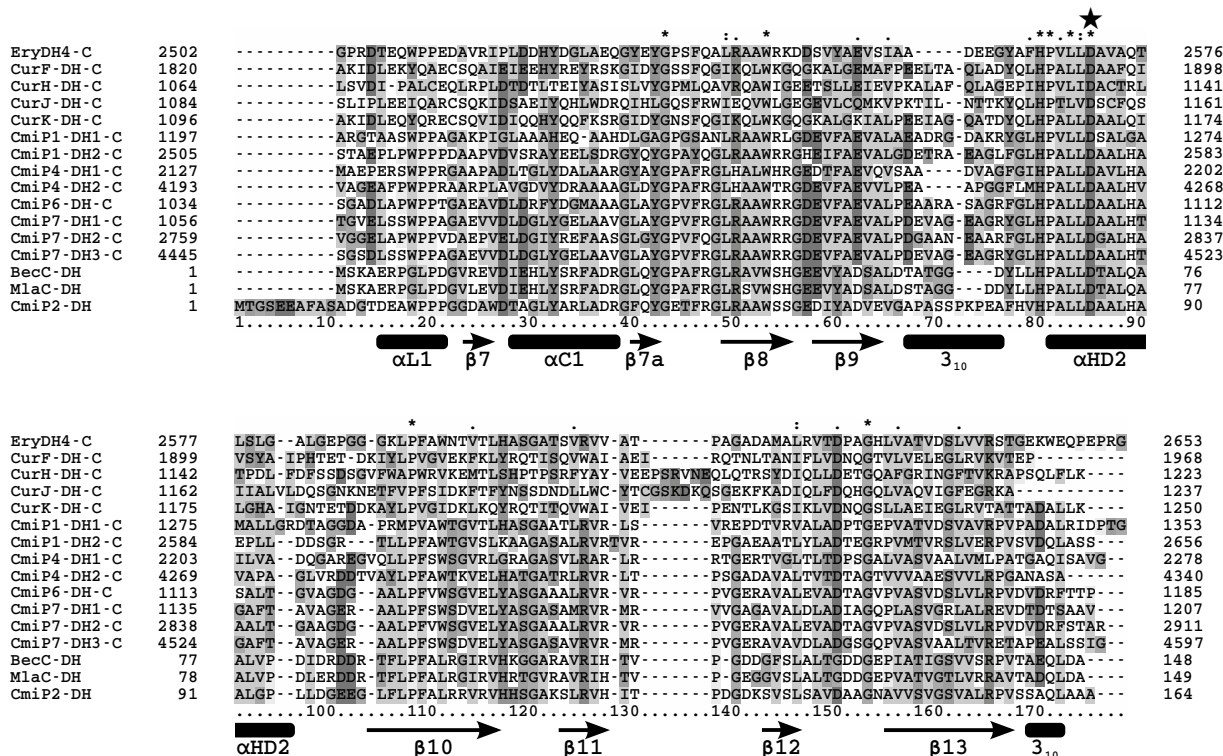


Fig. 107 EryDH4, CurF, CurH, CurJ, CurK の DH ドメイン C 末部分と BecC, MlaC, Cmi2 に存在する DH ドメインとのマルチプルアライメント (星印は活性に必須な Asp 残基を、矢印および棒はそれぞれ結晶構造解析により解明された構造要素を示す。)

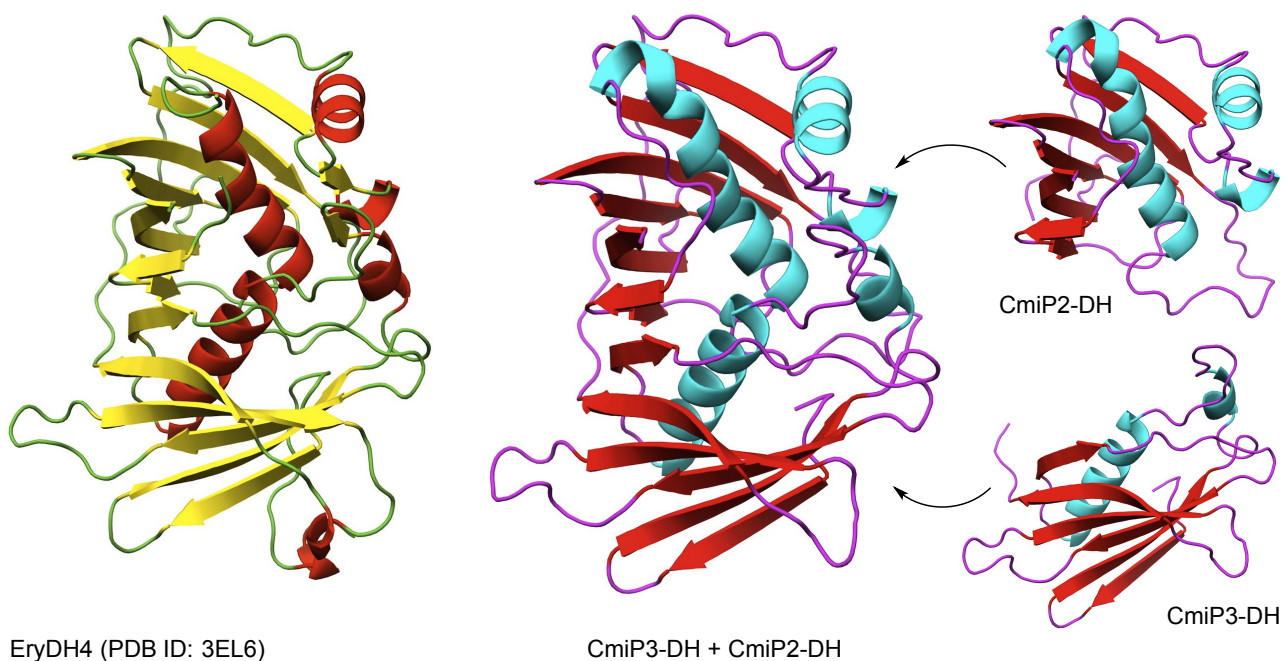


Fig. 108 EryDH4 の結晶構造 (PDB ID: 3EL6) と、これを鋳型としてモデリングされた CmiP2, CmiP3 の DH ドメインの予測構造 コイル部分は α -ヘリックス、矢印は β -シートをそれぞれ表している。

本章後半で行った酵素反応解析から得た知見をまとめると以下の様になる。

- CmiS1 は 2-ノネン酸チオエステルを認識し、グリシンをマイケル付加し、加水分解する。
- チオエステル部位は CmiS1 の基質認識に重要である。
- CmiS2 は不斉炭素の立体化学を認識する。

よって、CmiS1 と CmiS2 による酵素反応機構を Fig. 109 のように予想した。すなわち、

1. CmiP4, CmiP3, CmiP2 の各機能ドメインは全て活性型であり、最終的に CmiP2 の ACP 上に 2-ノネン酸チオエステルが生合成される。
2. CmiS1 は 2-ノネノイル-ACP にグリシンをマイケル付加し、その後に加水分解を行う。
3. CmiS2 は CmiS1 によって PKS から放出された *N*-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸を認識し、カルボキシメチルアミノ基を酸化する。生じたイミンには水が付加し、グリオキシル酸が放出され、3-アミノノナン酸が生成する。

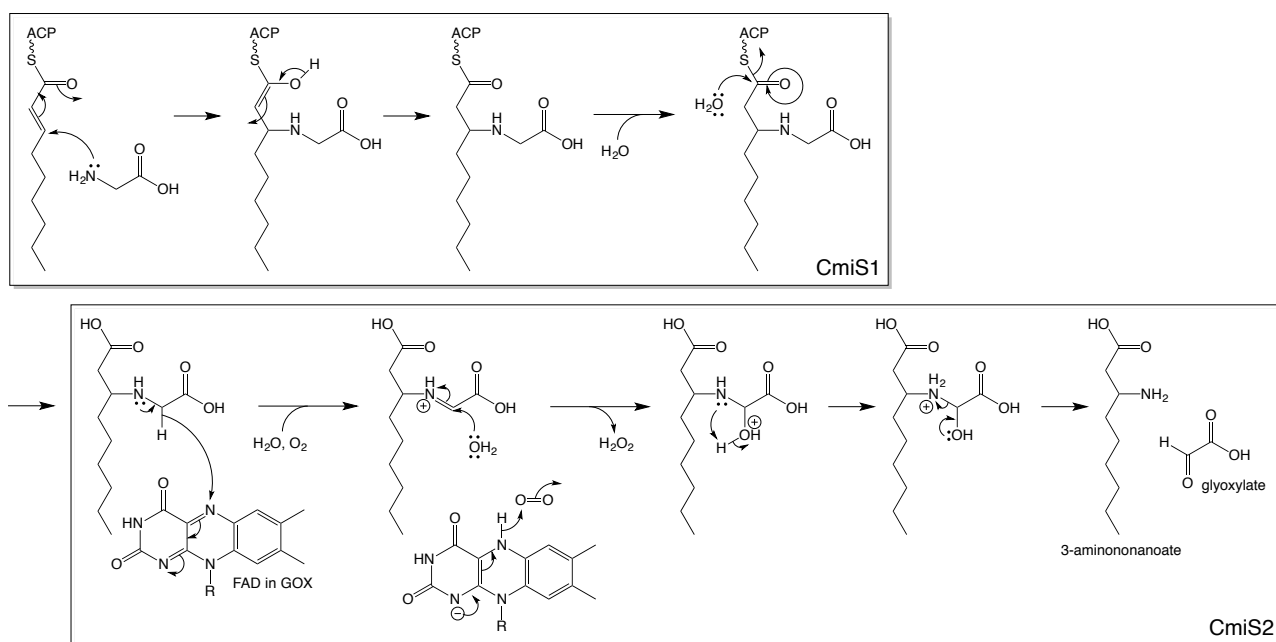


Fig. 109 本章の酵素反応解析によって予想出来る CmiS1, CmiS2 の触媒機構

ポリケチド化合物生合成においてアミノ基が導入される例は、

1. ビセニスタチンやインセドニン生合成のように開始基質がアミノ酸である場合 (Fig. 110)

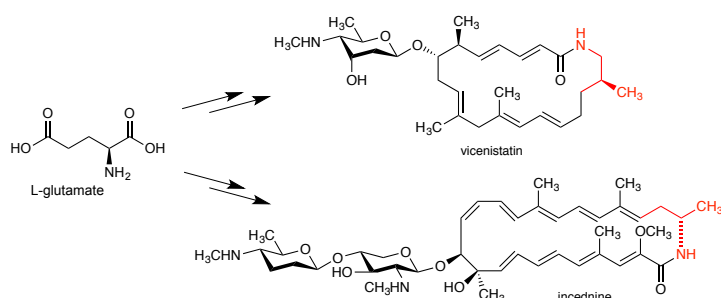


Fig. 110 L-グルタミン酸から出発するビセニスタチンおよびインセドニンの生合成

2. ツヴィッターマイシン (zwittermicin) 生合成のように、伸長基質として L-セリンから誘導されたアミノマロニル-ACP が用いられる場合 (Fig. 111) [96,97]

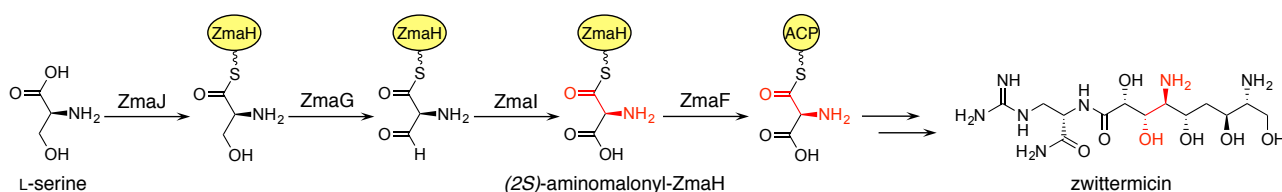


Fig. 111 ツヴィッターマイシン生合成におけるアミノマロニル-CoA の生合成機構

3. リゾキシシン (rhizoxin) 生合成のように、生合成の途中で一部 NRPS が関わる場合 (Fig. 112) [98]

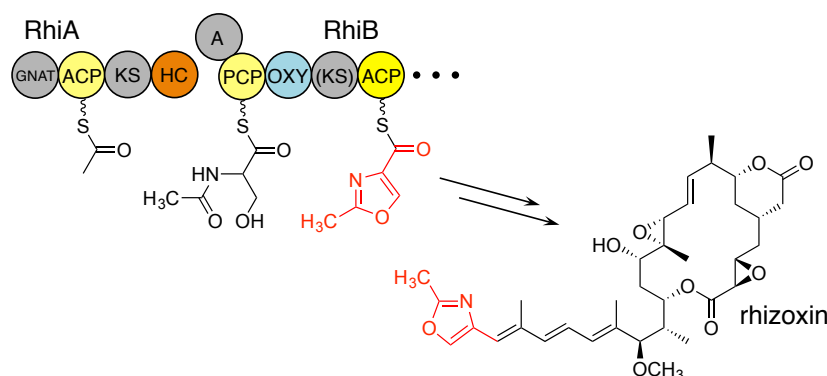


Fig. 112 リゾキシシン生合成における NRPS によるセリンの導入

4. マイコサブチリン (33 ページ、Fig. 25) [44] やノジュラリン (nodularin) 生合成 (Fig. 113) [99] のように PLP 依存型のアミノ基転移酵素ドメインが関わる場合

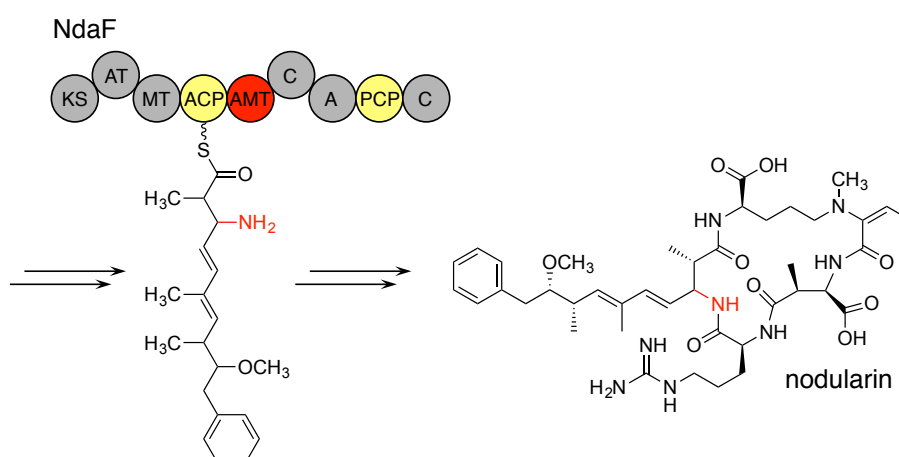


Fig. 113 ノジュラリン生合成におけるアミノ基転移反応

の何れかに分類されていた。また、この中でアミノ基供与体からアミノ基のみがポリケチド骨格へ導入されるのは、最後の PLP 依存型アミノ基転移酵素による場合のみである。

また、生体内の代謝経路において、PLP 依存型アミノ基転移酵素以外の酵素で直接的なアミノ基転移を触媒するものとして、アンモニアリアーゼの逆反応や、アンモニアムターゼのアミノ基転移反応がある。アンモニアリアーゼとは L-アミノ酸からの脱アミノ基反応を触媒する酵素であり、生成物として α,β -不飽和カルボン酸とアンモニアを与える。アンモニアムターゼとは各種 α -アミノ酸のアミノ基を β 位へ転移させる触媒活性を有する酵素である。これらの触媒機構は共通のものであると考えられ、X 線結晶構造解析により議論がなされている。Fig. 114 に示すように、アスパラギン酸やメチルアスパラギン酸のアンモニアリアーゼ (ムターゼ) では、塩基

性アミノ酸残基のプロトン引き抜きから反応が開始され、アミノ基が脱離することにより終結する (Fig. 114(A), [93])。一方芳香環を有するアミノ酸を認識するアンモニアリアーゼ (ムターゼ) では、アラニン-セリン-グリシン残基が翻訳後に環化した 4-メチリデンイミダゾール-5-オン基 (MIO) が触媒活性残基として機能するものである [94]。

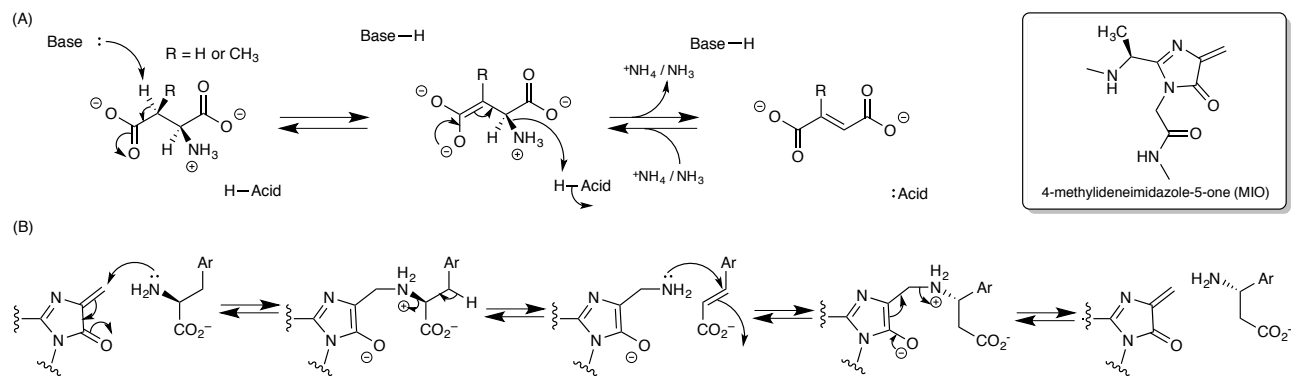


Fig. 114 (A) (メチル) アスパラギン酸アンモニアリアーゼの触媒機構 (B) MIO 含有型アンモニアムターゼの触媒機構

本章で明らかとしたクレミマイシン開始基質へのアミノ基導入反応は、これら既知の機構に分類されることなく、全く異なる機序で進行しており、本研究において初めて明らかとなったアミノ基導入機構である。

第5章 総括

本博士論文研究では、 β -アミノ酸含有型マクロラクタム配糖体クレミマイシンの生合成機構を解明を目的とし、生物有機化学的実験を駆使した包括的な研究を展開した。

第2章では安定同位体基質を用いた投与実験によって、クレミマイシンのアグリコン骨格が11個の酢酸と2個のプロピオン酸を前駆体として生合成されることを明らかにした。またシマロース部位は重水素標識したD-グルコースが取り込まれ、プロピオン酸が取り込まれる部分にはクエン酸回路を経由して酢酸も効率よく取り込まれることを明らかにした。このような投与実験はFT-NMRの発展と共に行われてきた生合成経路を解明していくための伝統的な実験手法であるが、NMRのシグナルとして明確な結果を示せるという点においては未だ強力な生合成解析の手段であることを裏付ける結果を得た。

第3章ではクレミマイシン生合成経路を遺伝子レベルで明らかにするため、その生合成遺伝子クラスターの探索を行った。シマロースの生合成に関与すると考えられた二種のデヒドラターゼ遺伝子を手掛かりとし、コスミドライブラリーからの探索を行ったところ、クレミマイシン生産菌染色体ゲノムDNA上約90 kbpの領域にPKS遺伝子、ジデオキシ糖生合成遺伝子、そして β -アミノ酸含有型マクロラクタム生合成遺伝子に特徴的な遺伝子群が存在する遺伝子クラスターを見出した。これがクレミマイシンの生合成に関わることはP450遺伝子*cmiM4*を破壊し、クレミマイシン生産能を失ったことを観測したことで確定した。しかしクレミマイシンアグリコン骨格内に存在する炭素五員環の構築機構に関する知見はこの破壊株実験で得ることが出来ず、今後解明すべき課題である。

ところで現在、このような遺伝子クラスター探索の手法は殆ど行われておらず、二次代謝産物生産菌のゲノムDNAを直接解読し、得られた情報をコンピュータ上で解析する*in silico*スクリーニング法が一般的となりつつある。本研究では*in silico*スクリーニング法が一般的になりつつある過渡期に行っていたため従来法を用いたが、今後はこの手法によって遺伝子クラスターを取得するまでの労力・期間が圧倒的に短縮され、当研究分野の進歩に大きく貢献するものと考えられる。既に当研究室でもいくつかの抗生物質生産菌に対して染色体ゲノムDNAのドラフトシーケンシングを行っており、様々な二次代謝産物生合成遺伝子情報を取得している。

第4章ではクレミマイシン開始基質のアミノ基導入反応機構の解明を目的として、*cmi*クラスターの2つの遺伝子翻訳産物に着目し、これらの機能解析を行った。結果、II型チオエステラーゼと同様にホットドッグ構造を有しながらも触媒活性残基の構成が異なるIII型チオエステラーゼに類似するCmiS1が、加水分解活性のみならず基質ヘグリシンをマイケル付加させるという、非

常に特異な酵素であるということを見出せることが出来た。この酵素ファミリーの中で過去に触媒活性が見出されたのは、Rv0098, CalE7, DynE7 の 3 つのみであり、Rv0098 はチオエステルの加水分解のみ [95]、CalE7, DynE7 についてはチオエステルの加水分解と脱炭酸反応を触媒することが報告されている (Fig. 115) [100,101]。BE-14106 及び ML-449 生合成酵素における CmiS1 ホモログ BecU や MlaU も、CmiS1 同様の機能を有するものと考えられる。

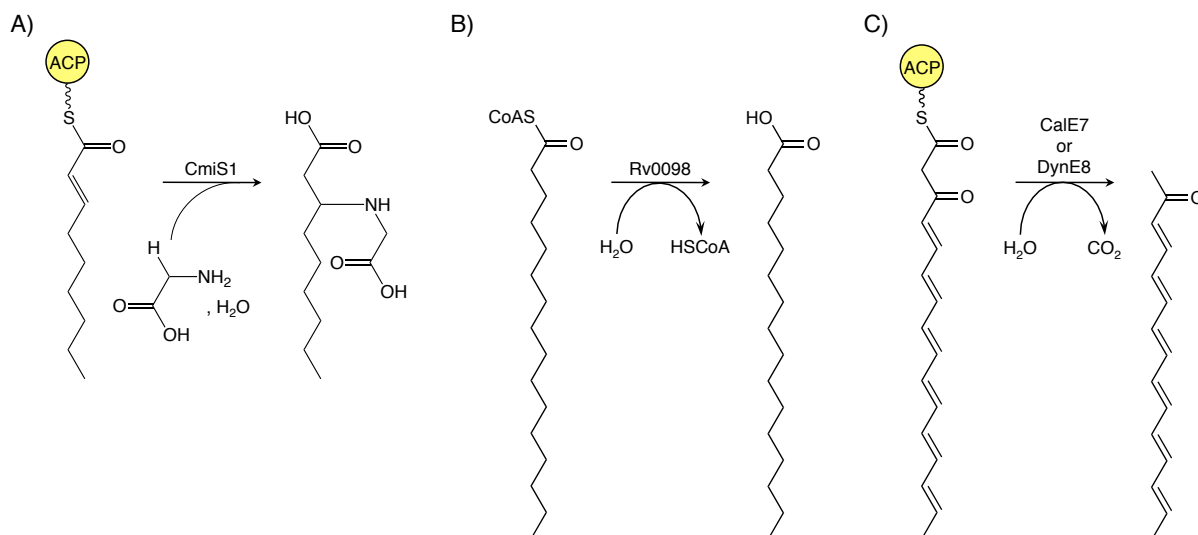


Fig. 115 機能解明がなされた FcoT ファミリーに属する酵素群 A) 本研究によって解明された CmiS1, B) パルミトイル-CoA の加水分解を触媒する Rv0098, C) 不飽和 β -ケトアシル-ACP の加水分解と脱炭酸を触媒する CalE7, DynE8

また、CmiS2 の基質認識機構も興味深い。第 4 章の研究開始当初に行った実験により CmiS2 がグリシンに対して僅かながら酸化活性を有していたことは確かめられたが、実際に認識したのは *N*-カルボキシメチル-3-アミノノナン酸である。この様な化合物を認識し、カルボキシメチル部分を酸化する酵素は今まで同定されていない。更に詳細な CmiS2 の触媒機構を解明するには、CmiS2 を結晶化し、構造を解く必要があると考えられる。

以上、本研究で得られた知見をもとにクレミマイシンの生合成機構を確定できたものを含め再度推定すると、Fig. 116 のようになる。すなわち、

1. クレミマイシンの開始基質は、CmiP4 ヘプロピオン酸から誘導されたメチルマロニル-CoA が脱炭酸を伴いながら導入されることで、その生合成が開始される。PKS 上で 2-ノネノイル-ACP が生成されると、CmiS1, CmiS2 の働きにより 2-ノネン酸 β 位にアザ-マイケル付加反応とグリオキシル酸の脱離によってアミノ基が導入され、3-アミノノナン酸が生じる。
2. 3-アミノノナン酸は次の PKS 伸長反応において非酵素的な 6 員環形成が起こらないよう、そのアミノ基が別のアミノ酸で保護される。この経路にはビセニスタチン生合成酵素 VinLMN と相同性の高い CmiS3, CmiS4, CmiS6 が関わると思われる。
3. アミノ基で保護されジペプチドとなった開始基質は VinK ホモログ CmiS5 によりアグリコン骨格構築に関わる PKS へと導入され、伸長反応が進行する。
4. 9 回の伸長反応の後、CmiM6 によって保護基として用いていたアミノ酸を加水分解して脱保護し、CmiP6TE ドメインによるマクロラクタム環化が起こる。
5. P450 酵素 CmiM4 等、種々の酸化酵素、酸化還元酵素により、分子内炭素五員環が形成され、クレミマイシンアグリコン骨格が完成する。
6. CmiC2-C7 により別経路で生合成された TDP-L-ジギトキソースが糖転移酵素 CmiM5 によりクレミマイシンアグリコンへ導入された後、CmiC1 によってジギトキソース 3 位が *O*-メチル化され、クレミマイシンの生合成が完了する。

これは他の β -アミノ酸含有型マクロラクタム生合成機構を解明するための手掛かりとなる知見となった。例えば、クレマイシンに類似した β -アミノ酸開始基質を有しているマクロラクタムの生合成遺伝子クラスター中には、*cmiS1* や *cmiS2* と相同性の高い遺伝子が存在し、これらの翻訳産物がアミノ基導入に関わるだろうと推測出来る (Fig. 117)。一方、ヘロナミドの β -アミノ酸部位には、BE-14106 や ML-449 のように移動を伴った二重結合が見られる。これは CmiS1 の触媒機構から推定すると、CmiS1 ホモログ酵素 BecU や MlaU による触媒反応が開始される前に二重結合が移動していると考えられる。これがどの酵素により触媒されているかまでは分からないが、同じ酵素ファミリーに属する CalE7 や DynE7 が、脱炭酸反応という予想出来なかった反応を触媒していることから、BecU, MlaU が基質にグリシンをマイケル付加する前に、二重結合の移動をも触媒している可能性もある。

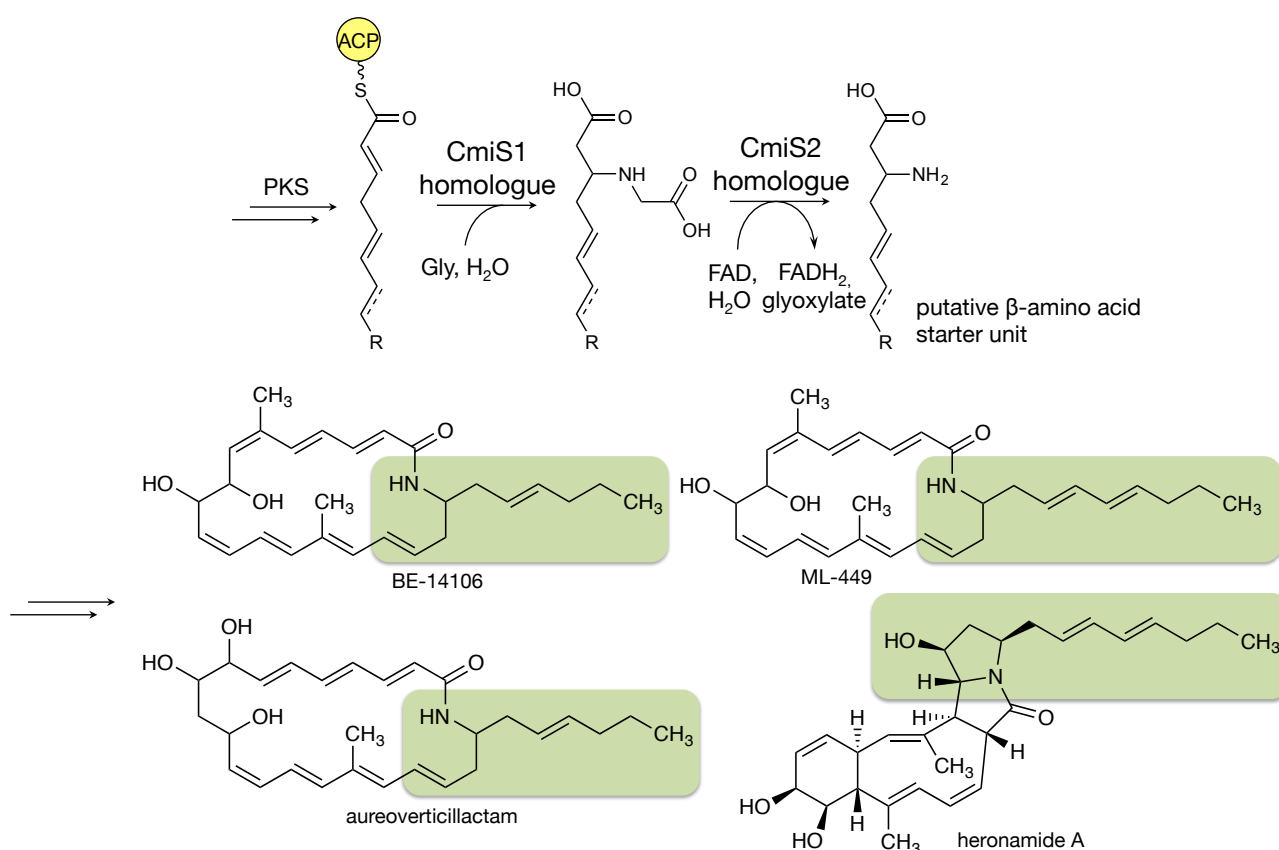


Fig. 117 クレマイシンの推定生合成機構を基に推定した β -アミノ脂肪酸含有型マクロラクタムの開始基質生合成機構

ヒタチマイシン、ピセアマイシンの炭素五員環生合成についても、P450 などの酸化酵素によりラクタム環が酸化され、それを起点としてマイケル付加反応、ケト-エノール互変異が生じ、最終的にクレマイシンと同様の炭素五員環が構築されると推察出来る。一方、クレマイシン生合成における炭素五員環の構築に関わる酵素遺伝子を完全に決定出来ていないことから、ヒタチマイシン、ピセアマイシン生合成遺伝子クラスターが獲得出来れば、そこから *cmi* クラスターと共

通する遺伝子を見出すことで、炭素五員環に関わる酵素遺伝子を決定することが出来る可能性がある。

一方、今まで積み重ねられてきた二次代謝産物生合成マシナリーと本研究で明らかにした知見を基に、新規の構造・生理活性を有する化合物を遺伝子操作で作りに出していく研究へ展開することも重要であると考え。

例えば、本研究で明らかにした *cmi* クラスターをはじめ、 β -アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質の生合成遺伝子クラスターを比較していくと、開始基質の保護および PKS への導入に関わる酵素遺伝子群がサブクラスターを形成していることが分かる (Fig. 118)。よってこれらの遺伝子群を、他の β アミノ酸含有型マクロラクタム抗生物質生合成遺伝子クラスターのものと丸ごと交換し、対応する開始基質を外部から投与してやれば、開始基質の構造が互いに交換されたマクロラクタムを作り出すことが出来る可能性がある (Fig. 119)。

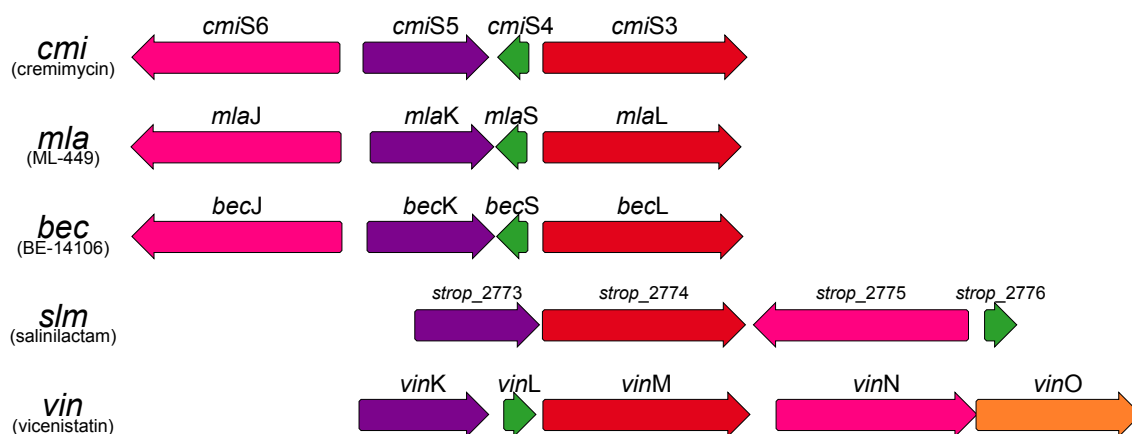


Fig. 118 クレミマイシン, ML-449, BE-14106, サリニラクタム, ビセニスタチン生合成遺伝子クラスターにおける開始基質修飾酵素遺伝子群 (*cmiS3*–*S6* は比較しやすいよう、逆向きに配置している。)

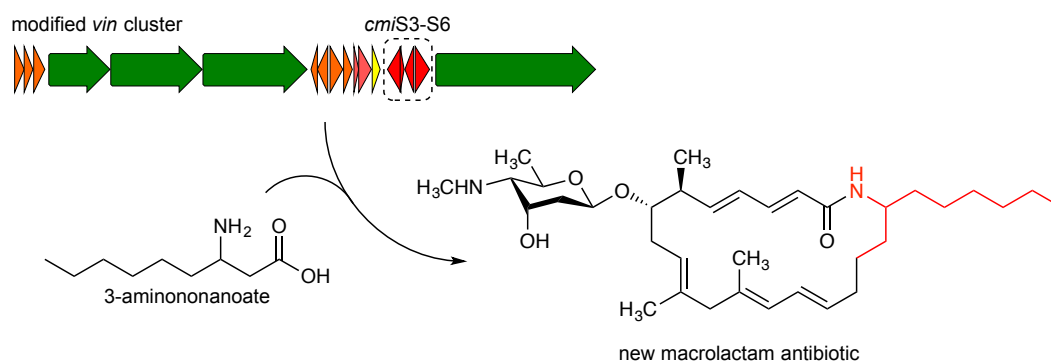


Fig. 119 *vinKLMNO* を、対応する *cmiS3*–*S6* と交換した変異株を作成し、3-アミノノナン酸を投与した時に得られると予想される化合物

また、 β -アミノ酸含有型マクロラクタムの生合成遺伝子クラスターに共通して見られるペプチダーゼ、*vinJ* ホモログ遺伝子を手掛かりに *in silico* スクリーニングを行うと、今までマクロラクタムの単離報告の無い生物種のゲノム DNA から、類似の遺伝子クラスターが見出されることがある。これらは全て β -アミノ酸含有型マクロラクタムの生合成に寄与している可能性が有り得る。

from *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53653 genome DNA



ML-449 Biosynthetic Gene Cluster (*mIa* cluster)



Fig. 120 *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53563 のゲノム DNA 配列から見出された ML-449 生合成遺伝子クラスターと酷似した二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (白抜きは未読のギャップ領域を示している)

これを応用し、本論文第 4 章で明らかにしたアミノ基導入酵素 CmiS1, CmiS2 を含むオペロン *cmiS1-cmiP2-cmiS2* を、米国国立生物工学情報センターの遺伝子データベース GenBank に登録されている全ての遺伝子情報と照会したところ、同様の構成を持つオペロンを *Streptomyces hygroscopicus* ATCC 53563 のゲノムショットガンシーケンスのデータから見出すことが出来た (Fig. 120)。さらにこの遺伝子群の周辺を探索したところ、これは ML-449 生合成遺伝子クラスターと酷似しており、この放線菌が β -アミノ酸含有型マクロラクタムを生産する潜在能力があることを示唆する結果を得た。これらの遺伝子クラスターは、保持している菌が細胞内で転写することなく存在している、いわゆる休眠遺伝子である可能性がある。これらを一挙に高発現プロモーター支配下領域にクローニングし、異種発現させて得られる化合物を単離すれば、新たな構造を有する天然物を今まで以上に取得出来る可能性が高い。

本研究はこのような遺伝子解析を基にした天然有機化合物ライブラリーの構築ならびに新規生理活性物質の創出研究の礎になるものと考ええる。

Materials and Methods

General Procedures

Purification, enzymatic reaction, and analysis of low molecular compounds

Distilled and ion-exchanged water were prepared by Autostill WG-25 (Yamato Kagaku), and ultra-pure water was prepared by MilliQ-Labo from distilled water or Direct Q from tap water (Millipore).

^1H , ^2H , ^{13}C -NMR, DEPT, COSY, HMQC, HMBC and INDEQUATE spectra were recorded in a mixture of $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (^1H , ^{13}C , and INADEQUATE) or $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (^2H) or CDCl_3 (for substrate synthesis) with a JEOL Lambda 400, a JEOL AL 400 or a JEOL ECX 500 or a Bruker DRX 500 spectrometer. Spectra were calibrated to residual solvent signals with resonances at $\delta_{\text{H/C}}$: 3.31/49.0 ppm (CD_3OD) or $\delta_{\text{H/C}}$: 7.26/77.2 ppm (CDCl_3) and δ_{H} : 0 ppm (TMS). HPLC/PDA was performed on Waters 996 Photodiode Array Detector combined with Hitachi L-6250 Intelligent Pump and Hitachi Column Oven L-7300. Obtained data was analyzed by Waters EmpowerTM2. LC/ESI-MS was performed on Shimadzu LCMS-2010EV system or Thermo Finnigan LCQ fleet combined with Shiseido NanoSpace SI-1 system and Shimadzu Column Oven SSC-2300.

Gene manipulation

Streptomyces sp. MJ635-86F5 was kindly gifted from Microbial Chemistry Research Center, Institute of Microbial Chemistry. *E. coli* DH5 α and plasmid vectors LITMUS28, LITMUS28i (New England Biolabs), and pBlueScript II SK (+) (Agilent Technologies) were used for routine subcloning of DNA fragments. Cosmid vector pOJ446 [102] was used for construction of the cosmid library. *E. coli* BW25113/pIJ790, *E. coli* ET12567/pUZ8002 and plasmid vectors pIJ773, pIJ778, and pET28a (+) were used for gene inactivation experiments. *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* RosettaTM2 (DE3) pLysS (Novagen), and *E. coli* SoluBL21TM (Genlantis Inc.), and plasmid vectors pET28a (+), pET30a (+) (Novagen), pCold I (Takara Bio), and chaperone expression plasmids pGro7, pKJE7 (Takara Bio) were used for the protein expression. Restriction enzymes and modification enzymes were purchased from Takara Bio. General DNA manipulations in *E. coli* were performed according to the standard protocols. PCR was performed with a GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) or PCR Thermal Cycler Dice[®] gradient TP600 (Takara). Oligo DNAs for PCR primers were synthesized by Greiner bio-one. DNA sequencing was performed on double-stranded DNA templates by the dideoxynucleotide chain-termination method with a Model4000-1 (LI-COR) and a Epicentre SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit. During this study, resultant plasmids were begun to be submitted to FASMAC Co., Ltd to be sequenced by 3130xl genetic analyzer or 3730xl DNA analyzer (Applied Biosystems). Obfuscated DNA fragments by the second structure were submitted to Nippon Genetech CO., LTD. to be sequenced by CUGA[®] sequencing system. Obtained DNA sequence data was analyzed by Geneious (Biomatters Ltd.).

Cultivation of organisms

Medium composition

LB (Lysogeny Broth) medium

used for the culture of *E. coli*

1 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 1 % NaCl in deionized water

TB (Terrific Broth) medium

used for the culture of *E. coli*

1.2 % tryptone, 2.4 % yeast extract, 8 mL/L glycerol, 0.94 % K₂HPO₄, 0.22 % KH₂PO₄ in deionized water

SOB medium

used for preparation of electrocompetent cells

2 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl. After sterilization, MgSO₄ · 7 H₂O and MgCl₂ · 6 H₂O were added to give final concentration of each 20 mM and 10 mM.

SOC medium

used for regenerating transformed competent cells

2 % tryptone, 0.5 % yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl. After sterilization, MgSO₄ · 7 H₂O, MgCl₂ · 6 H₂O and D-glucose were added to give final concentration of each 10 mM, 10 mM, 20 mM.

GYT medium

used for the storage of electrocompetent cells

10 % glycerol, 0.125 % yeast extract, 0.25 % tryptone

Cremimycin seed medium [26]

used for the preculture of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5

2 % galactose, 2 % dextrin, 1 % BactoTM Soytone, 0.5 % corn steep liquor, 1 % glycerol, 0.2 % (NH₄)₂SO₄, CaCO₃ in deionized water, pH 7.4

TSB (Tryptone Soya Broth) medium

used for the culture of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5

1.7 % tryptone, 0.3 % BactoTM soytone, 0.5 % NaCl, 0.25 % KH₂PO₄, 0.25 % D-glucose in tap water, pH 7.3

Modified TSB (Tryptone Soya Broth) medium [24]

used for the preculture of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5

1.7 % tryptone, 0.3 % BactoTM soytone, 0.5 % NaCl, 0.25 % KH₂PO₄, 2 % D-glucose in tap water, pH 7.3

Cremimycin production medium [26]

used for the culture of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 and cremimycin production
5 % D-glucose, 1 % soy bean meal, 0.4 % polypepton, 0.1 % yeast extract, 0.4 % meat extract,
0.25 % NaCl, 0.5 % CaCO₃ in deionized water, pH 7.4

0.3× BPS medium [24]

used for the culture of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 and cremimycin production
0.9 % oatmeal, 0.15 % malt extract, 0.09 % yeast extract, 0.012 % MgSO₄ · 7H₂O, 0.03 %
NaCl, 0.15 % CaCO₃, 0.9 % soluble starch, 1.1 % MOPS were dissolved in tap water and pH
was adjusted to 7. After sterilization, sterilized D-glucose aqueous solution was added to give
a final concentration of 1 %.

ISP2 medium

used for the sporulation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, intergenic conjugation, and cultiva-
tion of gene inactivation mutant
0.4 % yeast extract, 1 % malt extract, 0.4 % D-glucose, pH 7.3

ISP4 medium

used for the sporulation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, intergenic conjugation
1 % soluble starch, 0.1 % K₂HPO₄, 0.1 % MgSO₄ · 7H₂O, 0.1 % NaCl, 0.2 % (NH₄)₂SO₄, 0.2
% CaCO₃, 0.0001 % FeSO₄ · 7H₂O, 0.0001 % MnCl₂ · 4H₂O, 0.0001 % ZnSO₄ · 7H₂O, pH
7.3

Bennet's medium

used for the sporulation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, intergenic conjugation
0.1 % yeast extract, 0.1 % meat extract, 0.2 % NZ amine, type A, 1 % D-glucose, pH 7.3

MS (Mannitol-Soya flour) medium

used for the sporulation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, intergenic conjugation
2 % mannitol, 2 % soya flour, pH 7.3, autoclaved twice

V0.1 medium [74]

used for the sporulation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, intergenic conjugation
0.05 % yeast extract, 0.03 % meat extract, 0.24 % soluble starch, 0.01 % D-glucose, 0.05 %
Bacto peptone, pH 7.3

YS (Yeast-Starch) medium

used for the culture and sporulation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, intergenic conjugation
0.2 % yeast extract, 1 % soluble starch, pH 7.3

SK2 (SK No. 2) medium

used for the sporulation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5, intergenic conjugation
0.5 % yeast extract, 0.3 % meat extract, 2 % soluble starch, 0.5 % D-glucose, 0.5 % peptone,
0.02 % KH₂PO₄, 0.06 % MgSO₄ · 7H₂O, pH 7.3

R2YE medium

used for *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 protoplast preparation and protoplast regeneration

10.3 % sucrose, 0.025 % KH_2SO_4 , 1.012 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 % D-glucose, 0.01 % Difco Casaminoacids, 0.5 % yeast extract, 0.573 % TES were dissolved in tap water. After sterilization, following sterilized solutions were added to 80 mL of culture; 1 mL of 0.5 % KH_2PO_4 , 8 mL of 3.68 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mL of 20 % L-proline, 10 mL of 5.73 % TES buffer (pH7.2), 0.2 mL of trace element solution, 0.5 mL of 1 N NaOH.

R5 medium

used for regeneration of protoplast of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5

10.3 % sucrose, 0.025 % KH_2SO_4 , 1.012 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 % D-glucose, 0.01 % Difco Casaminoacids, 2 mL/L trace element solution, 0.5 % yeast extract, 0.573 % TES were dissolved in tap water. After sterilization, separately sterilized 1 mL of 0.5 % KH_2PO_4 , 0.4 mL of 5 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1.5 mL of 20 % L-proline, 0.7 mL of 1 N NaOH were added to 100 mL of sterilized culture respectively.

R1M medium [103]

used for regeneration of protoplast of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5

10.3 % sucrose, 0.1 % D-glucose, 0.01 % casamino acids, 0.025 % K_2SO_4 , 0.2 % L-asparagine, 0.5 % polypepton, 0.8 % yeast extract, 0.407 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ were dissolved in tap water. After sterilization, separately sterilized 100 mL of 5.73 % TES buffer (pH 7.2), 100 mL of 7.37 % of $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, and 10 mL of 0.5 % of KH_2PO_4 were added to 790 mL of sterilized culture respectively.

YEME medium

for preparation of protoplast of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5

0.3 % yeast extract, 0.5 % peptone, 0.3 % malt extract, 1 % D-glucose, 34 % sucrose. After sterilization, separately sterilized 2.5 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 20 % glycine were added to give a final concentration of 5 mM and 0.5 %, respectively.

CRM medium

for electroporation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5

1 % D-glucose, 10.3 % sucrose, 1 % $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1.7 % tryptone, 0.3 % soytone, 0.5 % NaCl, 0.25 % KH_2PO_4 , pH 7.3

trace element solution

for preparation of R2YE, R5 medium

40 mg/L ZnCl_2 , 200 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 10 mg/L $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Appropriate antibiotics were added to the culture on demand after sterilization and Bacto™ agar (for *Streptomyces* cultivation) or agar powder (Kanto Chemical Co., Inc.) was added to give a final concentration of 1.5–2 % to prepare agar medium before sterilization.

Preparation of *E. coli* BW25113/pIJ790 electrocompetent cells

E. coli BW25113/pIJ790 was inoculated in 5 mL of LB medium containing 25 $\mu\text{g/mL}$ chloramphenicol and cultured at 30 °C, overnight. 100 μL of resultant culture was then added to 10 mL SOB medium containing 20 mM MgSO_4 and 25 $\mu\text{g/mL}$ chloramphenicol. Cultivation was performed at 30 °C to OD_{600} of 0.4. Resultant cells were harvested and washed with chilled sterilized water, 10 % glycerol twice. Finally washed cells were resuspended in GYT medium or 10 % glycerol.

Feeding studies

Production and purification of cremimycin

Cultivation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 for the production of cremimycin was carried out in 0.3 $\times$ BPS medium adjusted to pH 7.0 with 2 M of NaOH. Fermentations were performed in 500 mL of Erlenmeyer flask with 100 mL of medium. The production cultures were inoculated with 5% (vol/vol) of the preculture with a 0.5 $\times$ modified TSB medium (30 °C, 3 days, 200 rpm). Fermentations were run for 3 weeks at 27 °C with agitation (200 rpm). Resultant mycelia was extracted with $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1) and filtered. The extract was concentrated *in vacuo*. Resultant material was dissolved in CH_3OH , and then extracted with a mixture of hexane/ CH_3OH (1:1). The lower layer was collected and concentrated. The material containing cremimycin was dissolved in a mixed solvent of $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (4:1) then washed with distilled water three times and brine. The organic layer was collected and concentrated by evaporation. The residue was dissolved in a mixed solvent of $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (4:1) and precipitated by adding hexane. The precipitate was collected by centrifugation and washed twice with hexane. Resultant faint pink powder was further purified by the gel filtration (LH-20, $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ = 4:1).

Administration of stable isotope-labeled substrates

[1- ^{13}C] CH_3COONa , [1,2- $^{13}\text{C}_2$] CH_3COONa , [1- ^{13}C]propionate, and succinate- d_4 were purchased from Sigma–Aldrich or Isotec Inc. D-[6,6- $^2\text{H}_2$]glucose was synthesized according to the previous report [104]. Preculture and culture of cremimycin-producing strain were carried out by the same procedure as described above. After 4 days of the main culture, each stable isotope-labeled substrate was added at the final concentration of 0.5 %. Resultant isotope-labeled cremimycin was isolated in the same manner described above.

Search for the cremimycin biosynthetic gene cluster

Isolation of genomic DNA from cremimycin-producing strain

Total DNA was isolated from *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 following the procedure; Cremimycin-producing strain was cultured in modified TSB medium at 30 °C for 3 days. Resultant mycelia was

washed with 0.3 M (10.3 % w/w) sucrose and resuspended in TE25S buffer (0.3 M sucrose, 25 mM Tris-HCl (pH 7.5), 25 mM EDTA). 10 mg lysozyme (from chicken egg white, purchased from Sigma-Aldrich) was added to the cell suspension and incubated with gentle shaking at 37 °C for 2 hours. Then SDS solution (3.3 mL of 0.5 M EDTA, 0.84 mL of 10 % SDS, 3.3 mg of pronase) was added to the solution and the solution was additionally incubated for 1 hour. Genomic DNA was extracted by phenol-chloroform extraction and chloroform extraction, and subsequently purified by isopropanol precipitation and ethanol precipitation. Resultant DNA was dissolved in TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) and incubated with ribonuclease A to remove contaminated RNA at 37 °C for 1 hour. Resultant DNA was isolated by phenol-chloroform extraction, chloroform extraction, isopropanol precipitation, and ethanol precipitation as described above. Resultant purified genomic DNA was briefly dried and dissolved in TNE buffer and stored at 4 °C until use.

Obtaining a probe for exploring the cremimycin biosynthetic gene cluster

Hexose-2,3-dehydratase and 4,6-dehydratase coding genes were amplified using the degenerate primer pairs 23DH1 (forward, 5'–CGG GCG STT CTT CWC CRT CGA GG–3') and 23DH3C (reverse, 5'–GMK CCC TGC TCG GAC TGG AG–3'), 46DHN1 (forward, 5'–GCS GAG WSS CAC GTS GAC CG–3') and 46DH3C (reverse, 5'–CGB ACG TTS DBS CCG TCS CCG TA–3'), respectively. PCR products were cloned into pT7-blue (Novagen) or pGEM-T Easy (Promega).

Construction of cosmid library

The cosmid library for *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 was constructed in the cosmid vector pOJ446. Genomic DNA was partially digested with *Sau*3A I and dephosphorylated before ligation with *Hpa* I-CIAP- and *Bam*H I-treated pOJ446. Resultant ligation mixture was packaged into λ -phage followed by phage transfection to *E. coli* XL1-Blue MRF' (Stratagene) by using protocols described in the Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene).

Screening of cosmid library

The library was plated out on LB agar plates containing 5 μ g/mL tetracycline and 50 μ g/mL geneticin. 1779 colonies were transferred to other two LB plates containing 5 μ g/mL tetracycline and 50 μ g/mL geneticin. In addition, 100 colonies were collected to one tube containing LB medium supplemented with 5 μ g/mL tetracycline, 50 μ g/mL geneticin. Resultant 18 tubes were then incubated with shaking at 37 °C overnight. After the cultivation, glycerol was added to the tubes to give a final concentration of 15 % (v/v) and stored at –80 °C. 1779 colonies grown on LB plate were then transferred to Hybond-N+ membrane (GE healthcare) and lysed with denaturant solution (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) for 15 min. and neutralized with neutralizer buffer (1 M Tris-HCl, 1.5 M NaCl) for 5 min., two times. Finally the membranes were soaked in 2 $\times$ SSC buffer to remove

colony debris and washed in 5× SSC buffer. This denaturation operation was performed two times then dried and baked at 80 °C for 2 hours. Hybridization was carried out as described for the DIG system (Roche Applied Science). Two positive cosmid genes were obtained at the first screening, named Cosmid73 and Cosmid106. These two genes were digested with various restriction enzymes and resultant DNA fragments were sequenced. Sequencing data showed that Cosmid73 and Cosmid106 were overlapped with 9.3 kb region including NDP-4-keto-6-deoxyhexose-2,3-dehydratase, NDP-hexose-4,6-dehydratase, and NDP-1-glucose-coding genes, but suggested that outside of them involved in the polyketide biosynthesis, the second screening was carried out using the end regions of cosmid genes as DNA probes. As a result, additional two positive cosmid genes, named Cosmid25 and Cosmid59 were obtained. Cosmid25, Cosmid106, and Cosmid59 were submitted to MacroGen Japan Co. Ltd. for shotgun sequencing. Obtained sequence data was annotated briefly by MiGAP and re-analyzed in detail by FramePlot 4.0beta and BLAST. Additionally gDNA of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 was submitted to Hokkaido System Science Co., Ltd. for whole genome shotgun draft sequencing. Obtained data was assembled by Velvet, and resultant contigs were assembled again with cosmid shotgun sequencing data by Geneious.

Genome walking by inverse PCR

Genomic DNA (3 µg) of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 was completely digested with several restriction enzymes, respectively. Resultant each 0.75 µg gDNA was self-ligated by ligation mix (Takara). Inverse PCR was performed with the use of primer pairs iPCR₋ F (5′–GGG TCG ACG ATG CCT CGC AG–3′) and iPCR₋ R (5′–GCT TCG CTC CTC GTA CGG GC–3′). A PCR mixture consisted of 0.2 µL Prime STAR GXL DNA polymerase (Takara), 0.2 mM each dNTP, and 0.2 µM each primer in a total volume of 20 µL. The condition of thermal cycles were as follows; Initially 98 °C for 5 min., followed by 30 cycles of 98 °C for 10 s, 55–62 °C for 15 s, and 68 °C for 8 min. The amplified PCR products were recovered from agarose gel and purified with FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics Co., Ltd). And subsequently nested PCR was performed with the use of purified PCR products as template.

Preparation of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 protoplasts

Spore suspension of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 was added to 100 mL YEME medium in a baffled flask and incubate 3–4 days at 30 °C in an orbital incubator. Resultant culture was harvested and washed with P buffer twice and lysozyme was added to the resuspended solution to give final concentration of 3 mg/mL, and incubated at 30 °C for 2 hours with checking the protoplast formation by microscope. Obtained protoplast was filtered and stored at –80 °C until use.

P (Protoplast) buffer

10.3 % sucrose, 10 mM MgCl₂ · 6 H₂O, 2 mL/100 mL buffer of trace element solution. After

sterilization, separately sterilized 1 mL of 0.5 % KH_2PO_4 , 10 mL of 3.68 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mL of 5.73 % TES buffer (pH 7.2) were added to 80 mL of buffer respectively to give final volume of 100 mL.

Gene inactivation experiments

About 15 kb *Xho* I fragment including *cmiM4* gene from Cosmid106 was ligated with *Xho* I fragment of pBlueScript II SK (+), resulting in pBSc-106*Xho*I. P450-coding gene was then substituted with *aadA* + *oriT* cassette from pIJ778 followed by ReDirect Technology [67] protocol except that plasmid singulation was performed after the gene replacement in *E. coli*, resulting in the plasmid 106*Xho*I-*aadA*, using the primer pair REDIRECT-P450_ F (5'–TCT CTC CCG CAA TTC CCC CAC CGA TCG GAG **GTT AAC** ATG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC–3', bold characters show *Hpa* I site) and REDIRECT-P450_ R (5'–CCG GCC CCG CAT CGC GTC GCG CCG GAC GCC **GTT AAC** TCA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C–3', bold characters show *Hpa* I site). In short, this operation could be showed following procedure;

1. Antibiotic-resistance gene cassette with homology arms was prepared by PCR with pIJ778 fragment as a template.
2. Obtained cassette was introduced into *E. coli* BW25113/pIJ790/pBSc-106*Xho*I by electroporation.

Resultant plasmid was subsequently digested by *Xho* I and ligated with pET28. Orientation of the DNA fragment was confirmed by agarose gel electrophoresis of *Hind* III fragment of the resultant plasmids. On the other hand, apramycin resistance gene *aac(3)IV* was cloned with pBlueScript II SK (+). At first pIJ773 was digested by *Eco*R I and *Nae* I. Resultant DNA fragment was then ligated with *Eco*R I and *Eco*R V digest of pBlueScript II SK (+), resulting in the plasmid pBSc-*aac(3)IV*. And resultant two plasmids were digested with *Hind* III respectively, and subsequently ligated each other resulting in the delivery plasmid for *cmiM4* inactivation.

The delivery plasmid was introduced into *E. coli* ET12567/pUZ8002 and used for the conjugation with *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 following the procedure described in the textbook. Briefly, donor cells (*E. coli* ET12567/pUZ8002 containing the delivery plasmid for *cmiM4* inactivation) was washed three times with LB medium without antibiotics. On the other hand, spore suspension of recipient cells (*Streptomyces* sp. MJ635-86F5) was diluted with 2× YT medium, and heated at 50 °C 5 min. Resultant cells were mixed to give the colony forming unit (CFU) ratio of donor cells and acceptor cells was 10 : 1 and subsequently cultured at 28 °C on several media (The highest conjugative transfer frequency was obtained from MS medium.). Antibiotics were added after 15–20 hours incubation.

In addition, protoplast-PEG method was also used for the transformation. 5 μL of TE buffer containing the delivery plasmid was added to 50 μL of *Streptomyces* sp. MJ635-86F5 protoplast and

mixed with tapping. Subsequently 200 μ L of 25 % (w/w) PEG 1000 diluted with P buffer was added to the solution and well mixed. Resultant solution was inoculated on R1M agar plate and incubated overnight. Soft agar containing 50 μ g/mL spectinomycin was put on cultivation medium and incubated at 30 °C until spectinomycin-resistant strain appeared.

Colonies showing spectinomycin resistance were appeared in 10 days incubation, and they were transferred to another ISP2 plate containing 50 μ g/mL spectinomycin and 25 μ g/mL nalidixic acid, or 50 μ g/mL apramycin and 25 μ g/mL nalidixic acid. Three strains showing desired phenotype were then cultured in ISP2 medium and genomic DNAs of them were isolated with the protocol described above. Their genotypes were confirmed by genomic PCR and Southern hybridization. Neighbor protein-coding gene was selected as DNA probe and DIG-labeling was carried out described for the DIG system. Three genomic DNAs were digested with *Mlu* I or *Mlu* I and *Hpa* I, respectively, and Southern hybridization was performed with DIG-labeled DNA probe. Three mutants were cultured and extracted in the same manner for wild-type strain as described before. Resultant crude extracts were subsequently filtered and analyzed by LC/PDA (phenomenex Luna 3u C18 (2) 100A 4.6 $\times$ 150 mm, 40 °C, from 30 % to 100 % CH₃CN–H₂O in 30 min., linear gradient, 0.7 mL/min.) and LC/MS (Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan, L-column2 ODS 1.5 $\times$ 100 mm, 40 °C, from 30 % to 100 % CH₃CN–H₂O in 30 min., linear gradient, 0.1 mL/min.).

Characterization of CmiS1 and CmiS2

Construction of plasmids for overexpression of CmiS2

At first *cmiS2* gene was amplified by PCR from Cosmid106 with primers GOX_F (5'–AGC GGT CAT ATG CAC GTG GTC G–3', bold characters show *Nde* I site) and GOX_R (5'–TGA AGC TTG CCG ACG GGA GCA TCG–3', bold characters show *Hind* III site). Amplified product was ligated with *Eco*R V- BAP-treated pBlueScript II SK (+). Resultant plasmid then digested with *Nde* I and *Bam*H I, and obtained fragment was subsequently ligated with pET28a (+) or pCold I so that CmiS2 was overexpressed as fusion protein with His₆-tag at N-terminus. Resultant plasmids were introduced into *E. coli* BL21 (DE3) or *E. coli* RosettaTM 2 (DE3) pLysS. CmiS2 fused with His₆-tag at C-terminus was also constructed in the same manner except using the reverse primer GOX_RCHis (5'–GAC AAG CTT CCC GGC CGC TGC–3', bold characters show *Hind* III site) and an expression vector pET30a (+). In addition, artificial *cmiS2* gene, which is optimized for the overexpression in *E. coli* strain (a-*cmiS2*, a = artificial) was synthesized by Operon Biotechnologies. This a-*cmiS2* was cloned into pET28a (+) using *Nde* I and *Hind* III sites. The resultant plasmid named pET28-a-*cmiS2* was introduced to *E. coli* BL21 (DE3) together with a chaperone expression vector pGro7 or pKJE7 (Takara).

Expression and Purification of CmiS2

E. coli BL21 (DE3) / pET28-a-*cmiS2* / pGro7 was grown in LB medium containing 50 $\mu\text{g/mL}$ kanamycin, 25 $\mu\text{g/mL}$ chloramphenicol, and 0.5 mg/mL L-arabinose. Culture was grown at 37 °C until $\text{OD}_{600} = 0.6\text{--}0.8$, then isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) and FAD were added to the culture to give a final concentration of 0.05 mM and 1 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Culture was continued at 37 °C for additional 4–5 hours. The harvested cells were resuspended in a buffer A (50 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaCl, pH 8.0), and lysed by FRENCH[®] Press (Thermo IEC, 12,800 psi, 4 times). The debris was removed by centrifugation (11,000 rpm, 10 min.) and obtained supernatant was applied to a His60 Ni superflow resin (Clontech) equilibrated with the same buffer. Unspecifically-bound protein was washed with the same buffer, subsequently the buffer A containing 50 mM imidazole and 2.5 mM ATP. The bound enzyme was eluted with the buffer A containing 300 mM imidazole, then desalted on PD-10 column and concentrated by Amicon Ultra-4 (EMD Millipore).

(Preparation was also applied in the anaerobic condition in the same manner except that cells were lysed with sonication under argon.)

Construction of plasmids for overexpression of CmiS1

The gene *cmiS1* was amplified by PCR from Cosmid106 with primers FcoT_F (5'–CCG AGC TCT TGG CAT ATA TGG ATG–3', bold characters show *Sac* I site) and FcoT_R (5'–AGT CAA GCT TTG TCC CAG GC–3', bold characters show *Hind* III site). Amplified product was ligated with *Eco*R V- BAP-treated pBlueScript II SK (+). Resultant plasmid then digested with *Sac* I and *Bam*H I, and obtained fragment was subsequently ligated with pCold I so that CmiS1 was overexpressed as fusion protein with His₆-tag at N-terminus. Resultant plasmids were introduced into *E. coli* BL21 (DE3).

Expression and purification of CmiS1

E. coli BL21 (DE3) / pCold I-*cmiS1* was grown in LB medium containing 100 $\mu\text{g/mL}$ ampicillin. Culture was grown at 37 °C until $\text{OD}_{600} = 0.6\text{--}0.8$, then cooled to 4 °C on ice bath. IPTG was added to the culture to give a final concentration of 0.2 mM. Culture was continued at 15 °C for additional 15–20 hours. The harvested cells were resuspended in a buffer A (50 mM sodium pyrophosphate, 100 mM NaCl, pH 7.0), and lysed by FRENCH[®] Press (12,800 psi, 3 times). The debris was removed by centrifugation (11,000 rpm, 10 min.) and obtained supernatant was applied to a His60 Ni superflow resin equilibrated with the same buffer. Unspecifically-bound protein was washed with the same buffer, subsequently the buffer A containing 50 mM imidazole. The bound enzyme was eluted with the buffer A containing 300 mM imidazole, then desalted on PD-10 column and concentrated by Amicon Ultra-4 on demand.

Enzymatic assay of CmiS2

3-Oxononanoyl-SNAC (final 2.5 mM) or 2-nonenoyl-SNAC (final 1 mM) and glycine (5–10 mM) or NH_4Cl (10 mM), and FAD (1 mM) were added to purified CmiS2 solution (5–10 μM , in 50 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium chloride, 10 % DMSO), and enzymatic reaction was carried out at 28 °C, overnight. The reaction was quenched by adding equal volume of acetonitrile, and debris was removed by centrifugation. Resultant supernatant was concentrated by centrifugal evaporation, and the residue was dissolved in coupling solution for phenylisothiocyanate (PITC) derivatization ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{pyridine} : \text{Et}_3\text{N} : \text{H}_2\text{O} = 10 : 5 : 2 : 3$). Excess PITC was added and the mixture was incubated at room temperature for 30 min.–1 hour. Resultant solution was dried and the residue was extracted with ethyl acetate. The extract was washed with acidified water. The organic layer was then concentrated and the residue was dissolved in 100 μL of acetonitrile. Resultant samples were analyzed by HPLC/ESI-MS using TOSOH TSK-gel ODS-100V column (2.0 $\times$ 150 mm).

Enzymatic assay of CmiS1 and CmiS2

3-Oxononanoyl-SNAC (final 2.5 mM) or 2-nonenoyl-SNAC (final 1 mM) and glycine (1–500 mM) or NH_4Cl (10 mM) were added to purified CmiS1 and CmiS2 solution (20 μM each, in 50 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium chloride, 10 % DMSO), and enzymatic reaction was carried out at 15–37 °C, overnight. The reaction was quenched by adding equal volume of acetonitrile, and debris was removed by centrifugation. Resultant supernatant was concentrated by centrifugal evaporation, and the residue was dissolved in coupling solution for phenylisothiocyanate (PITC) derivatization ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{pyridine} : \text{Et}_3\text{N} : \text{H}_2\text{O} = 10 : 5 : 2 : 3$). Excess PITC was added and the mixture was incubated at room temperature for 30 min.-1 hour. Resultant solution was dried and the residue was extracted with ethyl acetate and the extract was washed with acidified water. The organic layer was then concentrated and the residue was dissolved in 100 μL of acetonitrile and filtered. Resultant samples were analyzed by HPLC/ESI-MS using TOSOH TSK-gel ODS-100V column (2.0 $\times$ 150 mm).

Isolation PTH-derivatized CmiS1 product

CmiS1 was purified following the procedure described above. 2-Nonenoyl-SNAC (10 mg, final 1 mM) and glycine (15 mg, 5 mM) were added to CmiS1 solution (20 μM , in 50 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium chloride, 10 % DMSO), and enzymatic reaction was carried out overnight at 28 °C. The reaction was quenched by adding an equal volume of CH_3CN , and the debris was removed by centrifugation. Resultant supernatant was concentrated in vacuo, and the residue was dissolved in coupling solution ($\text{CH}_3\text{CN} : \text{pyridine} : \text{Et}_3\text{N} : \text{H}_2\text{O} = 10 : 5 : 2 : 3$) for phenylisothiocyanate (PITC) derivatization. Excess PITC was added and the mixture was incubated at room temperature, overnight. Resultant solution was dried and the residue was extracted with ethyl acetate and the extract was

washed with acidified water. The organic layer was then concentrated and the residue was partially purified by normal phase silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} = 10 : 1$). The product was further purified by medium pressure liquid chromatography using ODS cartridge column (Yamazen) with CH_3CN in 50 mM ammonium acetate (32–57 %), resulting in 3-PTH-glycinylnonanoate (8 mg).

^1H -NMR (500 MHz, in CDCl_3) δ : 7.50–7.29 (m, 5H, Ph), 5.27 (quin, 1H, $J = 7.1$ Hz), 4.29 (d, 1H, $J = 19.3$ Hz), 4.11 (d, 1H, $J = 19.3$ Hz), 2.76 (m, 2H) 1.76 (m, 2H) 1.42–1.25 (m, 6H), 0.89 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz)

^{13}C -NMR (125 MHz, in CDCl_3) δ : 183.2, 173.8, 170.1, 133.1, 129.2, 129.1, 128.5, 53.2, 48.9, 36.4, 32.1, 31.6, 28.9, 26.2, 22.5, 14.0

HRMS (FAB $^-$): m/z calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$: 347.1429 $[\text{M}-\text{H}]^-$; found: 347.1427 $[\text{M}-\text{H}]^-$

Kinetics of CmiS1

CmiS1 was purified following the procedure described above. Various concentration of 2-nonenoyl-SNAC (10 μM –1 mM), glycine (200 mM) were mixed in the buffer (50 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium chloride, 10 % DMSO, pH 8.0) and pre incubated for 10 minutes at 20 °C. After that, purified CmiS1 was added to the solution to give a final concentration of 0.1 μM and resultant solutions were incubated for additional 30 minutes, at 20 °C. The reaction was quenched by adding the equal volume of CH_3CN , and 20 mM Elmann's reagent was added to the resultant each solution and incubated at room temperature. The absorbance at 412 nm was observed by Shimadzu UV-Vis spectrometer UV-2450.

Synthesis

3-Oxononanoyl NAC thioester

3-Oxononanoate (100 mg) was dissolved in methylene chloride (5 mL). The solution was cooled to 0 °C with ice bath, and 4-dimethylaminopyridine (7 mg) and N,N' -dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (186 mg) were added. After 210 μL of N -acetylcysteamine was added to the solution, the reaction solution was allowed to warm to room temperature and stirring was continued for 3.5 hours. The reaction solution was filtered through a pad of Celite to remove DCU and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The residue was dissolved in CHCl_3 and purified by silica gel column chromatography ($\text{CHCl}_3 : \text{acetone} = 10 : 1$) to give 3-oxononanoyl NAC thirster (19 mg, 12 %).

^1H -NMR (400 MHz, in CDCl_3) δ : 5.87 (bs; NH), 3.69 (s, 2H), 3.46 (q, 2H, $J = 6.3$ Hz), 3.09 (t, 2H, $J = 6.3$ Hz), 2.53 (t, 2H, $J = 7.5$ Hz), 1.97 (s, 3H), 1.55 (m, 2H), 1.28 (m, 6H), 0.88 (t, 3H, $J = 7.2$ Hz)

^{13}C -NMR (125 MHz, in CDCl_3) δ : 202.3, 192.4, 170.4, 57.1, 43.4, 39.2, 31.5, 31.4, 28.7, 28.6, 23.4, 22.4, 14.0

2-Nonenoyl NAC thioester

2-Nonenoic acid (781 mg) was dissolved in dried methylene chloride (5 mL). The solution was cooled to 0 °C with ice bath, and 4-dimethylaminopyridine (DMAP, 122 mg) and a solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI, 4.6 g) dissolved in dried methylene chloride (1 mL) was added. After 1 hour, *N*-acetylcysteamine (2.4 mL) was added to the reaction solution and the solution was stirred overnight at room temperature. The reaction was quenched by addition of aqueous saturated ammonium chloride, and then the mixture was extracted with methylene chloride. The organic layer was dried over with anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The crude product was then purified by silica gel column chromatography (CHCl₃ : acetone = 6 : 1) to give 2-nonenoyl NAC thioester (320 mg, 25 %).

¹H-NMR (500 MHz, in CDCl₃) δ: 6.93 (dt, 1H, *J* = 15.5, 7.1 Hz), 6.13 (dd, 1H, *J* = 1.7, 15.5 Hz), 5.89 (bs, 1H), 3.46 (q, 2H, *J* = 6.2 Hz), 3.09 (t, 2H, *J* = 6.2 Hz), 2.20 (dq, 2H, *J* = 1.7, 7.1 Hz), 1.96 (s, 3H), 1.46 (quin, 2H, *J* = 7.1 Hz), 1.49 (m, 6H), 0.88 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz)

¹³C-NMR (125 MHz, in CDCl₃) δ: 190.3, 170.3, 146.7, 128.2, 39.7, 32.2, 31.5, 28.8, 28.2, 27.8, 23.1, 22.4, 14.0

HRMS (FAB⁺): *m/z* calcd for C₁₃H₂₃NO₂S: 258.1527 [M+H]⁺; found: 258.1519 [M+H]⁺

Phenylthiocarbamate derivative of 3-aminononanoate

3-Aminononanoate (10 mg) was dissolved in the coupling solution (CH₃CN : pyridine : Et₃N : H₂O = 10 : 5 : 2 : 3) and 100 μL of phenylisothiocyanate (PITC) was added to the solution. The solution was stirred at room temperature for 6 hours. After evaporation of the solvent, the residue was dissolved in ethyl acetate and the solution was washed with diluted hydrochloric acid. The organic layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated to dryness. The residue was purified by silica gel column chromatography (CHCl₃ : CH₃OH = 10 : 1) to give phenylthiocarbamate derivative (4.2 mg).

¹H-NMR (500 MHz in CDCl₃) δ: 7.96 (bs, 1H), 7.38 – 7.17 (m, 5H, Ph), 6.69 (d, 1H, *J* = 8.6 Hz), 4.78 (bs, 1H), 2.82 (dd, 1H, *J* = 4.6, 16.5 Hz), 2.64 (dd, 1H, *J* = 4.0, 16.5 Hz), 1.62 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.4 – 1.2 (m, 8H), 0.86 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz).

¹³C-NMR (125 MHz, in CDCl₃) δ: 179.6, 176.5, 135.8, 130.1, 127.3, 125.1, 51.8, 37.1, 33.5, 31.6, 28.9, 26.1, 22.5, 14.0.

HRMS (FAB[−]): *m/z* calcd for C₁₆H₂₃N₂O₂S: 307.1480 [M−H][−]; found: 307.1490 [M−H][−].

参考文献

- [1] B. Becker, M. A. Cooper, *ACS Chemical Biology* **8**, 105 (2013).
- [2] S. D. Bentley, *et al.*, *Nature* **417**, 141 (2002).
- [3] M. Komatsu, T. Uchiyama, S. Omura, D. Cane, H. Ikeda, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 2646 (2010).
- [4] A. C. Allison, *Immunopharmacology* **47**, 63 (2000).
- [5] B. S. Moore, C. Hertweck, *Natural Product Reports* **19**, 70 (2002).
- [6] J. Cortes, S. F. Haydock, G. A. Roberts, D. J. Bevitt, P. F. Leadlay, *Nature* **348**, 176 (1990).
- [7] S. Donadio, M. Staver, J. McAlpine, S. Swanson, L. Katz, *Science* **252**, 675 (1991).
- [8] Y. A. Y. Chan, A. M. A. Podevels, B. Kevany, M. G. M. Thomas, M. Kevany, *Natural Product Reports* **26**, 90 (2009).
- [9] T. Maier, S. Jenni, N. Ban, *Science* **311**, 1258 (2006).
- [10] Y. Tang, C.-Y. Kim, I. I. Mathews, D. E. Cane, C. Khosla, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 11124 (2006).
- [11] A. T. Keatinge-Clay, R. M. Stroud, *Structure (London, England : 1993)* **14**, 737 (2006).
- [12] A. T. Keatinge-Clay, *Journal of Molecular Biology* **384**, 941 (2008).
- [13] A. T. Keatinge-Clay, *Natural Product Reports* pp. 1050–1073 (2012).
- [14] A. T. Keatinge-Clay, *Chemistry & Biology* **14**, 898 (2007).
- [15] S. Anand, *et al.*, *Nucleic Acids Research* **38**, 487 (2010).
- [16] A. Starcevic, *et al.*, *Nucleic Acids Research* **36**, 6882 (2008).
- [17] M. H. Medema, *et al.*, *Nucleic Acids Research* **39**, W339 (2011).
- [18] T. Nguyen, *et al.*, *Nature Biotechnology* **26**, 225 (2008).
- [19] J. Piel, *Natural Product Reports* **27**, 996 (2010).
- [20] R. a. Butcher, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1506 (2007).
- [21] Y. Ogasawara, *et al.*, *Chemistry & Biology* **11**, 79 (2004).
- [22] Y. Shinohara, F. Kudo, T. Eguchi, *Journal of the American Chemical Society* **133**, 18134 (2011).
- [23] D. W. Udvary, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10376 (2007).
- [24] H. Jø rgensen, *et al.*, *Chemistry & Biology* **16**, 1109 (2009).
- [25] H. Jø rgensen, *et al.*, *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 283 (2010).
- [26] M. Igarashi, *et al.*, *The Journal of Antibiotics* **51**, 123 (1998).
- [27] K. Kojiri, S. Nakajima, H. Suzuki, H. Kondo, H. Suda, *The Journal of Antibiotics* **45**, 868 (1992).

- [28] S. S. Mitchell, *et al.*, *Journal of Natural Products* **67**, 1400 (2004).
- [29] R. Sugiyama, S. Nishimura, H. Kakeya, *Tetrahedron Letters* **54**, 1531 (2013).
- [30] R. Raju, A. M. Piggott, M. M. Conte, R. J. Capon, *Organic & Biomolecular Chemistry* **8**, 4682 (2010).
- [31] S. Omura, A. Nakagawa, K. Shibata, H. Sano, *Tetrahedron Letters* **23**, 4713 (1982).
- [32] D. Schulz, *et al.*, *The Journal of Antibiotics* **62**, 513 (2009).
- [33] F. R. van Heerden, *et al.*, *Phytochemistry* **68**, 2545 (2007).
- [34] T. Warashina, T. Noro, *Phytochemistry* **70**, 1294 (2009).
- [35] X.-X. Ma, D. Wang, Y.-J. Zhang, C.-R. Yang, *Steroids* **76**, 1003 (2011).
- [36] M. Chino, *et al.*, *The Journal of Antibiotics* **49**, 752 (1996).
- [37] J. Staunton, K. J. Weissman, *Natural Product Reports* **18**, 380 (2001).
- [38] M. Otsuka, T. Eguchi, K. Shindo, K. Kakinuma, *Tetrahedron letters* **39**, 3185 (1998).
- [39] M. Otsuka, *et al.*, *Tetrahedron* **56**, 8281 (2000).
- [40] M. Takaishi, F. Kudo, T. Eguchi, *Tetrahedron* **64**, 6651 (2008).
- [41] M. Takaishi, F. Kudo, T. Eguchi, *Organic Letters* **14**, 4591 (2012).
- [42] S. M. Friedman, T. Kaneda, J. W. Corcoran, *Journal of Biological Chemistry* **239**, 2386 (1964).
- [43] a. a. Hunaiti, P. E. Kolattukudy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **25**, 173 (1984).
- [44] Z. D. Aron, P. C. Dorrestein, J. R. Blackhall, N. L. Kelleher, C. T. Walsh, *Journal of the American Chemical Society* **127**, 14986 (2005).
- [45] R. D. Fleischmann, *et al.*, *Science* **269**, 496 (1995).
- [46] S. Singh, G. N. Phillips, J. S. Thorson, *Natural Product Reports* **29**, 1201 (2012).
- [47] N. Sasaki, *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 3455 (1998).
- [48] T. Uchiyama, K. Watanabe, *BioTechniques* **41**, 183 (2006).
- [49] H. Sugawara, A. Ohyama, H. Mori, K. Kurokawa, "Microbial Genome Annotation Pipeline (MiGAP) for diverse users" The 20th International Conference on Genome Informatics (GIW2009) Poster and Software Demonstrations (Yokohama), S001-1-2, *Tech. rep.* (2009).
- [50] N. Ichikawa, *et al.*, *Nucleic Acids Research* **41**, D408 (2013).
- [51] S. Mochizuki, *et al.*, *Molecular Microbiology* **48**, 1501 (2003).
- [52] T. T. T. Thuy, *et al.*, *Glycobiology* **17**, 119 (2007).
- [53] M. Daum, *et al.*, *ChemBioChem* **10**, 1073 (2009).
- [54] A. Erb, A. Luzhetskyy, U. Hardter, A. Bechthold, *ChemBioChem* **10**, 1392 (2009).
- [55] Y. Du, *et al.*, *Tetrahedron* **67**, 6568 (2011).
- [56] R. Novakova, Z. Odnogova, P. Kutas, L. Feckova, J. Kormanec, *Folia Microbiologica* **55**, 119 (2010).
- [57] J.-M. Han, S.-M. Kim, H.-J. Lee, J.-C. Yoo, *Journal of Microbiology and Biotechnology* **17**, 685 (2007).

- [58] C. Zhang, C. Albermann, X. Fu, J. S. Thorson, *Journal of the American Chemical Society* **128**, 16420 (2006).
- [59] H. B. Claxton, D. L. Akey, M. K. Silver, S. J. Admiraal, J. L. Smith, *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 5021 (2009).
- [60] W. Namwat, C. K. Lee, H. Kinoshita, Y. Yamada, T. Nihira, *Journal of Bacteriology* **183**, 2025 (2001).
- [61] J. Guo, *et al.*, *Molecular Genetics and Genomics* **283**, 123 (2010).
- [62] D. J. Wilson, Y. Xue, K. A. Reynolds, D. H. Sherman, *Journal of Bacteriology* **183**, 3468 (2001).
- [63] B. O. Bachmann, J. Ravel, *Methods in Enzymology* **458**, 181 (2009).
- [64] F. Kudo, T. Yonezawa, A. Komatsubara, K. Mizoue, T. Eguchi, *The Journal of Antibiotics* **64**, 123 (2011).
- [65] T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood, *Practical Streptomyces Genetics* (John Innes Foundation, 2000).
- [66] J. Pigac, H. Schrempf, *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 352 (1995).
- [67] B. Gust, G. L. Challis, K. Fowler, T. Kieser, K. F. Chater, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 1541 (2003).
- [68] Z. Rui, *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry* **285**, 24915 (2010).
- [69] S.-U. Choi, C.-K. Lee, Y.-I. Hwang, H. Kinoshita, T. Nihira, *Archives of Microbiology* **181**, 294 (2004).
- [70] L. L. Enríquez, *et al.*, *FEMS Microbiology Letters* **257**, 312 (2006).
- [71] H.-S. Ha, Y.-I. Hwang, S.-U. Choi, *Biotechnology Letters* **30**, 1233 (2008).
- [72] D. Guan, G. S. Pettis, *Letters in Applied Microbiology* **49**, 67 (2009).
- [73] Z. Jin, X. Jin, Q. Jin, *Applied Biochemistry and Biotechnology* **160**, 1853 (2010).
- [74] G. L. Marcone, *et al.*, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **37**, 1097 (2010).
- [75] S. Phornphisutthimas, *et al.*, *Letters in Applied Microbiology* **50**, 530 (2010).
- [76] F. Jamil, Q.-t.-A. A. Gardner, Q. Bashir, N. Rashid, M. Akhtar, *Biochemistry* **49**, 7377 (2010).
- [77] Y. Nishiya, T. Imanaka, *FEBS Letters* **438**, 263 (1998).
- [78] V. Job, G. L. Marcone, M. S. Pilone, L. Pollegioni, *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 6985 (2002).
- [79] V. Job, G. Molla, M. S. Pilone, L. Pollegioni, *European Journal of Biochemistry* **269**, 1456 (2002).
- [80] T. Chatterjee, B. K. Chatterjee, D. K. Bhattacharyya, *Canadian Journal of Microbiology* **47**, 397 (2001).
- [81] M. H. Hefti, J. Vervoort, W. J. H. Van Berkel, *European Journal of Biochemistry* **270**, 4227 (2003).
- [82] G. Molla, L. Motteran, V. Job, M. S. Pilone, L. Pollegioni, *European Journal of Biochemistry*

270, 1474 (2003).

- [83] E. C. Settembre, *et al.*, *Biochemistry* **42**, 2971 (2003).
- [84] I. Martínez-Martínez, J. Navarro-Fernandez, J. D. Lozada-Ramírez, F. García-Carmona, A. Sanchez-Ferrer, *Biotechnology Progress* **22**, 647 (2006).
- [85] A. Boselli, *et al.*, *Biochimie* **89**, 1372 (2007).
- [86] I. Martínez-Martínez, J. Navarro-Fernández, F. García-Carmona, H. Takami, A. Sánchez-Ferrer, *Proteins* **70**, 1429 (2008).
- [87] L. Caldinelli, M. Pedotti, L. Motteran, G. Molla, L. Pollegioni, *Biochimie* **91**, 1499 (2009).
- [88] K. Amagai, F. Kudo, T. Eguchi, *Tetrahedron* **67**, 8559 (2011).
- [89] F. Jamil, N. Rashid, Q.-t.-A. A. Gardner, M. Akhtar, *Biologia* **66**, 1 (2010).
- [90] S. Matsushita, R. Miura, T. Yamano, Y. Miyake, *Journal of Biochemistry* **88**, 121 (1980).
- [91] E. a. Felnagle, *et al.*, *Biochemistry* **49**, 8815 (2010).
- [92] D. a. Herbst, B. Boll, G. Zocher, T. Stehle, L. Heide, *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 1991 (2013).
- [93] M. de Villiers, V. Puthan Veetil, H. Raj, J. de Villiers, G. J. Poelarends, *ACS Chemical Biology* **7**, 1618 (2012).
- [94] N. J. Turner, *Current Opinion in Chemical Biology* **15**, 234 (2011).
- [95] F. Wang, R. Langley, G. Gulten, L. Wang, J. C. Sacchettini, *Chemistry & Biology* **14**, 543 (2007).
- [96] E. A. B. Emmert, A. K. Klimowicz, M. G. Thomas, J. Handelsman, *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 104 (2004).
- [97] Y. Chan, M. Thomas, *Biochemistry* **49**, 3667 (2010).
- [98] L. P. Partida-Martinez, C. Hertweck, *ChemBioChem* **8**, 41 (2007).
- [99] M. C. Moffitt, B. A. Neilan, *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 6353 (2004).
- [100] M. Kotaka, *et al.*, *The Journal of Biological Chemistry* **284**, 15739 (2009).
- [101] C. W. Liew, *et al.*, *Journal of Molecular Biology* **404**, 291 (2010).
- [102] M. Bierman, *et al.*, *Gene* **116**, 43 (1992).
- [103] H. Zhang, H. Shinkawa, J. Ishikawa, *Journal of Fermentation* **83**, 217 (1997).
- [104] R. U. Lemieux, J. D. Stevens, *Canadian Journal of Chemistry* **44**, 249 (1966).

謝辞

本研究を行うにあたり終始御指導御鞭撻を賜りました本学教授 江口 正 先生に深く感謝致します。

また常なる御助言激励頂きました本学准教授 工藤 史貴 博士、並びに本学助教 宮永 顕正 博士に感謝致します。

最後に有益な討論をして頂きました江口研究室の皆様に感謝致します。

平成 25 年 9 月