## 博士論文

# ゲノム情報に基づく

糸状菌マクロライド天然物の探索研究

## 森下 陽平

本論文中において以下の略記を用いた.

AO: Aspergillus oryzae

AU: arbitrary unit

Ac: acetyl

BBE: berberine bridge enzyme

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

calcd: calculated

Cont: control

COSY: correlation spectrometry

CPS: Czapek-Dox/peptone/starch

eq: equivalent

ESIMS: electro spray ionization mass spectrometry

Et: ethyl

FW: forward

GGPP (S): geranylgeranyl diphosphate (synthase)

GPI-EPT: glycosylphosphatidylinositol-ethanolamine phosphate transferase

HIV: human immunodeficiency virus

HMBC: heteronuclear multiple bond coherence

HPLC: high performance liquid chromatography

HR: high resolution

HSQC: heteronuclear single quantum coherence

IPTG: Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

LC-MS: liquid chromatography-mass spectrometry

lit: literature

Me: methyl

MT: methyltransferase

MTPA:  $\alpha$ -Methoxy- $\alpha$ -(trifluoromethyl)phenylacetyl

MYG: malt/yeast/glucose

NC: negative control

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NMR: nuclear magnetic resonance

NOE (SY): nuclear overhauser effect (spectroscopy)

NR-PKS: non-reducing polyketide synthase

NRPS: non-ribosomal peptide synthase

P450: cytochrome P450

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PC: phosphatidylcholine

PCR: polymerase chain reaction

PDB: Potato Dextrose Broth

PE: phosphatidylethanolamine

PKS: polyketide synthase

rt: room temperature

RA: recombination assembly

RCR: replication cycle reaction

RV: reverse

SDR: short-chain dehydrogenase/reductase

SDS: sodium dodecyl sulfate

SNAC: N-Acetylcysteamine

TBDPS: tert-Butyldiphenylchlorosilane

TH: thiohydrolase

THF: tetrahydrofuran

TLC: thin layer chromatography

TMS: tetramethylsilyl TOCSY: total correlation spectroscopy Tris: tris(hydroxymethyl)aminomethane UV: ultraviolet

YM: yeast/malt/peptone/glucose

目次

第1章	序論	
1-1.	創薬資源としての天然有機化合物	1
1-2.	糸状菌を標的とした天然物探索	3
1-3.	二次代謝物の生合成	3
1-4.	未利用生合成遺伝子クラスター	4
1-5.	未利用生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニング	5
1-6.	糸状菌二次代謝物の異種生産	6
1-7.	未利用生合成遺伝子クラスターを活用する天然物探索	6
1-8.	糸状菌の高還元型ポリケタイド生合成酵素	7
1-9.	糸状菌マクロライド天然物	11
1-10	本研究の目的	12
1-11.	本論文の構成	13
第2章	ケムシ内生糸状菌 Arthrinium phaeospermum ゲノム上にコードされる遺伝・	子ク
	ラスターの麹菌異種発現と新規大環状ポリエンマクロライドの取得	
2-1.	緒言	15
2-2.	apml クラスターの異種発現系の構築	
2-2	2-1. クラスター解析	16
2-2	2-2. apml クラスターの麹菌異種発現およびポリエンマクロライドの単離	構
	造決定	17
2-2	2-3. Phaeospelide A (1) の立体化学の決定	21
2-2	2-4. Phaeospelide B (2) の構造決定	22
2-3.	Phaeospelide A, B の生合成機構の解析	25
2-4.	<i>apml</i> クラスター保有株 A. phaeospermum の培養と代謝物の分析	26

	2-5.	考察	27
第3	3章	糸状菌マクロライド推定生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニング	
	3-1.	緒言	30
	3-2.	ApmlA ホモログを指標としたゲノムマイニング	31
	3-3.	ApmlA ホモログおよび ApmlB ホモログの系統樹解析	32
	3-4.	考察	37
第4	章	GPI-EPT ドメインを有する酵素がコードされる遺伝子クラスターを標的と	
		した新規糸状菌マクロライド天然物の探索	
	4-1.	緒言	40
	4-2.	akml および ciml クラスターの解析	42
	4-3.	akml クラスターの再構築と新規 24 員環マクロライドの取得	45
	4-4.	ciml クラスターの再構築による新規 22 員環マクロライドの取得	47
	4-5.	GPI-EPT 様酵素遺伝子の交換による類縁マクロライド化合物の創生	48
	4-6.	考察	50
	4-7.	akml クラスター由来マクロライドの構造決定	
	4-7	7-1. Akml-1-4 (17-20)の平面構造の決定	54
	4-7	7-2. Akml-2(18)の1,2-ジオールの相対配置の決定	57
	4-7	7-3. Akml-2 (18) の 5 位の絶対配置の決定	58
	4-8.	ciml クラスター由来マクロライドの構造決定	60
	4-9.	Ciakml-1 ( <b>25</b> ) の構造決定	64
第5	章	多様な環骨格を有する糸状菌マクロライドの探索	
	5-1.	緒言	65
	5-2.	peml クラスター	
	5-2	2-1. クラスター解析	66
	5-2	2-2. peml クラスターの再構築と 16 員環マクロライドおよび新規カルボン	

酸体の取得

68

5-2-3. 考察	70
5-3. mpml クラスター	
5-3-1. クラスター解析	
5-3-2 mpml クラスターの再構築と新規 12 員環マクロライドの取得	72
5-3-3. 考察	72
5-4. peml クラスター由来マクロライドおよびカルボン酸体の構造決定	73
5-5. mpml クラスター由来マクロライドの構造決定	74
第6章 Brefeldin A の生合成研究	
6-1. 緒言	76
6-2. elb クラスターの解析	78
6-3. Brefeldin A 生合成経路の再構築	80
6-4. ElbB の機能解析	
6-4-1. ElbB の精製	83
6-4-2. 基質 SNAC 体の合成	85
6-4-3. ElbB の in vitro 機能解析	87
6-5. 考察	90
総括	94
実験項	99
謝辞	148
参考文献	150
発表論文リスト	157

### 第1章

#### 序論

#### 1-1. 創薬資源としての天然有機化合物

植物や微生物,海洋生物などの天然資源から得られる天然有機化合物は,これまでに 数多くの医薬品開発および創薬科学の発展に貢献してきた<sup>1,2</sup>. 抗生物質の penicillin (*Penicillium nordicum*, 1928年)<sup>3</sup> や streptomycin (*Actinomyces griseus* 1944年)<sup>4</sup>, 駆虫薬 avermectin (*Streptomyces avermitilis*, 1978年)<sup>5</sup>, 抗マラリア薬 artemisinin (*Artemisia annua*, 1972年)<sup>6</sup>の発見をきっかけとしてノーベル賞が与えられているように,天然化合物が 人類の生存と繁栄に多大な貢献をもたらしてきたことが伺える (Figure 1). そのほかに も,植物からは,抗マラリア薬 quinine (*Papaver somniferum*, 1805年)<sup>7</sup> や抗がん剤 vinblastine (*Vinca rosea*, 1959年)<sup>8</sup>, taxol (*Taxus brevifolia*, 1971年)<sup>9</sup>, 放線菌からは,抗真 菌薬 amphotericin B (*Streptomyces nodosus*, 1955年)<sup>10</sup>, 免疫抑制剤 tacrolimus (*Streptomyces tuskubaensis*, 1984年)<sup>11</sup> など数多くの医薬品が開発されてきた.近年,新たに承認され た低分子医薬品の約 25%, 感染症治療薬に限れば約 44%が天然物あるいはその誘導体 から開発されており<sup>12</sup>, 現代の創薬研究においても,天然物は有望な医薬シーズであり 続けている.



Figure 1. 糸状菌由来の医薬品として利用されている天然有機化合物.

#### 1-2. 糸状菌を標的とした天然物探索

糸状菌は、ポリケタイドやペプチド、テルペノイドあるいはそれらのハイブリッド型 化合物など複雑多様な化学構造や多様な生物活性を示す天然化合物を生産する重要な 探索資源である<sup>13</sup>. 1928年のA. Fleming による penicillinの発見をきっかけに、糸状菌 由来の医薬シーズの取得を目指した天然物探索が始まり、1940年前後から 1970年代の 間に、抗真菌薬の griseofulvin (*Penicillium griseofulvum*、1939年)<sup>14</sup> や抗生物質 cephalosporin (*Cephalosporium acremonium*、1948年)<sup>15</sup>、免疫抑制剤 cyclosporine (*Tolypocladium inflatum*、1976年)<sup>16</sup>、高脂血症治療薬 lovastatin (*Aspergillus terreus*、1978 年)<sup>17</sup> など多様な用途の医薬品へとつながる天然物が単離された (Figure 1). 1980年代 に入ると、従来の天然物探索法では既知化合物に行き着いてしまうことが多くなり、新 規生物活性物質の取得が困難となったものの<sup>18</sup>、後述するように、今日では糸状菌が新

#### 1-3. 二次代謝物の生合成

天然化合物のうち,生育には必須ではないが,自然環境に適応し生き抜くために必要 だと考えられている化合物は二次代謝物と呼ばれる<sup>19</sup>.二次代謝物は,糖やアミノ酸, 脂質といった一次代謝物を原料に,様々な酵素が連続的に機能することで生合成される. 二次代謝物の生合成は,多くの場合,①天然物の骨格構築を行う過程と,②骨格に対す る修飾を行う過程に分けられる.①を担う酵素には,ポリケタイド合成酵素 (PKS) や 非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)<sup>20</sup>, PKS-NRPS ハイブリッド酵素<sup>21</sup>,テルペン環 化酵素<sup>22</sup>などがある.②には,経路特異的にはたらく様々な修飾酵素が関わっており, 酸化還元反応やメチル化,プレニル化,環化反応などにより①で構築された骨格をさら に複雑多様な天然物へと変換していく.

それら酵素がコードされる遺伝子は、二次代謝物生合成遺伝子と呼ばれる. 微生物に おいては、一般的に、ある一つの二次代謝物に関わる生合成遺伝子はゲノム上の特定の 位置に隣接して配置され、クラスターを形成している<sup>23</sup>. 例えば、糸状菌 *Penicillium* 

3

*chrysogenum* により生産される peinicillin G は 3 種のアミノ酸を原料に *pcabAB* (NRPS), *pcbC* (α-ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ), *pcbDE* (アシルトランスフェラーゼ) が順に機能することで生合成されるが,それら 3 つの生合成遺伝子は約 14kb 以内のゲ ノム領域にまとまってコードされている<sup>24</sup>. こうした特徴は,ゲノム解析による二次代 謝物生合成遺伝子クラスターの探索を容易にしている.



Figure 2. Penicillin G の生合成遺伝子クラスターと生合成経路.

#### 1-4. 未利用生合成遺伝子クラスター

糸状菌のゲノム上には、多くの二次代謝物生合成遺伝子クラスターが存在する<sup>25</sup>. 最 近報告された 32 株の Aspergillus 属菌の網羅的なゲノム解析研究により、一種あたり平 均 85 のクラスター (2717/32 株)をコードしており、それらクラスター全体から 455 種 もの化合物群が得られることが推算されている<sup>26</sup>.一方で、糸状菌のゲノム上に見出さ れる生合成遺伝子クラスターのほとんどは、化合物情報とリンクしていない「未利用生 合成遺伝子クラスター」であることが明らかとなった<sup>27</sup>.執筆時点でゲノム解読された 糸状菌株 (子嚢菌門)は 850を超えており (2019/12/02, JGI 1000 Fungal Genomes Project 参照)、また、地球上には 220 万-380 万種もの糸状菌種が生息することが見積もられて いることから<sup>28</sup>、莫大な未利用遺伝子資源が存在していると言えよう.様々な分子生物 学的ツールが利用可能となり、標的とする遺伝子を直接扱うことが可能となったポスト ゲノム時代において,未利用生合成遺伝子クラスターは,狙って手にすることができる 新規二次代謝物の宝庫である.

#### 1-5. 未利用生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニング

現在のゲノム解析による生合成遺伝子クラスターの探索(ゲノムマイニング)は、主 に天然物の骨格形成に関わる遺伝子に着目して行われる<sup>29</sup>.二次代謝物生合成遺伝子ク ラスターの検出ソフトウェアである antiSMASH や SMURF においても、骨格形成を担 う遺伝子を見つけたのちに周辺領域を解析するアルゴリズムが用いられている<sup>30,31</sup>.既 知化合物の生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニングでは、その化学構造から予想さ れる骨格形成遺伝子を指標に候補遺伝子クラスターを見出すことができる<sup>32</sup>.一方で、 新規化合物の生合成遺伝子クラスターは、骨格構築を担う酵素の新規性、あるいは、ク ラスターを構成する遺伝子の組み合わせに着目することで探索することが可能である <sup>33-37</sup>.例えば、当研究室では、高還元型 PKS(HR-PKS)を指標にした相同性検索により、 これまでに報告例のない HR-PKS と Type III PKS を含む遺伝子クラスターから、実際に 新規ポリケタイド soppiline A の取得に成功している(Figure 3)<sup>37</sup>.膨大に蓄積されたゲ ノム情報を活用したゲノムマイニングを行うことで、新規天然物探索における、遺伝子 資源を入手することが可能である.



Figure 3. 生合成遺伝子の新規な組み合わせに着目した天然物探索.

#### 1-6. 糸状菌二次代謝物の異種生産

糸状菌の一種である麹菌 Aspergillus oryzae は、形質転換をはじめとして様々な分子生 物学的ツールが整備されている真核生物のモデル生物である<sup>38,39</sup>. 近年、麹菌に生合成 に必要な遺伝子を全て導入することで、目的化合物を異種生産させる「生物全合成」が 報告されている (Figure 4)<sup>36,40,43</sup>. 過剰発現プロモーター下流に各生合成遺伝子を組み込 んだベクターを作製し、麹菌へ順次形質転換することで、既知天然物の大量供給や生合 成機構の解明が可能となっている. これまでに PKS-NRPS ハイブリッド酵素由来の tenellin をはじめ、ジテルペンやインドールジテルペン、メロテルペノイドなど様々な 天然物群の生物全合成が達成されている.



Figure 4. 麹菌を異種ホストとした tenellin の生物全合成.

#### 1-7. 未利用生合成遺伝子クラスターを活用する天然物探索

上述したように、糸状菌ゲノム上の未利用生合成遺伝子クラスターから、さらなる新 規天然物の取得が期待されている.しかし、それら遺伝子クラスターは研究室で用いら れる通常培養条件下では(ほとんど)発現していないために、従来の天然物探索法で は化合物の取得に至ってこなかった.その問題を解決するために、様々な手法を用いた 天然探索研究が行われてきた.例えば、エピジェネティクス制御に関わる酵素の阻害剤 を用いるケミカルエピジェネティクスや、二次代謝に関わるグローバルレギュレーター の過剰発現などの二次代謝活性化法により、数多くの新規物質の取得に成功している (Figure 5)<sup>44-50</sup>.また、最近では、標的の未利用遺伝子クラスターを汎用宿主に異種発現 させ、新規二次代謝物を探索する例も報告され始めている(Figure 5)<sup>36,37,51,52</sup>.現時点で は、異種発現を基盤とした探索研究の報告例は限られているものの、今後の生合成研究 の知見の蓄積やゲノムデータベースのさらなる拡充とともに、ますます増えていくと予 想される.本研究においても、ゲノムマイニングにより見出した未利用遺伝子由来の新 規天然物を取得することを目的として、麹菌異種発現系を用いた天然物探索に取り組ん だ.この手法では、遺伝子情報が直接得られる化合物の構造に反映されるため、標的と する遺伝子クラスターの設定が、特異な構造を有する新規二次代謝物を取得するための 鍵となる.



Figure 5. 未利用生合成遺伝子クラスターを活用する天然物探索.

#### 1-8. 糸状菌の高還元型ポリケタイド生合成酵素

糸状菌の高還元型ポリケタイド合成酵素 (HR-PKS) は高脂血症薬の lovastatin や HSP90 阻害活性を有する radicicol<sup>53</sup>, 植物毒性物質 solanapyrone A<sup>54</sup> など様々な生物活性 を示すポリケタイド化合物の炭素骨格を形成する生合成酵素である (Figure 6). 一般に, 炭素鎖の伸長と還元・修飾を行う複数のドメインが連なった共通した構造を有するが, その伸長回数や還元パターンは酵素毎に異なるため,さまざまな還元状態をもった炭素 鎖が形成される (Figure 7, 詳細はレジェンド参照)<sup>55</sup>. また, 構築された炭素鎖の切り出 し機構も様々であり, 加えて, 切り出し後のポリケタイド骨格の変換を行う修飾酵素や その組み合わせも化合物ごとにバリエーションが見られる (Figure 8)<sup>56-60</sup>. これらにより, 複雑多様なポリケタイド化合物群の生合成を可能にしている.HR-PKS 遺伝子は、糸状 菌のゲノム上で最も豊富に存在する生合成遺伝子の一つであるが、ほとんどは未利用な 遺伝子資源である.例えば、当研究室で単離したクモ内生糸状菌 Arthrinium sacchari Kumo-3 のゲノム上には 23 もの HR-PKS 遺伝子が含まれているものの、化合物情報と リンクしているものは一つもなく、また、A. sacchari を対象とした探索研究で HR-PKS 由来の化合物は取得されていない (Figure 9).HR-PKS 遺伝子は、多様な新規天然物の 取得が期待される、遺伝子情報を用いた天然物探索に適した探索源であると言える.



Figure 6. 糸状菌 HR-PKS 由来の二次代謝物. 青線; HR-PKS 由来の炭素鎖.



KS Ketosynthase AT Acyltransferase OH Dehydratase MT Methyltransferase ER Enoylreductase KB Ketoreductase OH Acyl carrier protein

Figure 7. 一般的な HR-PKS による炭素鎖伸長メカニズム. HR-PKS による炭素鎖形成は 大きく 2 つのプロセスに分けられる. 1 つ目が AT ドメインと KS ドメインの機能によ る炭素鎖伸長のプロセス, 2 つ目が (MT ドメイン), KR ドメイン, DH ドメインおよ び ER ドメイン (修飾ドメイン) によるβ-ケトンの還元プロセスである. ACP ドメイン は炭素鎖伸長プロセスにおいては,新たな伸長基質をロードする役割があり,β-ケト1 ンの還元プロセスでは各修飾ドメインの活性部位に炭素鎖を連絡させる役割がある.ま ず,炭素鎖伸長プロセスでは,AT が伸長基質であるマロニル CoA を ACP ドメインに ロードする.次に,KS が ACP 上のマロニルユニットと KS 上のアセチルユニットを縮 合させることで,炭素鎖が 2 炭素分伸長される. 続いてβ-ケトンの還元プロセスでは, KR によるケトン基の水酸基への還元,DH の脱水による二重結合の導入および ER に よる二重結合の還元によるメチレン鎖の形成される.伸長サイクルごとに機能する修飾 ドメインの組み合わせが異なるため,結果として多様な炭素骨格が構築される.



Figure 8. HR-PKS の様々な炭素鎖切り出しメカニズム. (A) PLP 依存性酵素による切り 出し, (B) 自発的な分子内ピロン環形成, (C) アシル基転移酵素による他の天然物骨格 への転移, (D) 非還元型 PKS (NR-PKS) への転移, 転移後は NR-PKS による炭素鎖伸長 と芳香環形成を経て, C 末端の還元 (R) ドメインで還元的に切り出される, (E) NR-PKS への転移, 転移後は NR-PKS による炭素鎖伸長と芳香環形成を経て, C 末端のチオエス テラーゼ (TE) ドメインでラクトン化されて切り出される.

<i>Arthrinium sacchari</i> Kumo-3 が有する二次代謝関連遺伝子(~100)							
PKS	49	NRPS	17	NRPS-like	13	Terpene cyclase	13
HR-PKS	23	Dipeptide	3	A-T-C	1	C15	8
NR-PKS	13	Tripeptide	1	A-T-R(RR)	9	C20	1
PR-PKS	2	Tetrapeptide	2	A-T-TE	1	C30	4
PKS-NRPS	5	Pentapeptide	2	他	2	Ripps core	8
Type III	2	Hexapeptide	3			FAS	3
Unknown*	4	Unknown*	6			DMATS	2

A. sacchari Kumo-3 から単離された化合物



Figure 9. Arthrinium sacchari Kumo-3の有する二次代謝関連遺伝子と A. sacchari Kumo-3 から単離された化合物.

#### 1-9. 糸状菌マクロライド天然物

糸状菌マクロライドは、抗菌活性を有する cephalospolide B (*Cephalosporium aphidicola*, 10 員環)<sup>61</sup> や rickiol A (*Hypoxylon rickii*, 20 員環)<sup>62</sup>, タンパク質小胞輸送阻害活性を示す brefeldin A (*Penicillium ducumbens*, 16 員環)<sup>63</sup>, 抗真菌活性をもつ eushearilide (*Eupenicillium shearii*, 24 員環)<sup>64</sup> など, 様々な生物活性物質が知られるラクトン環骨格を有するポリケ タイド化合物である (Figure 10). これまでに様々な属の糸状菌から 10-24 員環構造から なる多様なマクロライドが数多く単離されている. しかし, これまでに生合成研究の報 告例はほとんどなく, その生合成機構は明らかにされていない.



Figure 10. 生物活性が報告されている糸状菌マクロライドの例.

#### 1-10. 本研究の目的

糸状菌は、多様な化学構造や特異な生物活性を有する二次代謝物を生産する、天然物 創薬における重要な微生物資源である.近年のゲノム解析技術の進展により、糸状菌ゲ ノムには膨大な二次代謝物生合成遺伝子クラスターが存在することが明らかとなり、ま た、そのほとんどは化合物情報と結びついていない未利用遺伝子クラスターであること がわかってきた.天然化合物が創薬資源として再び脚光を浴びている現代において、そ れら遺伝子資源由来の新規天然物の取得が求められている.近年、ゲノム情報が容易に 入手可能となり、また、優れた汎用宿主を含め様々な分子生物学的ツールが整備されて きたことで、特定の未利用遺伝子クラスターを標的とした天然物探索が可能となってき た.本研究では、未利用遺伝子資源由来の新規物質の取得を目指し、ゲノムマイニング と麹菌異種発現系を活用する天然物探索に取り組んだ.

糸状菌 HR-PKS 遺伝子は,多様な生物活性を示すポリケタイド化合物群の骨格形成に 関わる生合成遺伝子である.その特徴的な炭素鎖伸長メカニズムと周辺にコードされる 様々な修飾酵素の機能により,多様なポリケタイド化合物群の生成を可能にしている. また,HR-PKS 遺伝子は糸状菌のゲノム上に最も豊富に存在する生合成遺伝子である一 方で,ほとんどが生成される化合物と結びついていない機能未知の遺伝子資源である. それら未利用な HR-PKS を活用することで新規活性物質の取得が期待された.そこで 本研究では,HR-PKS と特徴的な遺伝子の組み合わせに着目したゲノムマイニングを行 ったところ,これまで報告のない HR-PKS とα/β-hydrolase superfamily タンパク質を含む 生合成遺伝子クラスターを多数見出した.それらクラスターを標的に麹菌異種発現系を 構築した結果,数々の新規マクロライド天然物の取得に成功すると同時に,生合成機構 の解明に至った.本研究で得られた成果は,麹菌異種発現系を活用する天然物探索が, 生合成メカニズムが未解明の天然物化合物群の創出にも有用であることを実証するも のである.

#### 1-11. 本論文の構成

本博士論文第2章では、HR-PKSと機能未知のα/β-hydrolase superfamily タンパク質を コードする生合成遺伝子クラスターを標的とした、麹菌異種発現系を基盤とした天然物 探索について述べた.新規大環状ポリケタイド化合物の単離構造決定とその生合成機構 の解析結果の詳細を記した.

第3章では,第2章で得られた知見に基づいたゲノムマイニングの結果について述べた.ゲノム情報に基づく天然物探索の遺伝子資源となる数多くの遺伝子クラスターの発見と詳細なクラスター解析の詳細を記した.

第4章では、ゲノムマイニングにより見出した機能未知の修飾酵素を含む遺伝子クラ スターを標的とした天然物探索の結果について述べた.新規22員環および24員環マク ロライドの単離構造決定とホスホエタノールアミン転移酵素、ホスホコリン転移酵素の 機能解明に至った詳細を記した.

第5章では、さまざまな属の糸状菌由来の新規マクロライドの探索結果について述べた. 既知 16員環マクロライド、新規カルボン酸体および新規 12員環マクロライドの単離構造決定の詳細を記した.

第6章では, 麹菌異種発現系を用いた brefeldin A の生合成研究について述べた. 特徴的な分子内 C-C 結合形成機構とラクトン環構築メカニズムに関する解析結果の詳細を記した.

## 第2章

ケムシ内生糸状菌 Arthrinium phaeospermum ゲノム上にコードされる遺伝子クラスターの 麹菌異種発現と新規大環状ポリエンマクロライドの取得

#### 2-1. 緒言

当研究室では, 麹菌異種発現系を基盤とする新規天然物探索の標的となる遺伝子資源 を得るために、公開データベースや独自に採集した昆虫・植物内生糸状菌のドラフトゲ ノムを用いた標的遺伝子クラスターの探索 (ゲノムマイニング)を行っている <sup>37</sup>. 新規 天然物をコードする遺伝子クラスターを探索するには, 骨格形成を担う遺伝子が新しい, もしくは、クラスターを構成する遺伝子の組み合わせが新しいものを探す必要がある. 糸状菌 HR-PKS は共通のドメイン構造ながら多様なポリケタイド鎖を生合成すること, また,様々な修飾酵素遺伝子とクラスターを形成することで多様な天然物の生合成に関 与している <sup>55</sup>. 一方, 一株の糸状菌のゲノム上に数十もの HR-PKS がコードされている にも関わらず、ほとんどが化学構造と結びついていない未開拓の遺伝子資源である. そ こで本研究では、HR-PKS遺伝子を指標として、また、これまでに生合成的に明らかに されていない遺伝子構成のクラスターを探索した.まず、当研究室でこれまでに解読し た植物や昆虫内生糸状菌のゲノムマイニングを行なった.その結果,HR-PKSの近傍に mhpC ドメインを有する機能未知の $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質がコードされ るクラスターを4つ見出した (Figure 11). これまでの生合成研究において, このような 遺伝子構成からなるクラスター由来の二次代謝物は明らかにされておらず,新規天然物 の獲得もしくは新規生合成システムの解明が期待される、そこで本研究では、それら機 能未知の遺伝子クラスターを遺伝子情報に基づく天然物探索における探索源として捉 え, 麹菌異種発現系の構築に取り組んだ.



Figure 11. 昆虫内生糸状菌ゲノム上にコードされる HR-PKS およびα/β-hydrolase superfamily タンパク質を含む生合成遺伝子クラスター.

#### 2-2. apml クラスターの異種発現系の構築

#### 2-2-1. クラスター解析

*apml* クラスターは、当研究室にて東北大学青葉山キャンパスで採集したケムシより 単離した *Arthrinium phaeospermum* Kemushi-1 のゲノム上に見出した <sup>65</sup>. *apml* クラスタ ーには ApmlA 遺伝子 (HR-PKS) と ApmlB 遺伝子 (mhpC ドメイン <sup>66</sup>を含む  $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質) が隣り合ってコードされていた (Figure 12). 一方, それらの周 辺には生合成に関わると予想される遺伝子は見出されなかった. ApmlA と ApmlB を BLAST 検索で解析したところ, それぞれ, brefeldin A の生合成への関与が推測されて いる Bref-PKS と Bref-TH との相同性があった (Table 1). また, ApmlA は, KS, AT, DH, ER, KR, ACP ドメインから構成される iterative Type I PKS, ApmlB は、上述のよ うに mhpC ドメインを有する $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質と推定された (Figure 13).



Figure 12. apml クラスターの構成遺伝子.

ApmlA		
0.000	1 500 1000	1500 2000 2466
query seq.	active site 🛕 🛛 🔺 🔺	NAD(P) binding site
		NAD(P) binding site
Specific hits	PksD	PKS_ER KR
	PKS	enoyl_red PKS_KR
	PKS_KS	Qor FabG
	ketoacy1-synt	ADH_zinc
Non-specific	decarbox_cond_enzymes PKS_AT PS-DH	QOR1 KR_2_FRS_
11103	omega_3_PfaA PKS_DH	polyketide_synthase KR_FAS_SD
Superfamilies	cond_enzymes superfamily	MDR superfamily MADB_Ross md PP-b
	PKS_KS superfamily	PT200354 superfamily St R superfam
	omega_3_PfaA superfamily	PKS_ER superfamily FabG supe
		Qor superfamily fabG sup
		quinone_pig3 superfa <mark>30x0_ACP_r</mark>
AnmlB		
/ prilib		
0		200 250 307
Query seq. Specific hits	Hhat	
Non-specific	DOP2	
hits		
Superfamilies	DAP2 superfamily	
	MhpC superfam:	ily

Figure 13. ApmlA, Bのドメイン構造.

Table 1. <i>apml</i> cluster	(Arthrinium	phaeospermum	Kemushi-1	).
------------------------------	-------------	--------------	-----------	----

Gene	Size (bp)	Protein homologue (accession number)	Identity (%)/ similarity (%)	Predicted function
apmlA	7,834	Highly reducing polyketide synthase Bref-PKS [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ABB7)	44/61	HR-PKS
apmlB	977	Thiohydrolase Bref-TH [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ACU9)	38/58	Thioesterase

#### 2-2-2. apml クラスターの麹菌異種発現およびポリエンマクロライドの単離構造決定

*apml* クラスターにより生成される天然化合物の構造を明らかにするために, *Aspergillus oryzae* NSAR1 を異種ホストとした異種発現系の構築に取り組んだ.まず, *apmlA* と *apmlB* を導入した麹菌株 *A. oryzae* (AO)-*apmlAB* を作製した.得られた形質転 換株を CPS 液体培地で培養し,培養菌体の MeOH 抽出物を HPLC 分析したところ, コ ントロールでは生産されない新たな化合物ピーク 1 (主生成物), 2 (副生成物)の生産を 確認した(Figure 14A). それら化合物は,長波長領域に複数の吸収極大を有する特徴的な UV 吸収パターンを示したことから,共役へキサエン構造をもつことが示唆された (Figure 14B)<sup>67</sup>.また LC-MS 分析により,1は 609 [M+Na]<sup>+</sup>, 2は 565 [M+Na]<sup>+</sup>(1-44 mass unit) にそれぞれ分子イオンピークを示した. 次に、1 および 2 の化学構造を明らかにするために、まず、AO-apmlAB の大量培養 (3.6 L) を行った. 精製条件を最適化した結果,培養菌体 MeOH 抽出物をピリジンに溶 解後、フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて、溶媒条件 (CHCl<sub>3</sub>-MeOH (19/1-9/1)) で溶出した後に、1 を含む画分を CHCl<sub>3</sub> で洗浄することで、化合物 1 を精製することができた.化合物 2 に関しては、一度の分離操作では精製できず、また、 粗精製の段階で各種有機溶媒へと溶解性が低下し、これ以上の精製が困難であった.そ こで、2 を主に含む粗精製物をアセチル化した後に、2 段階の精製を経て、2 のアセチ ル化体 4 を単離した.



Figure 14. AO-*apmlAB*を培養したときの菌体成分の HPLC クロマトグラム (検出波長 380 nm). (B) 化合物 1 及び 2 の UV 吸収スペクトル. (C) 化合物 1-4 の化学構造. (D) 化合物 1 の 2 次元 NMR 相関.

高分解能 ESIMS (m/z 609.3366 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 609.3398) および<sup>13</sup>C NMR スペクトル より,1の化学式をC34H50O8と決定した.化合物1のUV吸収スペクトルは325,339, 357 および 377 nm に極大吸収を示したことより共役へキサエンの存在が示唆された<sup>67</sup>. また,<sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて 0.1 ppm 間 ( $\delta_{\rm H}$  6.21–6.31) にオレフィンプロトンの ピークが集中していたことから, 全て E 体の共役へキサエン構造であると示唆された <sup>68</sup>. また,<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY と HSQC-TOCSY,<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY スペクトルにおける末端メチル H-34 ( $\delta_{\rm H}$  1.18) からエチレン水素 H-13 ( $\delta_{\rm H}$  6.28) までの連続する相関が観測されたこと により、C-13-C-34 の部分構造が明らかとなった. 同様に、メチレン水素 H-2 (δH 2.35, 2.45) からエチレン水素 H-6(δ<sub>H</sub> 6.25) まで連続する相関が観測されたこと,および, H-2 と H-3 (δ<sub>H</sub> 2.36, 2.49) からエステルカルボニル C-1 (δ<sub>C</sub> 172.3) への HMBC 相関が確認 されたことから C-1-C-6 の部分構造を明らかとした. また, H-33 (& 4.95) から C-1 へ の HMBC 相関が観測されたことから, C-1 と C-33 がエステル結合により繋がっている ことを確認した.残る6つの sp2 炭素はC-7からC-12間の共役へキサエンの炭素と帰 属した. Δ22.23 と Δ26.27 の幾何異性に関しては, J22.23 と J26.27 のカップリング定数がそれぞ れ 15.3 Hz を示したこと,および NOESY スペクトルの H-21/H-23, H-22/H-24, H-25/H-27 および H-26/H-28 の相関が見られたことより, E 体と決定した. その他詳細な 2 次元 NMR 解析により<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>C シグナルを帰属した (Figure 14D, Table 2). 以上より, phaeospelide A(1)の平面構造を全て E体の共役へキサエンを有する 34員環マクロライ ドと決定した (Figure 14C). すべてのオレフィンおよび水酸基の位置は、ポリケタイド の生合成過程で生成可能であった<sup>55</sup>. なお, 1のアセチル化体 3の NMR 解析結果も, 1の平面構造を支持した (Figure S1, Table 2).

19

		1			5
osition	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)	Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)
	172.3		1	172.2	
	34.5	2.35 (1H, m)	2	34.0	2.36 (1H, m)
		2.45 (1H, m)			2.39 (1H, m)
	28.2	2.36 (1H, m)	3	28.1	2.35 (2H, m)
		2.49 (1H, m)			
1	133.4	5.79 (1H, m)	4	133.1	5.71 (1H, m)
5	132.0	6.17 (1H, m)	5	131.7	6.11 (1H, m)
5	132.2	6.25 (1H, m)	6	131.9	6.22 (1H, m)
	131.4			132.8	
	132.5			132.9	
7-12 <sup>e</sup>	132.6	6 21-6 36 (6H)	$7 - 12^{i}$	133.0	6 28-6 31 (6H)
/ 12	133.6	0.21 0.50 (011)	/ 12	133.1	0.20 0.51 (011)
	133.7			133.2	
	133.8			133.2	
13	132.4	6.28 (1H, m)	13	131.4	6.24 (1H, m)
14	134.7	6.24 (1H, m)	14	133.2	6.11 (1H, m)
15	128.1	5.68 (1H, m)	15	131.3	5.73 (1H, m)
16	36.8	2.37 (1H, m)	16	40.0	2.20 (1H, m)
		2.47 (1H, m)			2.34 (1H, m)
17	70.2	4.89 (1H, m)	17	67.5	5.73 (1H, m)
18	38.2	1.78 (1H, m)	18	44.2	1.32 (1H, m)
		1.84 (1H, m)			1.50 (1H, m)
19	71.7	4.90 (1H, m)	19	66.0	3.51 (1H, m)
20	130.5	1.66 (1H, m)	20	47.1	1.26 (1H, m)
		1.93 (1H, m)			1.56 (1H, m)
21	71.7	5.10 (1H, m)	21	69.5	3.89 (1H, m)
22	130.5	5.36 (1H, dd, 15.4, 7.6)	22	135.9	5.34 (1H, dd, 15.3, 6.6)
23	130.1	5.54 (1H, m)	23	127.1	5.41 (1H, dt, 15.3, 6.8)
24	38.0	2.20 (2H, m)	24	41.0	1.96 (1H, m)
					2.03 (1H, m)
25	72.9	5.15 (1H, m)	25	71.0	3.83 (1H, m)
26	131.5	5.32 (1H, dd, 15.5, 7.2)	26	135.8	5.36 (1H, dd, 15.3, 6.0)
27	128.7	5.51 (1H, m)	27	126.6	5.50 (1H, dd, 15.3, 7.6)
28	37.8	2.08 (1H, m)	28	40.9	1.89 (1H, m)
		2.27 (1H, m)			2.03 (1H, m)
29	69.8	4.89 (1H, m)	29	69.7	3.61 (1H, m)
30	38.7	1.61 (1H, m)	30	44.2	1.32 (2H, m)
		1.78 (1H, m)			
31	68.1	4.90 (1H, m)	31	66.9	3.60 (1H, m)
32	40.7	1.68 (2H, m)	32	44.4	1.42 (1H, m)
					1.57 (1H, m)
33	67.1	4.95 (1H, m)	33	68.0	5.03 (1H, m)
34	20.6	1.18 (3H, d, 6.2)	34	21.1	1.16 (3H, d, 6.2)
Ac-1′	$170.5^{f}$		17-OH		4.53 (1H, brd, 3.6)
	21.3 <sup>g</sup>	$2.04^{h}$ (3H, s)	19-OH		4.40 (1H, brd, 4.1)
Ac-2′	170.3 <sup>f</sup>		21-OH		4.50 (1H, brd, 3.9)
	21.2 <sup>g</sup>	$2.04^{h}$ (3H, s)	25-OH		4.38 (1H, brd, 4.0)
Ac-3'	169.7		29-OH		4.60 (1H, brd, 3.9)
	21.0	2.00 (3H, s)	31-OH		4.60 (1H, brd, 4.3)
Ac-4′	$170.1^{f}$				
	$21.1^{g}$	$2.03^{h}$ (3H, s)			
Ac-5'	169.8	\- / /			
	21.0	1.98 (3H. s)			
Ac-6'	170.1 <sup>f</sup>				
	21.1 <sup>g</sup>	$1.97^{h}$ (3H, s)			
	41.1	1.77 (311, 3)			

Table 2. <sup>13</sup>C (225/200 MHz) and <sup>1</sup>H (900/800 MHz) NMR data for 1<sup>*a,c*</sup> and 3<sup>*b,d*</sup>.

[d] Recorded in CDCl<sub>3</sub>.

[*e*-*i*] Interchangeable.



Figure 15. (A) 化合物 1 の絶対配置決定の戦略. 化合物 1 のハイライトは立体中心を示 す. (B) 化合物 1 のフラグメント化のスキーム. (C) フラグメント 5 及び 7 の誘導体化 のスキーム. (D) アセトナイド保護体 10, 11, 14, 15 の NOE 相関 (ピンク矢印). (E) *S*/*R*-MTPA 保護体の $\Delta \delta_{H(S-R)}$  values (parts per million). (F) 化合物 16 と *S* 体 *R* 体標品の VCD および IR スペクトルの比較 (c = 0.06 M の 16 または c = 0.15 M の標品の CDCl<sub>3</sub> 溶液を 用いて室温で測定).

#### 2-2-3. Phaeospelide A (1) の立体化学の決定

化合物1には7ヶ所の立体化学が存在する.立体化学の決定を簡便にするために,二 重結合を足がかりとして,オゾン分解により1をフラグメント化して絶対立体配置を決 めることにした (Figure 15A). すなわち,1のフラグメントA-Cのうち,フラグメント BはVCD スペクトルを標品と比較する事で絶対配置を決定し,フラグメントAおよび Cはアセトナイド保護体へと変換しNOE相関を読み取ることで相対配置を決めた後に、 二級アルコールの絶対立体配置決定で一般的な新 Mosher 法を適用することにした<sup>69</sup>.

実際には、1のアセチル化体に対してオゾン分解と NaBH4 還元を施し、フラグメント 5-7 を得た. 化合物 6 はトリアセチル化体 16 へ変換した後に, 16 と市販の (S)-, (R)-1,2,3-butanetiol から誘導したトリアセチル化体の VCD スペクトルと比較することで,1 の 25 位の絶対配置を Sと決定した (Figure 15F). 5 および 7 は末端ジオールを選択的に 保護すること、および、UV による検出感度を向上し単離操作などを行いやすくするこ とを目的に, TBDPS 基による保護を行うことでそれぞれ 9 と 13 を得た (Figure 15C). 化合物9と13は、1.3-ジオールをアセトナイド保護することでそれぞれ10,11あるい は14,15 へと変換した. 化合物 10 は H-2'/H-19, H-21 および Ha-20/H-19, H-21 の NOE 相関が観測されたことより, いす型配座をとっていることが明らかとなった. 同様に 11 はH-2'/H-17,H-19 および Ha-18/H-17,H-19の NOE 相関から,いす型配座をとっている ことがわかった.これにより、17位、19位および21位の相対配置は17R\*、19R\*、21R\*で あることが明らかとなった (Figure 15D). また, 化合物 14 は H-31/H-2', Hb-32 および H-33/H-3′, Ha-32の NOE 相関より, ねじれボート型配座をとっていることが明らかとな った. 化合物 15 は H-2'/H-29, H-31 および Ha-30/H-29, H-31 の NOE 相関から,いす型 配座をとっていることがわかった.これにより,29,31 および 33 位の相対配置は,29R\*, 31R\*, 33R\*であることが示された (Figure 15D). 最後に, 10 および 14 に対して新 Mosher 法を適用することで、17位および29位の立体化学をSと決定した(Figure 15E)<sup>69</sup>.以上 より、1の全ての絶対立体配置を175、195、215、255、295、315、335と決定した.

#### 2-2-4. Phaeospelide B (2) の構造の決定

化合物 2 のアセチル化体 4 の平面構造は、高分解能 ESIMS (*m/z* 775.3639 [M+Na]<sup>+</sup>、 calcd 775.3664) および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより、化学構造を C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>O<sub>11</sub> と決定した.化 合物 4 の <sup>1</sup>H NMR スペクトルにおいて $\delta_{\rm H}$  6.24-6.41 にオレフィンプロトンの集中したピ ークがみられたこと、2 の UV 吸収スペクトルが 1 と同様に 320-380 nm に 4 つの極大 吸収を示したことから,全てE体の共役へキサエン構造が存在することがわかった<sup>67,68</sup>. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY および HSQC-TOCSY スペクトルにおける末端メチル H-32 ( $\delta_{\rm H}$  1.20) からエチレン水素 H-14 ( $\delta_{\rm H}$  6.23) までの連続する相関が観測されたことにより, C-14-C-32 の部分構造が明らかとなった (Figure 16). 同様に,メチレン水素 H-2 ( $\delta_{\rm H}$  2.36, 2.46) からエチレン水素 H-5 ( $\delta_{\rm H}$  6.18) まで連続する相関が観測されたこと,および, H-2, H-3 ( $\delta_{\rm H}$  2.36, 2.51) からエステルカルボニル C-1 ( $\delta_{\rm C}$  172.4) への HMBC 相関が確認さ れたことから C-1-C-5 の部分構造を明らかとした.また, H-31 ( $\delta_{\rm H}$  4.94) から C-1 への HMBC 相関が観測されたことから, C-1 と C-31 がエステル結合により繋がっているこ とを確認した.

残る 8 つの sp2 炭素は C-6 から C-13 間の共役へキサエンの炭素と帰属した.  $\Delta_{20,21}$  と  $\Delta_{24,25}$ の幾何異性に関しては,  $J_{20,21}$  と $J_{24,25}$ のカップリング定数がそれぞれ 15.5, 15.4 Hz を示したことより, *E* 体と決定した. その他詳細な 2 次元 NMR 解析により <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C シグナルを帰属した (Table 3). 以上より 4 の構造を, 共役へキサエンを有する 32 員 環マクロライドであると決定した (Figure 14C). これにより化合物 2 (phaeospelide B) は, 4 の脱アセチル化体として化学構造を決定した (Figure 14C). 化合物 1 と 2 の構造の違 いは CH2-CHOH の部分構造 (44 mass units), すなわち, PKS によるポリケタイド鎖伸 長 1 サイクル分に対応する 1 の C-16/C-17, C-18/C-19 あるいは C-20/C-21 の有無のみで あった. 化合物 2 の絶対立体配置は生合成的な観点に基づき, 1 と同様に全て *S* と決定 した.



Figure 16. 化合物4の2D NMR相関. 青線は<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 1H-1H TOCSYおよびHSQC-TOCSY, 赤線は構造決定に重要なHMBC相関を示した.

Position	$^{13}C$	<sup>1</sup> H (multi, J in Hz)
1	172.4	
2	34.3	2.36 (1H, m)
-	0 110	2.60 (111, m) 2.46 (1H m)
3	28.3	2.10(111, m) 2.51(1H, m)
5	20.5	2.31(111, 111) 2.26(111, 111)
4	122.4	2.30(1H, H)
4	133.4	5.82 (IH, m)
5	132.2	6.18 (1H, m)
6	133.8	6.39 (1H, m)
	131.2	
	132.1	
7 12¢	132.1	6 24 6 41 (6H)
/-12	132.8	0.24-0.41 (011)
	133.8	
	134.0	
13	131.6	6.26 (1H, m)
14	135.4	6.23 (1H, m)
15	127.5	5.66 (1H, m)
16	36.8	2.38 (1H, m)
		2.52 (1H, m)
17	70.3	4 87 (1H m)
18	38.3	1.78 (1H, m)
10	50.5	1.88 (1H m)
19	71.4	5.22 (1H m)
20	131.3	5.22 (111, 11) 5.40 (1H dd 15.5.7.4)
20	128.0	5.48 (1H dt 15.5, 7.4)
21	37.8	2.77(1H m)
22	57.8	2.27 (111, 11) 2.22 (114, m)
22	72.2	2.25 (111, 111) 5 12 (111, 111)
23	/ 5.5	$5.12(1\Pi, \Pi)$
24	131.1	5.54 (111, ud, 15.4, 7.4)
25	129.4	5.53 (1H, ddd, 15.4, 8.4, 5.7)
26	38.3	2.20 (1H, m)
	<i></i>	2.23 (1H, m)
27	69.7	4.94 (1H, m)
28	39.0	1.61 (1H, m)
		1.78 (1H, m)
29	68.2	4.91 (1H, m)
30	40.8	1.68 (2H, m)
31	67.2	4.94 (1H, m)
32	20.6	1.20 (3H, d, 6.3)
Ac-1'	$170.3^{d}$	
	$21.2^{e}$	$2.05^{f}(3H, s)$
Ac-2′	$170.2^{d}$	
	21.3 <sup>e</sup>	$2.06^{f}(3H, s)$
Ac-3'	169.9	
	21.1	2.02 (3H, s)
Ac-4'	$170.1^{d}$	
	$21.1^{e}$	$1.98^{f}(3H, s)$
Ac-5′	170.2	
	21.3	2.06 (3H, s)

Table 3. <sup>13</sup>C (225 MHz) and <sup>1</sup>H (900 MHz) NMR data for  $4^{a,b}$ .

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY, HSQC-TOCSY experiments.

[b] Recorded in CDCl<sub>3</sub>. [c-f] Interchangeable.

#### 2-3. Phaeospelide A, B の生合成機構の解析

上記の結果より, *apmlA* (HR-PKS) と *apmlB* (mhpC ドメインが保存される $\alpha'\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質) からなる *apml* クラスターは 34, 32 員環構造を有するポリエン マクロライド phaeospelides A (1), B (2) を与えることが明らかとなった.次に, 1 と 2 の生合成に ApmlA と ApmlB の両方の機能が必要かどうかを確かめることを目的に, *apmlA* と *apmlB* を順次導入し,代謝物の解析を行った (Figure 17). まず, *apmlA* のみを 導入した株 AO-*apmlA* を作製したところ, *A. oryzae* ゲノムへの遺伝子の導入は確認でき るものの,いずれの形質転換株においても1と2のピークはみられなかった (Figure 18). 次に, *apmlA* の導入を確認した非生産株に対して *apmlB* を導入した株 AO-*apmlA*+*apmlB* を作製し, 同様に分析したところ, 1 と 2 の生産が確認された. これにより, 1 と 2 は ApmlB の両方が機能することで生合成されることを明らかとした. この結果 から, mhpC ドメインが保存される $\alpha'\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質が HR-PKS の ACP 上にロードされた炭素鎖をラクトン環構築とともに切り離す, チオエステラーゼ (TE) 活性を有することが示唆された. 以上は,糸状菌マクロライドのラクトン環構築 に関わる生合成遺伝子が示された初めての例である. 以降, mhpC ドメインが保存され る $\alpha'\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質を MhpC-TE と呼称する.



Figure 17. AO-*apmlA*, *apmlA*+*apmlB*, *apmlAB* を培養したときの菌体成分の HPLC クロ マトグラム (検出波長 380 nm).



Figure 18. Genome PCR による各形質転換体への遺伝子導入の確認.

#### 2-4. apml クラスター保有株 A. phaeospermum Kemushi-1 の培養と代謝物の分析

*apml*クラスターの保有株である *A. phaeospermum* Kemushi-1 が研究室での培養条件下で **1**,2 を生産するかどうかを確かめるために、いくつかの汎用培地を用いて培養し、得られた菌体の抽出成分を分析したところ、いずれの培養条件においても生産が確認されなかった (Figure 19). この結果から、*apml*クラスターは研究室で通常利用される培養条件下では化合物の生産に至らない生合成遺伝子クラスターであることが明らかとなった. これは麹菌異種発現系を用いた天然物探索が、本来の宿主での遺伝子発現の有無に関わらず利用可能であることを支持する結果であった.



Figure 19. *apml* クラスター保有株 *A. phaeospermum* Kemushi-1 を培養したときの菌体成 分の HPLC クロマトグラム (検出波長 380 nm).

#### 2-5. 考察

本章では, *A. phaeospermum* Kemushi-1 のゲノム上にコードされる ApmlA (HR-PKS) と ApmlB (MhpC-TE) からなる *apml* クラスターを麹菌で異種発現することにより, 34 員環および 32 員環構造を有する新規ポリエンマクロライドの取得に成功した. ApmlA と ApmlB を共発現させることで初めて化合物の生産が確認されたことから, そのマク ロライド骨格の形成には, 両方の機能が必須であることが示された.

以上の結果と1および2の化学構造に基づき,生合成メカニズムを推定した (Figure 20).まず,ApmlA がマロニル CoA を伸長基質として16回の炭素鎖伸長サイクルを繰り返すことで,34の炭素からなる骨格が形成される.伸長サイクル毎に機能する修飾ドメインが異なり,ポリオールからなる親水性部分は炭素鎖伸長の前半でKRドメインが機能することで導入される.化合物1の絶対配置に基づくと,伸長1回目に機能するKRドメインはβ-ケトンをL体の水酸基に還元するが,残りは全てD体の水酸基へと変換することがわかり,このように単一のKRドメインが異なる立体化学へと還元することは興味深い.特徴的な全てE体の共役へキサエンは伸長10-15回目にKRとDHドメ

インが連続して働くことで形成される. 伸長 16 回目は全ての修飾ドメインが機能する ことでメチレンが導入される. 最後に, ACP ドメイン上の炭素鎖が MhpC-TE である ApmlB のセリン残基に転移され, ラクトン環形成を伴い切り出されることで 1 が生成 される. また, 化合物 2 は, 伸長 7-9 回目に対応する伸長サイクルが一つスキップされ た結果, 生成されると推測された.



Figure 20. Phaeospelide A (1) の推定生合成メカニズム.

ApmlA は C34 の phaeospelide A を形成するために 16 回の炭素鎖伸長を行うが,これ はこれまで報告のあった iterative Type I PKS の中で最大の伸長回数である (これまでは 13 回の伸長反応により C28 の炭素鎖を形成する BuaA)<sup>70</sup>. また,共役したヘキサエンを 構築する糸状菌 HR-PKS は初めての報告である.糸状菌 HR-PKS による炭素鎖の伸長 回数や修飾様式などの制御メカニズムはほとんどわかっていないが,上記のようなユニ ークな特徴を有する ApmlA はそれらを解明するための重要な手がかりとなりうる.

生物活性試験の結果,1は抗菌活性,抗真菌活性,抗ウイルス活性,細胞毒性のいず れの活性も示さなかった.ポリエンマクロライド化合物は抗真菌活性を有する化合物が 多数知られるが,amphotericin B<sup>10</sup>や nystatin<sup>71</sup>は分子内の水酸基にアミノ糖といった親 水性残基を有している.Amphotericin B のアミノ糖の構造がその活性に影響を与えるこ
とが報告されており<sup>72</sup>, また, アミノ糖の水酸基が細胞膜のエルゴステロールとの相互 作用およびその活性に重要であることが示唆されている<sup>73</sup>. Phaeospelides においてもそ のような親水性残基が付加されることで, 活性が発現する可能性が考えられるが, *apml* クラスター周辺にはそのような修飾遺伝子は見出されなかった.

本研究により,糸状菌マクロライド天然物に関わる生合成遺伝子を初めて実験的に明 らかとした.この知見に基づき, ApmlA を指標としたデータベース検索により見出し た推定マクロライド生合成遺伝子クラスターを遺伝子資源として用いることで,マクロ ライド天然物に焦点を当てた天然物探索研究が可能となった.

# 第3章

糸状菌マクロライド推定生合成遺伝子クラスターのゲノムマイニング

#### 3-1. 緒言

第2章より、ApmlA (HR-PKS) と ApmlB (MhpC-TE) から構成される apml クラスタ ーがマクロライド天然物の生合成遺伝子クラスターであることが明らかとなった.また、 そのマクロライド骨格の構築には、ApmlA と ApmlB の両方の機能が必要であることが 示された.この結果から、糸状菌マクロライド生合成遺伝子クラスターには HR-PKS と MhpC-TE が含まれていることが示唆された.そこで第3章では、麹菌異種発現系を活 用する天然物探索の標的となる遺伝子資源を得るために、ApmlA のアミノ酸配列を用 いた相同性検索によるゲノムマイニングに取り組んだ.見出した推定糸状菌マクロライ ド生合成遺伝子クラスターに関しては、HR-PKS と MhpC-TE のアミノ酸配列に基づく バイオインフォマティクス解析を行った.

以降,遺伝子クラスターの解析及び各遺伝子の機能解析については,各種 web ツール を用いて下記のように行った.相同遺伝子及び類縁遺伝子クラスターの探索は,National Center for Biotechnology Information (NCBI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov)の公開データベ ースを利用した場合は Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)検索により行い,当 研究室の保有するドラフトゲノムデータを利用した場合は GenomeMatcher (http://www.ige.tohoku.ac.jp/joho/gmProject/gmhomeJP.html)のツールBLASTinterfaceを用 いて,ローカル環境下でのBLAST検索により行った.ゲノム配列上の遺伝子コード領 域の推定および塩基配列からのアミノ酸配列の推定には,2ndFind (biosyn.nih.go.jp/2ndfind)を用いた.なお,2ndFindの解析結果に基づき,HR-PKSの近 傍 (10 kbp 以内)に $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質がコードされている遺伝子領域 を推定マクロライド生合成遺伝子クラスターとした.アミノ酸配列の相同性 (identity/similarity) は BLAST での配列比較に基づく数値を記載した. 遺伝子機能の推定 は, BLAST 検索の結果に加え, 保存されたタンパク質の機能ドメインの情報 (Conserved Domain Search, NCBI) に 基 づ い て 行 っ た . 系 統 樹 解 析 に は , MEGA7 (https://www.megasoftware.net/) を用いた.

### 3-2. ApmIA ホモログを指標としたゲノムマイニング

まず、マクロライド生産に関わることが明らかとなった ApmlA を指標に糸状菌のゲ ノムデータベースを用いてゲノムマイニングを行い,周辺 10 kb 以内に ApmlB ホモロ グがコードされる遺伝子領域を探索した.ゲノムデータベースには、当研究室で独自に 採集した植物・昆虫内生糸状菌のドラフトゲノムデータに加え, NCBI に登録されてい る公開データベースを用いた. その結果, Metarhizium 属や Cordvceps 属菌などの昆虫寄 生菌や Colletotrichum 属や Macrophomina 属菌といった植物病原菌, 当研究室で分離培 養した各種内生糸状菌, あるいは Umbilicaria 属菌といった地衣類を含め計 61 属 159 種 の糸状菌 (子嚢菌門) のゲノム上に, HR-PKS と TE が近傍にコードされる生合成遺伝 子クラスターを 200 以上見出した (2019/10/29 時点, Table 4). 糸状菌一株あたりのクラ スター保有数はほとんどの場合1つであった一方で, fungal sp. No.14919 は4つ, Xvlaria grammica は一株あたりで最大となる 5 つのクラスターを有していた. また, これまで マクロライド天然物の生産が報告されている糸状菌 Beauveria bassiana (cephalosporolides, 10 員環)<sup>74</sup>, Colletotrichum gloeosporioides (gloeosporone, 14 員環)<sup>75</sup>, Cordyceps militaris (cephalosporolides)<sup>76</sup>, Diplodia pinea (diplodialides, 10 員 環)<sup>77</sup>, Eupenicillium ludwigii (brefeldin A, 16 員環)78, Eupenicillium brefeldianum (brefeldins, 16 員 環)<sup>79</sup>. Penicillium verrucosum (Sch 642305, 16 員環)<sup>80</sup>, Pyrenophora teres (pyrenolides, 10 員 環)<sup>81</sup>のゲノム上にも同様のクラスターを見出した.

### 3-3. ApmIA ホモログおよび ApmIB ホモログの系統樹解析

次に、ゲノムマイニングにより見出された全ての推定マクロライド生合成遺伝子クラ スター内の HR-PKS を用いて系統樹解析を行った (Figure 21). 続いて、それら生合成遺 伝子クラスターの詳細なバイオインフォマティクス解析を行い、HR-PKS と MhpC-TE の周辺にコードされる修飾遺伝子の特徴的な組み合わせに基づき、いくつかの type に 分類した.また、ApmlB ホモログの MhpC-TE についても系統樹を作成した (Figure 22).



Figure 21. MhpC-TE の近傍にコードされる ApmlA ホモログの系統樹解析.本研究ある いは先行研究により機能が同定/推定された HR-PKS 由来の化合物を示した.赤丸;本 研究で扱った HR-PKS,青丸;機能が同定あるいは推定されている HR-PKS.



Figure 22. HR-PKS の近傍にコードされる ApmlB ホモログの系統樹解析.赤丸;本研究 で扱った MhpC-TE,青丸;機能同定あるいは推定されている MhpC-TE.

Type A に含まれる生合成遺伝子クラスターには、HR-PKS と MhpC-TE に加え、P450, short-chain dehydrogenase (SDR) および berberine bridge enzyme (BBE)-like enzyme とアノ テーションされる 3 つの修飾遺伝子が共通して保存されていた. Type A-1 の生合成遺 伝子クラスターは、 cephalosporolides の生産が報告されている *Beauveria bassiana* や *Cordyceps* (*Beauveria*) militaris のゲノム上にコードされていた (Figure 23)<sup>74,76</sup>. それら菌 種には HR-PKS と MhpC-TE を含む遺伝子クラスターが一つしかないことから、 cephalosporolides の生合成に関わると予想された. Type A-2 は *Penicillium* 属や *Xylaria* 属菌, type A-3 は *Penicillium* 属や *Lachnellula* 属菌など様々な属の糸状菌に渡って分布 していた. *P. expansum* の保有する *peml* クラスターに関しては第5章で扱った.



Figure 23. P450, SDR および BBE 様酵素を共通してコードする生合成遺伝子クラスター.

Type B の遺伝子クラスターには, glycosylphosphatidylinositol-ethanolamine phosphate transferase (GPI-ETP) ドメインを有するタンパク質と P450 (あるいは SDR) が保存され ていた. Aspergillus, Penicillium, Metarhizium, Colletotrichum, Lepidopterella 属糸状菌に 加え,藻類と共生関係にある糸状菌 (地衣類) の Umbillicaria pustulata にコードされて いた. A. kawachii の akml クラスター, C. incanum の ciml クラスターを標的とした麹菌 異種発現系を用いた天然物探索については,第4章で述べた.



Figure 24. GPI-EPT 様酵素と P450 (SDR) を共通してコードする遺伝子クラスター.

Type C の生合成遺伝子クラスターには, P450, SDR およびβ-lactamase ドメインを有 するタンパク質が共通してコードされていた. それらクラスターは, Aspergillus 属や Paraphaeosphaeria, Hirsutella 属菌に加え, 当研究室にてジョロウグモより分離培養した Hypoxylon fragiforme およびガガンボより単離した Cytospora sp.等広く分布していた<sup>65</sup>.



Figure 25. P450, SDR およびβ-lactamase 様酵素をコードする生合成遺伝子クラスター.

Type D には, 推定 brefeldin A 生合成遺伝子クラスター (bref クラスター) および当研 究室にて brefeldin A の生産を確認した Eupenicillium ludwigii MT-3 の有する elb クラス ターが含まれていた<sup>78,82</sup>. E. ludwigii MT-3 の elb クラスターを対象とした brefeldin A の 生合成研究は第6章に記した.



Figure 26.4 つの P450 をコードする推定 brefeldin A 生合成遺伝子クラスター.

なお、Type E の Aspergillus fumigatus の有する生合成遺伝子クラスターは既に機能解 析されており、fumagillin の生合成を担うことが報告されていた<sup>58</sup>. HR-PKS と MhpC-TE は、テルペン骨格に対して直鎖ポリエン側鎖を導入することが明らかとされている. Type E のその他クラスターは、同様の遺伝子構成をしていたことから、fumagillin ある いはその類縁体を生合成すると予想した.

また、type F の Stachybotrys chartarum および S. chlorhalonata 生合成遺伝子クラスターは比較ゲノム解析により、マクロライド化合物ではない atranone の生合成遺伝子クラスターとアノテーションされていた<sup>83</sup>.



Fumagillin Aspergillus fumigatus

(Type E)



Atranone Stachybotrys chartarum Stachybotrys chlorhalonata

(Type F)



### 3-4. 考察

本章ではHR-PKSとMhpC-TEに着目したゲノムマイニングにより,推定マクロライ ド生合成遺伝子クラスターを多種多様な糸状菌のゲノム上に見出した.糸状菌由来のマ クロライド天然物の報告数は数百に及ぶにも関わらず,今回見出したクラスターの9割 以上はマクロライド天然物の単離が未報告の菌種のゲノムにコードされていた.これま で報告されたマクロライド天然物は,菌種ごとに炭素鎖長(C8-C34)や環のサイズ(8-34員環),修飾パターンのバリエーションに富むことから,以上の遺伝子資源を活用し た天然物探索により,構造多様性に富んだマクロライド天然物の取得が期待された.ま た,クラスターの構成遺伝子に基づいた解析により,機能未知の修飾遺伝子を含む遺伝 子クラスターを多数見出した.これらを標的とした天然物探索により,これまで生合成 機構が明らかになっていない修飾様式を有する天然物が得られる可能性がある.

# Table 4. Fungal strains harboring biosynthetic gene cluster coding HR-PKS and MhpC-TE. (2019/10/29).

	A	a number		Accessio	n number
Fundal Strain		MhrC TE	Europel Strain		MbsC TE
Amembethana rasinga ATCC 22711	ND 004716560 1	WILDO-TE	Meterbizium azioanliaa RDID 52202	HR-PN3	
Arthrinium_phaeospermum_1	AP_024710500.1	AP_024710301.1	Metarhizium_anisopilae_BRIP_33293	XP 01/530017 1	KJK76996.1
Arthrinium_phaeospermum_1	100004.1 当研究室保有のドラ・	フトゲノムより	Metarhizium guizbouense ARSEE 977	KID81569 1	KID81567 1
Aspergillus brasiliensis CBS 101740	OJJ76619.1	OJJ76620.1	Metarhizium robertsii ARSEF 23	XP 007819463.1	XP 007819465.1
Aspergillus calidoustus	CEN60541.1	CEN60545.1	Monilinia fructicola	KAA8565524.1	KAA8565523.1
Aspergillus costaricaensis CBS 115574 1	XP 025534145.1	XP 025534146.1	Monosporascus cannonballus	RY078215.1	RY078214.1
Aspergillus_costaricaensis_CBS_115574_2	XP_025535152.1	XP_025535153.1	Monosporascus_sp5C6A_1	RYP64884.1	RYP64883.1
Aspergillus_ellipticus_CBS_707.79	PYH99747.1	PYH99746.1	Monosporascus_sp5C6A_2	RYP50633.1	RYP50634.1
Aspergillus_eucalypticola_CBS_122712_1	XP_025390958.1	XP_025390957.1	Monosporascus_sp5C6A_3	RYP61239.1	RYP61240.1
Aspergillus_eucalypticola_CBS_122712_2	XP_025381941.1	XP_025381942.1	Monosporascus_spCRB-8-3	RYP85007.1	RYP85006.1
Aspergillus_fischeri_NRRL_181	XP_001265535.1	XP_001265536.1	Monosporascus_spCRB-9-2	RYP79835.1	RYP79836.1
Aspergillus_fumigatus	OXN08103.1	XP_747166.1	Monosporascus_spMC13-8B	RYP15685.1	RYP15686.1
Aspergillus_ibericus_CBS_121593	XP_025578886.1	XP_025578887.1	Monosporascus_spmg162_1	RYP44476.1	RYP44475.1
Aspergillus kawachii NBRC4308_akmlA	GAA85575.1	GAA85576.1	Monosporascus_spmg162_2	RYP43908.1	RYP43909.1
Aspergillus_luchuensis_CBS_106.47	UJZ83511.1	UJZ83512.1	Neofusicoccum_parvum_UCRNP2_1	EOD51041.1	EOD51040.1
Aspergilius_muundensis	XP_020602216.1	XP_020002217.1	Neorusicoccum_parvum_UCRNP2_2	EOD48494.1	EUD48403.1
Aspergillus_niger	AP_004000.1	GA036797 1	Nrmla Neopectria ramularie	KPW39712.1 当研密安保右のドラフト	KPW133937.1
Aspergillus nomius NRRI 13137	XP 015406506 1	XP 0154065121	Ophiocordyceps polyrhachisfurcata BCC 54312	BCI09139 1	BCI09260 1
Aspergillus novofumigatus IBT 16806	XP_024678568_1	XP_024678569.1	Ophiocordyceps sp camponotileonardi	RDA88311 1	RDA88314 1
Aspergillus petrakii	当研究室保有のドラ	フトゲノムより	Paraphaeosphaeria sporulosa 1	XP 018035910.1	XP 018035909.1
Aspergillus piperis CBS 112811 1	XP 025518467.1	XP 025511362.1	Paraphaeosphaeria sporulosa 2	XP 018036931.1	XP 018036929.1
Aspergillus piperis CBS 112811 2	XP 025511363.1	XP 025518466.1	Parastagonospora nodorum SN15	XP_001806097.1	XP 001806095.1
Aspergillus_sclerotiicarbonarius_CBS_121057	PYI04018.1	PYI04017.1	Penicillium_brefeldianum (Bref-PKS)	A0A068ABB7	A0A068ACU9
Aspergillus_steynii_IBT_23096	XP_024703079.1	XP_024703080.1	Penicillium_brasilianum	OOQ81522.1	OOQ81521.1
Aspergillus_tanneri	KAA8642747.1	KAA8642748.1	Penicillium_camemberti	CRL31088.1	CRL31090.1
Aspergillus_terreus_NIH2624	XP_001213896.1	XP_001213897.1	Penicillium_coprophilum	OQE34891.1	OQE34851.1
Aspergillus_thermomutatus	XP_026609795.1	XP_026609793.1	Penicillium_crustosum	QBK15047.1	QBK15046.1
Aspergillus_tubingensis_CBS_134.48	OJI85468.1	OJI85467.1	Penicillium_expansum_1	KGO73653.1	KGO73654.1
Aspergillus_udagawae	GAO86285.1	GAO86284.1	Penicillium_expansum_2	KGO47163.1	KGO47162.1
Aspergillus_ustus	KIA/56/5.1	KIA/56/9.1	Penicillium_flavigenum	OQE30269.1	OQE30524.1
Aspergillus_uvarum_CBS_121591	XP_025493408.1	XP_025493409.1		KUM61888.1	KUM61887.1
Aspergilius_vadensis_CBS_113365	XP_02000073.1 DMD62557.1	XP_02000072.1	Penicilium_griseoruivum Penicilium_itelieum	KXG50414.1	KAG50415.1
Beauveria bassiana ARSEE 2860	YP 008507120 1	YP 008507128 1	Penicillium_nordicum	KOS38742 1	KOS38736 1
Beauveria bassiana D1-5	KGQ03328 1	KG003329 1	Penicillium polonicum	OOD61348 1	OOD61353 1
Beauveria brongniartii RCEF 3172	OAA48828.1	OAA48827.1	Penicillium soppi	当研究室保有のドラフト	、ゲノムより
Bipolaris sorokiniana ND90Pr	XP 007697417.1	XP 007697418.1	Penicillium verrucosum	Whole genome (LAKWC	0000000.2) より
Botryotinia calthae	TEY71578.1	TEY71579.1	Penicillium vulpinum 1	OQE02764.1	OQE02848.1
Botryotinia_narcissicola	TGO56821.1	TGO56822.1	Penicillium_vulpinum_2	OQE02870.1	OQE02883.1
Botrytis_cinerea_B05.10	XP_001557060.1	XP_001557062.2	Penicillium_vulpinum_3	OQE07202.1	OQE07332.1
Botrytis_cinerea_BcDW1	EMR81198.1	EMR81197.1	Periconia_macrospinosa	PVH96643.1	PVH96642.1
Botrytis_cinerea_T4	CCD54538.1	CCD54540.1	Pestalotiopsis_fici_W1061_1	XP_007841828.1	XP_007841827.1
Botrytis_galanthina	THV55249.1	THV55248.1	Pestalotiopsis_fici_W1061_2	XP_007839201.1	XP_007839202.1
Botrytis_paeoniae	TGO19734.1	TGO19735.1	Pestalotiopsis_fici_W1061_3	XP_007834726.1	XP_007834725.1
Botrytis_tulipae	TGO15814.1	TGO15815.1	Phialocephala_scopitormis_1	XP_018067153.1	XP_018067154.1
Cadophora_spDSE1049	PVH//166.1	PVH//16/.1	Phialocephala_scopiformis_2	XP_018073923.1	XP_018073924.1
Cladonia uncialis subsp. uncialis	ANM86471 1	ANM86472 1	Phialocephala_subalpina Phialophora of hyalina BP 5553 1	CZR07900.1 RDI 31023 1	CZR07099.1
Coleophoma crateriformis 1	RDW92310 1	RDW92309 1	Phialophora_cf_hvalina_BP_5553_2	RDI 42230 1	RDI 42231 1
Coleophoma crateriformis 2	RDW69982.1	RDW69983.1	Pseudogymnoascus sp. 24MN13	OBT56738.1	OBT56737.1
Coleophoma cylindrospora	RDW89666.1	RDW89665.1	Pseudogymnoascus sp. VKM F4246	KFY12772.1	KFY12771.1
Colletotrichum incanum	KZL86691.1	KZL86692.1	Pseudogymnoascus sp. VKM F4513 (FW928)	KFY41450.1	KFY41449.1
Colletotrichum_chlorophyti	OLN87132.1	Unregistered	Pseudogymnoascus_spVKM_F4518_(FW2643)	KFY98392.1	KFY41449.1
Colletotrichum_fioriniae_PJ7	EXF85213.1	EXF85212.1	Pseudogymnoascus_verrucosus	XP_018129088.1	XP_018129084.1
Colletotrichum_fructicola_Nara_gc5	ELA25812.1	ELA25811.1	Pyrenophora_teres	EFQ95051.1	EFQ95052.1
Colletotrichum_gloeosporioides_Cg14	EQB57536.1	EQB57535.1	Pyrenophora_teres_fteres_0-1	EFQ95051.1	EFQ95052.1
Colletotrichum_graminicola_M1.001	XP_008099413.1	XP_008099424.1	Pyricularia_grisea_1	XP_030975981.1	XP_030975982.1
Colletotrichum_nymphaeae_SA01	KXH43238.1	KXH43239.1	Pyricularia_grisea_2	XP_030980447.1	XP_030980263.1
Colletotrichum_simmondsii	KXH25872.1	KXH25871.1	Pyricularia_oryzae	QBZ66480.1	QBZ66481.1
Colletotrichum_sublineola	KDN68224.1	KDN68225.1	Pyricularia_pennisetigena	XP_029745102.1	XP_029745100.1
Coniella Justricola	RZL74334.1 PSP80443.1	NZL/4300.1	Pyricularia_spCBS_133396	YP 023628544 1	YP 023628542 1
Cordyceps brongniartii RCFE 3172	OAA38781 1	OAA38784 1	Rosellinia necatrix 1	GAP90164 1	GAP90163 1
Cordyceps confragosa RCEF 1005	OAA82128.1	OAA82127.1	Rosellinia necatrix 2	GAP86891.1	GAP86890.1
Cordyceps fumosorosea ARSEF 2679	XP 018702120.1	XP 018702119.1	Rutstroemia sp. NJR2017a BBW	PQE03615.1	PQE03634.1
Cordyceps_javanica	TQV91949.1	TQV91950.1	Rutstroemia_spNJR2017a_BVV2	PQE04373.1	PQE04380.1
Cordyceps_militaris	ATY62880.1	ATY62879.1	Rutstroemia_spNJR2017a_WRK4_1	PQE19486.1	PQE19475.1
Cordyceps_militaris_CM01	XP_006673218.1	XP_006673217.1	Rutstroemia_spNJR2017a_WRK4_2	PQE16274.1	PQE16268.1
Corynespora_cassiicola_Philippines_1	PSN68407.1	PSN68406.1	Sclerotinia_sclerotiorum_1980_UF70	APA08511.1	APA08510.1
Corynespora_cassiicola_Philippines_2	PSN59528.1	PSN59527.1	Scytalidium_lignicola_1	RFU28992.1	RFU28989.1
Cytospora_leucostoma	ROW15068.1	ROW15062.1	Scytalidium_lignicola_2	RFU25348.1	RFU25357.1

Cytospora_sp.	当研究室保有のドラコ	フトゲノムより	Sodiomyces_alkalinus_F11	XP_028465963.1	XP_028465962.1
Diaporthe_helianthi	POS71845.1	POS71844.1	Stachybotrys_chartarum_IBT_40288	KFA70666.1	KFA70665.1
Diplodia_sapinea	Whole genome (JHU	M00000000.1) より	Stachybotrys_chlorohalonata_IBT_40285	A0A084R1H6.1	A0A084R1K6.1
Eupenicillium_ludwigii	当研究室保有のドラコ	フトゲノムより	Talaromyces_atroroseus	XP_020122036.1	XP_020122037.1
Endocarpon_pusillum_Z07020	XP_007786831.1	XP_007786832.1	Talaromyces_islandicus	CRG85198.1	CRG85199.1
fungal_spNo.14919_1	GAW20131.1	GAW20130.1	Talaromyces_verruculosus	KUL89300.1	KUL89297.1
fungal_spNo.14919_2	GAW16869.1	GAW16868.1	Thermothielavioides_terrestris	SPQ21605.1	SPQ21604.1
fungal_spNo.14919_3	GAW17842.1	GAW17841.1	Thermothielavioides_terrestris_NRRL_8126	XP_003649242.1	XP_003649243.1
fungal_spNo.14919_4	GAW20242.1	GAW20240.1	Tolypocladium_capitatum	PNY20705.1	PNY20707.1
Helicocarpus_griseus_UAMH5409	PGH10572.1	PGH10573.1	Trichoderma_arundinaceum_1	RFU78094.1	RFU78093.1
Hirsutella_minnesotensis_3608	KJZ72361.1	KJZ72360.1	Trichoderma_arundinaceum_2	RFU76423.1	RFU76424.1
Hypoxylon_fragiforme	当研究室保有のドラコ	フトゲノムより	Trichoderma_citrinoviride	XP_024750077.1	XP_024750078.1
Hypoxylon_spCI-4A_1	OTB04503.1	OTB04504.1	Trichoderma_virens_Gv29-8	XP_013956065.1	XP_013956064.1
Hypoxylon_spCI-4A_2	OTB08290.1	OTB08289.1	Umbilicaria_pustulata	SLM39834.1	SLM39833.1
Hypoxylon_spCO27-5	OTA81918.1	OTA81919.1	Valsa_mali_1	KUI66526.1	KUI66527.1
Hypoxylon_spEC38	OTA66644.1	OTA66643.1	Valsa_mali_2	KUI67059.1	KUI67058.1
Lachnellula_arida_1	TVY20328.1	TVY20327.1	Valsa_mali_3	KUI64629.1	KUI64496.1
Lachnellula_arida_2	TVY19100.1	TVY19101.1	Valsa_mali_varpyri	KUI60989.1	KUI60978.1
Lachnellula_cervina_1	TVY57352.1	TVY57355.1	Valsa_malicola_1	ROV92586.1	ROV92589.1
Lachnellula_cervina_2	TVY51056.1	TVY51055.1	Valsa_malicola_2	ROW10618.1	ROW10619.1
Lachnellula_hyalina	XP_031005729.1	XP_031005728.1	Valsa_sordida	ROV87039.1	ROV87041.1
Lachnellula_occidentalis_1	TVY39994.1	TVY39995.1	Xylaria_flabelliformis	TRX89754.1	TRX89755.1
Lachnellula_occidentalis_2	TVY49132.1	TVY49131.1	Xylaria_grammica_1	RWA11448.1	RWA11436.1
Lachnellula_suecica	TVY83046.1	TVY83047.1	Xylaria_grammica_2	RWA06745.1	RWA06758.1
Lasiodiplodia_theobromae	KAB2572374.1	KAB2572402.1	Xylaria_grammica_3	RWA05039.1	RWA05040.1
Lepidopterella_palustris_CBS_459.81	OCK76486.1	OCK76487.1	Xylaria_grammica_4	RWA09891.1	RWA09890.1
Macrophomina_phaseolina_MS6_1	EKG12982.1	EKG12980.1	Xylaria_grammica_5	RWA14052.1	RWA14053.1
Macrophomina_phaseolina_MS6_2	EKG16355.1	EKG16353.1	Xylaria_hypoxylon	TGJ83512.1	TGJ83509.1
Madurella_mycetomatis_1	KXX83260.1	KXX83261.1	Xylaria_longipes_1	RYC54291.1	RYC54292.1
Madurella_mycetomatis_2	KXX76491.1	KXX76490.1	Xylaria_longipes_1	RYC59888.1	RYC59885.1
Meliniomyces_bicolor_E	XP_024731472.1	XP_024731474.1	Zymoseptoria_tritici_IPO323	XP_003850944.1	XP_003850940.1

# 第4章

GPI-EPT ドメインを有する酵素がコードされる遺伝子クラスターを 標的とした新規糸状菌マクロライド天然物の探索

### 4-1. 緒言

前章で作成した系統樹の type B の生合成遺伝子クラスターには,酸化酵素の P450 に加え, glycosylphosphatidylinositol-ethanolamine phosphate transferase (GPI-EPT) ドメインを有する機能未知のタンパク質が共通して保存されていた.これまでにそのような酵素が二次代謝物生産に関わるという報告はなかった.

GPI-EPT ドメインは、ヒトタンパク質の PIGN<sup>84</sup> やマウスタンパク質の Pig-n<sup>85</sup>, 酵母 タンパク質の Mcd4<sup>86</sup> に保存されている. それら酵素は、GPI によって細胞膜外葉にア ンカーされるタンパク質 (GPI アンカー型タンパク質) の GPI アンカーの生合成の一過 程に関わっており、GPI アンカー中のマンノース残基の 2 位に対して、ホスファチジル エタノールアミン (PE) からホスホエタノールアミンの転移反応を行うことが報告さ れている (Figure 28)<sup>85,86</sup>. このことから、GPI-EPT ドメインをもつ機能未知のタンパク 質は、HR-PKS と MhpC-TE により構築されるマクロライド骨格に対してホスホエタノ ールアミンを付加する酵素であることが類推された.



Figure 28. (A) GPI アンカータンパク質の基本構造, (B) GPI-EPT の酵素反応.

また, type B に含まれる遺伝子クラスター内の GPI-EPT 様酵素のアライメント解析 および系統樹解析により, それらが互いに相同性を示すことがわかった (Figure 29). ホ スホエタノールアミンを側鎖にもつ JBIR-19, 20<sup>87</sup>の生産菌 *Metarhizium* sp. fE61 と同じ 属の *Metarhizium* 属菌のゲノム上にも相同タンパク質がコードされていたことから, GPI-EPT 様酵素がホスホエタノールアミン転移活性を有することが予想された (Figure 29). なお, それら化合物の生合成研究は報告がなく, ホスホエタノールアミンの付加に 関する遺伝子は明らかとなっていなかった.

本章では type B に含まれる akml および ciml クラスターの麹菌異種発現系の構築に取り組み, GPI-EPT 様酵素による修飾を受けた新規マクロライド天然物の取得を目指した.



Figure 29. GPI-EPT ドメインを含むタンパク質の系統樹解析.

以降の麹菌異種発現系を用いた糸状菌マクロライドの探索において,遺伝子を導入した形質転換株で導入遺伝子由来と思われる化合物の生産が確認された場合は,以下のスキームに則って目的の化合物の単離構造決定を行った.まず,形質転換株を CPS 培地で大量培養後,その培養培地あるいは培養菌体成分の抽出を行った.次に,各種クロマ

トグラフィーを用いて抽出成分の分画を行い,目的の化合物を単離精製した.その化学 構造は,高分解能 ESIMS や<sup>1</sup>H,<sup>13</sup>C NMR スペクトルおよび各種 2 次元 NMR スペクト ルを解析することで決定した.構造決定の詳細は章末にまとめて記載した.

#### 4-2. akml および ciml クラスターの解析

*akml* クラスターは *Aspergillus kawachii, ciml* クラスターは *Colletotrichum incanum* の ゲノム上に見出され, HR-PKS (AkmlA/CimlA) と MhpC-TE (AkmlB/CimlB), 機能未知の 酵素 AkmlC/CimlC および P450 (AkmlD/CimlD) がコードされていた (Figure 30, Table 5, 6). AkmlA/CimlA は KS, AT, DH, ER, KR, ACP ドメインをもつ iterative Type I PKS, AkmlB/CimlB は mhpC ドメインが保存される $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質であ り, 前章の結果からこれら 2 つの酵素によりマクロライド骨格が構築されると推測され た (Figure 31, 32). AkmlD/CimlD は P450 の一般的な機能から, マクロライド骨格に対 する水酸化等の酸化反応を行うことが推測された. GPI-EPT ドメインを有する AkmlC/CimlC は先述の解析により, ホスホエタノールアミンもしくはその類縁体の付 加を触媒すると予想された.



Figure 30. akml および ciml クラスターの遺伝子構成.

AkmlA							
Query seq.	active site A	750		1250 1500 NAD(P) bind	1750 200 ling site actin NOD(D) binding citi	0 2250 ve site	2397
Specific hits	PKS PKS ketoacy1-synt	PksD			PKS_ER enoyl_red @or POH_zinc	KR PKS_KR FabG	
Non-specific hits	decarbox_cond_enzymes oneya_3_PPaR elong_cond_enzymes KAS_I_II SCP-x Keto KReynt_ FabB PT200050 PRK09185	PKS_AT Rcyl_transf_1 FabD FabD Palonate_mdCH PLN02752	PS-DH PKS_DH	KP	QOR1 p53_inducible_oxidor MDR3 MDR2 quinone_pig3 polyketide_synthase MDR_like_2 Zn_ADH_like1	KR_2_FAS_S KR_FAS_SDR KR_1_FAS_SD KR_2_SDR_x KR_3_FAS KR_1_SDR_x BKR_SD	

## AkmlB



Figure 31. AkmlA-D のドメイン構造

## Table 5. akml cluster (Aspergillus kawachii NBRC4308).

Gene	Size (bp)	Protein homologue (accession number)	Identity (%)/ similarity (%)	Predicted function
akmlA	7,384	Highly reducing polyketide synthase Bref-PKS [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ABB7)	44/62	HR-PKS
akmlB	1,000	Thiohydrolase Bref-TH [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ACU9)	42/61	Thioesterase
akmlC	3,120	GPI ethanolamine phosphate transferase 2 [Aspergillus oryzae RIB40] (Q2U9J2.2)	33/49	EPT
akmlD	1,624	Benzoate 4-monooxygenase cytochrome P450 [ <i>Neosartorya fischeri</i> ] (A1D5E8)	93/96	P450

## CimIA

Queru sea	1 250 500	750	1000 1250	1500 1750 2000	2250 2420						
4001 9 004.	active site 🛕 🛛 🛕 🛕			NAD(P) binding site							
				NAD(P) binding site	e site						
Specific hits	7 Pk	sD		PKS_ER	KR N PK						
	PKS		PS-DH	enoyl_red	PKS_KR						
	PKS_KS		PKS_DH	Qor	FabG						
	ketoacy1-synt			ADH_zinc							
Non-specific	decarbox_cond_enzymes	PKS_AT		QOR1	KR_2_FAS_						
hits	omega_3_	PfaA		p53_inducible_oxidor	KR_FAS_SDR_						
	Keto KAsynt	_C Acy1_transf_1		MDR3	KR_1_FAS_S						
	KAS_I_II	FabD		polyketide_synthase	KR_2_SDR_x						
	elong_cond_enzymes	fabD		quinone_pig3	KR_3_FA						
	FabB	malonate_mdcH		MDR_like_2	KR_1_SDR_						
	PT200050	PLN02752		Zn_ADH_like1	AcAcCoA						
	PRK07103	pfaB_fam		MDR2	omega_						

# CimlB

Пиери сел	1			50 		1	<b>0</b> 0		150		2	°° ,		25	0	 _	310
Specific hits									MhpC								
Non-specific				-					Hyd	rolase_4							
niros						hydr:	1_PEP										
Superfamilies				A	bhydro	olase	super	family	J								
							Abh	nydrola	ase_1	superf	amily						
CimlC				_													
_	<u> </u>		12			250		3/8		500		62	°		i	 	900
Query seq. Putative	active :	site 🔺			-												
metal b	inding a	site 👗	A			-											
putative substrate b	inding s	;ite 📐			A	A											
Specific bits				GP	I EPT 2												

spectric nics	
Non-specific	Npp1
hits	Sulfatase
Superfamilies	ALP_like superfamily
	Phosphodiest superfamily
	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

# CimID

1	 		75					150				225		1			3	00			37	5				450	 	, <sup>5</sup>	96
Query seq.																													1
Specific hits														C	ypΣ	×												1	
Non-specific													ĸ	45	0														
nits																				Ь.	ΓZ	204	104	4					
Superfamilies	p450 superfamily																												

Figure 32. CimlA-D のドメイン構造.

# Table 6. ciml cluster (Colletotrichum incanum).

Gene	Size (bp)	Protein homologue (accession number)	Identity (%)/ similarity (%)	Putative function
cimlA	7,433	Highly reducing polyketide synthase Bref-PKS [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ABB7)	46/63	HR-PKS
cimlB	1,028	Thiohydrolase Bref-TH [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ACU9)	40/60	Thioesterase
cimIC	3,349	GPI ethanolamine phosphate transferase 2 [ <i>Aspergillus oryzae</i> RIB40] (Q2U9J2.2)	37/53	EPT
cimID	1,668	Cytochrome P450 family protein [ <i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 549] (A0A0B4FG42)	64/81	P450

akml および ciml クラスター由来の新規マクロライド天然物を取得するために, 順次 形質転換株を作製し,二次代謝プロファイルの分析を行った (Figure 33).



Figure 33. akml (ciml) クラスターの遺伝子導入による形質転換体の作製.

#### 4-3. akml クラスターの再構築と新規 24 員環マクロライドの取得

まず,HR-PKS と隣接する MhpC-TE により得られるマクロライド天然物を取得する ために,*akmlA と akmlB* を導入した麹菌株 AO-*akmlAB* を作製した.液体培養後,菌体 MeOH 抽出物を HPLC 分析したところ,ネガティブコントロールには見られない化合 物ピーク 17 が確認された (Figure 34A).構造解析の結果,Akml-1 (17) は 24 員環構造 を有するマクロライドであることがわかった (4-7-1 参照).この結果より,*akml* クラス ターの HR-PKS と MhpC-TE を含む遺伝子クラスターがマクロライド生合成遺伝子クラ スターであることが明らかとなった.

次に,周辺に保存される修飾酵素により変換されたマクロライドの創出に取り組んだ. まず,AO-akmlAB に対して P450 遺伝子の akmlD を導入した AO-akmlABD を作製し,同 様に分析したところ,17 のピークが消失し,新たな化合物ピーク 18 が検出された (Figure 34A).構造決定により,Akml-2(18)は17の6,7位がエポキシ化され,8位が水 酸化されたマクロライドであることを明らかとした(4-7-1,4-7-2 参照).これにより, AkmlD が水酸化とオレフィンのエポキシ化を行う酸化酵素であると同定した(Figure 34A). 続いて, GPI-EPT ドメインを有する AkmlC により修飾されたマクロライドの取得に 取り組んだ. AO-akmlAB に対して akmlC を導入した AO-akmlABC を作製し, 同じよう に分析したところ 17 のピークが減弱し, 新たな化合物ピーク 19 が検出された (Figure 34A). 構造決定の結果, Akml-3 (19) は 17 の 5 位にホスホエタノールアミンが付加した 構造を有することがわかった (Figure 34A, 4-7-1 参照). この結果より, AkmlC をマクロ ライド骨格の水酸基に対するホスホエタノールアミン転移酵素と同定した.

最後に, AkmlC および AkmlD 両方の修飾を受けた化合物を取得するために, AOakmlAB に対して akmlC と akmlD を組み込んだベクターを導入し AO-akmlABCD を作製 した. 同様に菌体成分を分析した結果, 19 と新たな化合物ピーク 20 の生産を確認した (Figure 34A). 構造解析により Akml-4 (20) は 17 の 5 位にホスホエタノールアミン, 6, 7 位にエポキシド, 8 位に水酸基が導入された化合物と決定した (Figure 34A, 4-7-1 参 照).



Figure 34. (A) AO-*akmAB*, *akmABD*, *akmlABC*, *akmlABCD* および (B) AO-*cimlAB*, *cimlABD*, *cimlABC*, *cimlABCD* を培養したときの菌体成分の HPLC クロマトグラム (検出波長 210 nm) と化合物 17-20, 21-24 の化学構造. コントロールとして空ベクターを導入した麹 菌株を用いた.

### 4-4. ciml クラスターの再構築による新規 22 員環マクロライドの取得

*ciml*クラスター由来の新規マクロライド天然物を取得するために、同様に、順次形質 転換を作製した (Figure 33). その結果,新規 22 員環マクロライド Ciml-1-4 (21-24) の 取得に成功した (Figure 34B, 4-8 参照). これにより、CimlA と CimlB でラクトン環骨格 が形成されること、CimlC がホスホコリン転移活性を有すること、および、CimlD が AkmlD と同様に水酸化とエポキシ化を触媒することが判明した.

#### 4-5. GPI-EPT 様酵素遺伝子の交換による類縁マクロライド化合物の創生

次に,新規マクロライド類縁体の創生を目指し, akml クラスターと ciml クラスター 間で GPI-EPT 様酵素を交換した麹菌異種発現系を構築した (Figure 35). すなわち,ホ スホエタノールアミンを有する 22 員環マクロライド,および,ホスホコリンを側鎖に もつ 24 員環マクロライドの取得に取り組んだ.



Figure 35. GPI-EPT 様酵素の交換による新規マクロライド類縁体の創出.

まず,22員環マクロライド22を生産する AO-cimlAB に akmlC と cimlD を同時に導入し,AO-cimlABD+akmlCを作製し,同様に解析した結果,ホスホエタノールアミンを 側鎖に有する22員環マクロライド Ciakml-1 (25)の生産を確認した (Figure 36,4-9参照). この結果より,本来 akml クラスターにコードされるホスホエタノールアミン転移酵素 は, ciml クラスター由来のマクロライド骨格を認識し,機能することが明らかとなった. 一方で、24員環マクロライド18を生産する AO-akmlABD に対して cimlC を導入した
 AO-akmlABD+cimlC では、得られた形質転換株 10株すべてにおいて二次代謝プロファイルに変化は認められなかった (Figure 37).



Figure 36. AO-*cimlABD*+*akmlC*を培養したときの菌体成分の HPLC クロマトグラム (検 出波長 210 nm) と 21, 22 および 25 の化学構造. コントロールとして空ベクターを導入 した麹菌株と AO-*cimlABD* を用いた.



Figure 37. AO-akmlABD+cimlC を培養したときの菌体成分の HPLC クロマトグラム (検 出波長 210 nm) と 18 と予想産物の化学構造. コントロールとして空ベクターを導入し た麹菌株と AO-akmlABD を用いた.

### 4-6. 考察

4-3 と 4-4 の結果から, GPI-EPT と P450 を修飾遺伝子として持つ akml および ciml ク ラスター中の HR-PKS と MhpC-TE は, apml クラスターと同様にマクロライド骨格を生 成することが明らかとなった. これにより, apml クラスター以外のマクロライド生合 成遺伝子クラスターが初めて同定された. また, GPI-EPT ドメインを有する akmlC お よび cimlC の麹菌異種発現により, マクロライド骨格上の水酸基に対するホスホエタノ ールアミン/ホスホコリン転移酵素であることが明らかとなった. 糸状菌マクロライド 化合物にそれら側鎖を転移する酵素は初めての報告例となる.

GPI-EPT は GPI-アンカー生合成過程においてマンノース残基の水酸基に対してホス ホエタノールアミンを転移するが、その基質としてホスファチジルエタノールアミン (PE) を利用することが知られている<sup>86</sup>. AkmlC は同様のドメインをもち、ホスホエタ ノールアミンを付加することから、同様に PE を基質として用いることが推測される. 一方、GPI-EPT ドメインを有する機能同定されたタンパク質でホスホコリンを転移する 酵素は報告されていない. CimlC はホスホコリンを付加するという実験結果と、PE と ホスファチジルコリン (PC) の構造が非常に類似していることから、CimlC は PC を基 質として取り込み、マクロライド骨格にそのホスホコリンを転移していることが類推さ れた (Figure 38A). PE や PC は動植物や真菌、細菌など幅広い生物の生体膜を構成する 主要なリン脂質である. 今回得られた 19, 20 は PE と、23, 24 は PC と共通の部分構造 を有しており、また、脂溶性の高い炭素骨格をもつといった類似した構造を示すことか ら、生体膜への作用により、なんらかの生物活性を示すことが期待される (Figure 38). ホスファチジルコリンを側鎖に有する eushearilide は、分子標的は明らかになっていな いものの、ラット肝細胞のミトコンドリア内膜における電子伝達系を阻害することが明 らかとされており、ヒト病原菌 *A. fumigatus や Candida* sp. などに対して示す抗真菌活 性も同様の作用機序に由来することが示唆されている (Figure 38B)<sup>88</sup>.

(A)



Figure 38. (A) ホスホエタノールアミンとホスホコリンおよび, (B) ホスホエタノールア ミンまたはホスホコリンを側鎖に有する糸状菌マクロライド.

一方で,24員環骨格を有する18の生産株に対して CimlC を導入した形質転換株では、現時点ではホスホコリンの導入された化合物の検出に至っていない. *cimlC* がゲノム上に組み込まれているか、麹菌内で発現しているか等、慎重な検討が必要とされる.

GPI-EPT を有する type B (Figure 24) に属するクラスター内の GPI-EPT 様酵素のアミ ノ酸配列を用いた系統樹解析により, AkmlC と系統的に非常に近いタンパク質が数種 の Aspergillus 属菌ゲノム上に見出され, それらはホスホエタノールアミン転移活性を 有すると考えられた (Figure 39). 一方で,ホスホコリン転移酵素 CimlC は独立して位 置しており,系統樹解析結果からは同じ機能を持つ酵素を推測することができなかった. 前述の通り, JBIR-19 は Metarhizium sp. fE61 より単離されていたことから Metarhizium 属菌由来のホモログは,ホスホエタノールアミン転移酵素であると予想される.また, Eupenicillium shearii よりホスホコリンを側鎖に有する 24 員環マクロライド eushearilide の単離が報告されていたため,類似したクラスターをゲノム上にコードさていることが 予想されたため,株の異なる E. shearii を入手しドラフトゲノムシーケンスを行なった が、目的のクラスターはコードされていなかった.

今回ゲノムマイニングで見出した type C のクラスターの中には,生産される化合物 が予想できないクラスターが多数存在する.これらを標的に麹菌異種発現系を活用した 天然物探索を行うことで,環骨格が異なり,ホスホエタノールアミンやホスホコリン, あるいはその類縁体を側鎖に有する多様なマクロライド類縁体の取得が期待される.

52



Figure 39. GPI-EPT ドメインを有するタンパク質の系統樹解析.

# 4-7. *akml* クラスター由来マクロライドの構造決定 4-7-1. Akml-1-4 (**17-20**)の平面構造の決定



Figure 40. 化合物 **17-20**, **26** の 2D NMR 相関. 青線は <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 赤線は構造決定に 重要な HMBC 相関を示した.

Akml-1 (17) は高分解能 ESIMS (*m*/z 415.2819 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 415.2824) および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub> と決定した. <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY, HSQC スペク トル解析により,末端メチル H-24 ( $\delta_{\rm H}$  1.23) から,オキシメチレン水素 H-23 ( $\delta_{\rm H}$  4.96), メチレン水素 H-22 ( $\delta_{\rm H}$  1.47, 1.62), H-21 ( $\delta_{\rm H}$  1.38), H-20 ( $\delta_{\rm H}$  1.96, 2,04), エチレン水素 H-19 ( $\delta_{\rm H}$  5.35) と連続するスピンカップリングと,エチレン水素 H-20 ( $\delta_{\rm H}$  5.35) とメチレ ン水素 H-19 ( $\delta_{\rm H}$  2.00) 間のスピンカップリングならびに対応する HMBC 相関が観測さ れたことにより, C-17-C24 の部分構造を明らかとした.また同様に,エチレン水素 H-2 ( $\delta_{\rm H}$  5.85) からエチレン水素 H-3 ( $\delta_{\rm H}$  6.88),メチレン水素 H-4 ( $\delta_{\rm H}$  2.49),オキシメチレン 水素 H-5 ( $\delta_{\rm H}$  4.28),エチレン水素 H-6 ( $\delta_{\rm H}$  5.55),H-7 ( $\delta_{\rm H}$  5.67),メチレン水素 H-8 ( $\delta_{\rm H}$  2.24), オキシメチレン水素 H-9 ( $\delta_{\rm H}$  3.66),メチレン水素 H-10 ( $\delta_{\rm H}$  1.40, 1.47), H-11 ( $\delta_{\rm H}$  1.31) と 連続するスピンカップリングおよび H-2,3からエステルカルボニル C-1 ( $\delta_{\rm H}$  165.9) への HMBC 相関が観測されたことから、C-1-C11 の部分構造が明らかとなり、 $\alpha, \beta$ -不飽和カ ルボニル基と、5、9 位の水酸基をもつことが分かった.また、HMBC の H-23 からカル ボニル炭素 C-1 への相関から、C-1 と C-23 がエステルを介して結合していることを確 認した.残る 5 つの sp3 炭素は C-12 から C-16 間のメチレンの炭素と帰属した. $\Delta_{2,3}$  と  $\Delta_{7,8}$ の幾何異性に関しては、 $J_{2,3}$  と $J_{7,8}$ のカップリング定数がそれぞれ 15.8 Hz および 15.4 Hz を示したことより E 体と決定した.なお、後述の Akml-4 の構造決定における NOESY 相関の結果も  $\Delta_{2,3}$  が E 体であることを裏付けている.以上の結果から、17 は新規 24 員 環マクロライドであると決定した (Figure 40).

Akml-2 (18) は高分解能 ESIMS (m/z 447.2726 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 447.2717) および<sup>13</sup>C NMR スペクトルより, 18 の化学式を C<sub>24</sub>H<sub>40</sub>O<sub>6</sub> と決定し,不飽和度 5 であることがわかった. また, 17 に対して, 2 つの酸素原子が導入されていることが明らかとなった. 化合物 17 との<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>C NMR スペクトルの比較と,<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC, および HSQC-TOCSY の相関より C-1–C-11, C-17–C-24 の部分構造を明らかとした. 先と同様 の $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル基と 2 つの水酸基に加え,エポキシドと 8 位の水酸基を有する ことが示された. エポキシドの位置は, C-6 および C-7 の特徴的な化学シフト (C-6: & 57.8; C-7: & 58.0) により決定した. また, HMBC の H-23 からカルボニル炭素 C-1 への 相関から, C-1-C-23 間のエステル結合により環を形成していることを確認した. 残る 5 つの sp3 炭素は C-12 から C-16 間のメチレンの炭素と帰属した.  $\Delta_{2,3}$ の構造は,  $J_{2,3}$ との カップリング定数がそれぞれ 15.6 Hz を示したことより E 体と決定した. 以上の結果か ら, 18 は 17 の 6, 7 位のオレフィンにエポキシドに変換され, 8 位に水酸基が導入され た 24 員環マクロライドであると決定した (Figure 40).

Akml-3 (19) は高分解能 ESIMS (*m/z* 514.2948 [M-H]<sup>-</sup>, calcd 514.2928) および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>7</sub>P と決定した. 化合物 17 との <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR ス ペクトルの比較と, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC, および HSQC-TOCSY の相関より 24 員環構造が 17 と一致していることを明らかとした. Δ<sub>2,3</sub> と Δ<sub>7,8</sub> の構造は, *J*<sub>2,3</sub> と *J*<sub>7,8</sub> の カップリング定数がそれぞれ 15.7 Hz および 15.5 Hz を示したことより E体と決定した.

55

HMBC の H-23 からカルボニル炭素 C-1 への相関から, C-1 と C-23 がエステルを介して 結合していることを確認した.また,オキシメチレン水素の H-1' ( $\delta_{H}$  4.00) とアミノメ チレン水素の H-2' ( $\delta_{H}$  3.12) とのスピンカップリングが観測され, H-2'から C-1'への HMBC 相関が見られたことより,エタノールアミン基の存在が示された.化合物 17 と の分子量の比較と変換に関わる修飾酵素の機能の予測から,5 位あるは9 位の水酸基に ホスホエタノールアミンが付加されていることが示唆された.オキシメチン炭素の C-5 ( $\delta_{c}$  76.6)とオキシメチレン炭素の C-1' ( $\delta_{c}$  62.8) がダブレット ( $^{2}J_{c-5,p}$ =6.5 Hz,  $^{2}J_{c}$ .  $_{\Gamma,p}$ =4.8 Hz) として観測され,それらに隣接する炭素のカーボンシグナルがダブレット (C-4:  $\delta_{c}$  40.2,  $^{3}J_{c-4,p}$ =4.7 Hz; C-6:  $\delta_{c}$  133.0,  $^{3}J_{c-6,p}$ =4.8 Hz; C-2':  $\delta_{c}$  41.8,  $^{3}J_{c-2',p}$ =6.3 Hz) として 見られたことより, C-5 および C-1'がリン酸エステルにより結合していることが示され た.なお,後述の 20 のアセチル化前後のオキシメチレン水素の化学シフトの比較によ り,ホスホエタノールアミンが 5 位に付加することを裏付けている.以上の結果から, 19は17の5位にホスホエタノールアミンが付加した構造であると決定した (Figure 40).

Akml-4 (20) は高分解能 ESIMS (m/z 546.2844 [M-H]<sup>-</sup>, calcd 546.2832) および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>26</sub>H<sub>46</sub>NO<sub>9</sub>P と決定した. 化合物 18 および 19 との <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルの比較と, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC, および HSQC-TOCSY の 相関より 18 と共通の骨格構造をもつことが明らかとなった.  $\Delta_{2,3}$ の構造は,  $J_{2,3}$ のカッ プリング定数がそれぞれ 15.7 Hz を示したことより *E* 体と決定した. HMBC の H-23 か らカルボニル炭素 C-1 への相関から, C-1 と C-23 がエステル結合により繋がっている ことを確認した. また, オキシメチレン水素の H-1' ( $\delta_{H}$  4.11) とアミノメチレン水素の H-2' ( $\delta_{H}$  3.19) との COSY 相関および H-2'から C-1'への HMBC 相関より, エタノール アミン基の存在が示された. オキシメチン炭素の C-5 ( $\delta_{C}$  75.8)とオキシメチレン炭素の C-1' ( $\delta_{C}$  61.4) がダブレット ( $^{2}J_{C-1,P}$ =5.3 Hz) として観測され, それらに隣 接する炭素のカーボンシグナルがダブレット (C-4:  $\delta_{C}$  35.8, br d; C-6:  $\delta_{C}$  57.8,  $^{3}J_{C-2,P}$ =6.2 Hz) として見られたことより, C-5 および C-1'がリン 酸エステルにより結合していることが示された.

56

また,リン酸エステルの位置に関する確証を得るために,Scheme 1 に従い 20 をアセ チル化体 26 へと変換し,オキシメチレン水素の化学シフトを比較した.その結果,H-8,H-9 のピークに顕著な低磁場シフトが見られたことから,8 位と9 位の水酸基がアセ チル化されたことが明らかとなり,ホスホエタノールアミンが5 位に付加していること が裏付けられた (Figure 40, Table S2).以上の結果から,20 は 19 の 5 位にホスホエタ ノールアミンが付加した構造であると決定した (Figure 39).



Scheme 1. 化合物 20 のアセチル化.

#### 3-7-2. Akml-2 (18) の 1,2-ジオールの相対配置の決定

得られたマクロライド化合物 18 の 1,2-ジオールの相対配置を明らかにするために, 18 をアセトナイド保護体へと変換した (Scheme 1). まず, 18 を MeOH 溶媒中, 10% Pd/C により接触還元を行うことで 27 を得た. 次に, 27 を *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (TsOH•H<sub>2</sub>O) 存在化で 2,2-dimethoxypropane と反応させることで, 1,2-ジオ ールのアセトナイド保護体 28 を得た. 化合物 28 の NOESY スペクトルにおいて, アセ トナイドのメチル基の水素 H-2', H-3'とオキシメチレン水素の H-8, H-9 との間にそれ ぞれ相関が見られたことから, それらジオールの相対配置を 8*R*\*,9*S*\*と決定した. 生合 成的な観点から, 20 のジオールの相対配置も 8*R*\*,9*S*\*と推定した.

#### 4-7-3. Akml-2 (18) の5位の絶対配置の決定

得られたマクロライド化合物の 5 位の絶対配置を明らかにするために 18 をカルバネ ート保護体へと変換した (Figure 41A). 上述の通り 18 を 27 へと変換した後に, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶媒中 iPr<sub>2</sub>NEt 存在下で triphosgene と反応させることで, 1,2-ジオールのカルバネート 保護体 29 を得た. 次に, 5 位の水酸基を *S*-あるいは *R*-MTPA 保護した 30a あるいは 30b と変換した後に新モッシャー法を適用することで 5 位の絶対配置を *S* と決定した<sup>69</sup>. 生 合成的な観点から, 17, 19, 20 の 5 位の水酸基の絶対配置も *S* と推定した.



Figure 41. (A) 化合物 18 の接触還元およびアセトナイド保護のスキーム. (B) 化合物 27 のカルバメート保護および MTPA 保護のスキーム. (C) 化合物 28 のアセトナイドの NOESY 相関 (ピンク矢印). (D) MTPA 保護体 30 のΔδ<sub>H(S-R)</sub> values (parts per million).

		Akml-1 (17) <sup>b</sup>		Akml-2 (18) <sup>c</sup>		Akml-3 (19) <sup>c</sup>		Akml-4 ( <b>20</b> ) <sup>c</sup>			
Position	<sup>13</sup> C	$^{1}$ H (multi, J in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, $J$ in Hz)			
1	165.9		167.6		167.5		166.1				
2	124.5	5.85 (1H, dt, 15.8, 1.3)	125.2	5.93 (1H, d, 15.6)	125.4	5.87 (1H, d, 15.7)	124.5	5.99 (1H, d, 15.7)			
3	143.6	6.88 (1H, dt, 15.8, 7.5)	145.6	7.02 (1H, dt, 15.6, 7.4)	145.3	6.90 (1H, d, 15.7, 7.4)	143.1	7.05 (1H, dd, 15.7, 7.5)			
4	39.7	2.49 (2H, m)	38.1	2.52 (1H, m)	40.2	2.63 (1H, m)	35.8	2.75 (1H, m)			
								2.71 (1H, m)			
5	71.6	4.28 (1H, m)	71.8	3.51 (1H, m)	76.6	4.70 (1H, m)	75.7	3.97 (1H, m)			
6	134.5	5.55 (1H, dd, 15.4, 7.0)	60.7	2.93 (1H, m)	133.0	5.51 (1H, dd, 15.5, 7.3)	57.8	3.09 (1H, dd, 7.4, 2.3)			
7	128.7	5.67 (1H, dt, 15.4, 7.1)	58.7	2.92 (1H, m)	130.8	5.71 (1H, dt, 15.5, 7.4)	58.0	3.03 (1H, dd, 6.5, 2.3)			
8	39.8	2.24 (1H, m)	76.9	3.09 (1H, t, 6.8)	41.0	2.21 (2H, m)	74.4	3.16 (1H, m)			
9	70.9	3.66 (1H, dt, 11.7, 6.0)	74.0	3.51 (1H, m)	71.7	3.59 (1H, m)	72.4	3.53 (1H, m)			
10	35.8	1.40 (1H, m)	33.6	1.38 (1H, m)	67.7	1.38 (1H, m)	32.4	1.55 (1H, m)			
		1.47 (1H, m)		1.55 (1H, m)		1.47 (1H, m)		1.45 (1H, m)			
11	24.7	1.31 (2H, m)	26.5	1.54 (2H, m)	25.8	1.31 (2H, m)	25.2	1.40 (2H, m)			
12	$27.7^{d}$		$29.2^{e}$		$28.8^{h}$		27.4 <sup>j</sup>				
13	$28.5^{d}$		$30.0^{e}$		$29.6^{h}$		$28.2^{j}$				
14	$28.5^{d}$	1.27-1.34 (10H)	$30.2^{e}$	1.27-1.34 (10H)	$29.7^{h}$	1.30-1.42 (10H)	28.4 <sup>j</sup>	1.27-1.37 (10H)			
15	$28.8^{d}$		30.4 <sup>e</sup>		30.1 <sup>h</sup>		$28.7^{j}$				
16	$28.8^{d}$		30.4 <sup>e</sup>		$30.2^{h}$		$28.8^{i}$				
17	31.8	2.00 (2H, m)	33.1 <sup>f</sup>	2.00 (2H, m)	$32.8^{i}$	2.00 (2H, m)	$31.7^{k}$	2.00 (2H, m)			
18	130.8	5.35 (1H, m)	131.8 <sup>g</sup>	5.36 (1H, m)	132.0	5.35 (1H, m)	130.6 <sup>1</sup>	5.35 (1H, m)			
19	130.1	5.35 (1H, m)	131.4 <sup>g</sup>	5.36 (1H, m)	131.4	5.35 (1H, m)	$130.1^{l}$	5.35 (1H, m)			
20	32.3	1.96 (1H, m)	33.0 <sup>f</sup>	2.00 (2H, m)	$33.2^{i}$	2.00 (2H, m)	$31.4^{k}$	2.00 (2H, m)			
		2.04 (1H, m)									
21	25.3	1.38 (2H, m)	26.4	1.40 (2H, m)	26.4	1.39 (2H, m)	25.0	1.39 (2H, m)			
22	35.2	1.47 (1H, m)	36.2	1.53 (1H, m)	36.2	1.47 (1H, m)	34.8	1.64 (1H, m)			
		1.62 (1H, m)		1.65 (1H, m)		1.63 (1H, m)		1.50 (1H, m)			
23	71.1	4.96 (1H, m)	72.4	4.94 (1H, m)	72.3	4.92 (1H, m)	71.1	4.92 (1H, m)			
24	20.1	1.23 (3H, d, 6.3)	20.3	1.23 (3H, d, 6.3)	20.3	1.21 (3H, d, 6.3)	18.9	1.22 (3H, d, 6.3)			
1′					62.8	4.00 (2H, m)	61.4	4.08 (2H, m)			
2′					41.8	3.12 (2H, m)	40.3	3.16 (2H, m)			

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC (and HSQC-TOCSY) experiments.

[b] Recorded in CDCl<sub>3</sub>. [c] Recorded in CD<sub>3</sub>OD. [d-k] Interchangeable.

4-8. ciml クラスター由来マクロライドの構造決定



Figure 42. 化合物 21-24 の 2D NMR 相関. 青線は <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 赤線は構造決定に重要な HMBC 相関を示した.

Ciml-1 (21) は高分解能 ESIMS および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>3</sub> と 決定した. <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY および HSQC スペクトル解析により, 末端メチル H-22 ( $\delta_{\rm H}$  1.23) から, オキシメチレン水素 H-21 ( $\delta_{\rm H}$  4.99), メチレン水素 H-20 ( $\delta_{\rm H}$  1.50, 1.61), H-19 ( $\delta_{\rm H}$  1.33) と連続するスピンカップリング, および, H-22/C-20, 21, H-21/C-19, H-20/C-21 の HMBC 相関が観測されたことにより, C-19-C22 の部分構造を明らかとし た (Figure 42). また同様に, エチレン水素 H-2 ( $\delta_{\rm H}$  5.85) からエチレン水素 H-3 ( $\delta_{\rm H}$  6.90), メチレン水素 H-4 ( $\delta_{\rm H}$  2.50), オキシメチレン水素 H-5 ( $\delta_{\rm H}$  4.28), エチレン水素 H-6 ( $\delta_{\rm H}$ 5.47), H-7 ( $\delta_{\rm H}$  5.68), メチレン水素 H-8 ( $\delta_{\rm H}$  2.04), H-9 ( $\delta_{\rm H}$  1.37) と連続するスピンカッ プリングおよび H-2, 3 からエステルカルボニル C-1 ( $\delta_{\rm H}$  165.8) への HMBC 相関が観測 されたことから, C-1-C9 の部分構造が明らかとなり,  $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル基と, 5 位 の水酸基をもつことが分かった.また, HMBC の H-21/C-1 の相関から, C-1 と C-21 間 でエステル結合を形成していることを確認した.残る9つのsp3炭素はC-10からC-18間のメチレンの炭素と帰属した. $\Delta_{2,3}$ と $\Delta_{7,8}$ の幾何異性に関しては, $J_{2,3}$ と $J_{7,8}$ のカップリング定数がそれぞれ15.7 Hz および15.4 Hz を示したことより E 体と決定した.以上の結果から,21 は新規24員環マクロライドであると決定した (Figure 42).

Ciml-2(22) は高分解能 ESIMS および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより, 化学式を C<sub>22</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub> と 決定し, 不飽和度 4 であることがわかった.また, 21 に対して, 2 つの酸素原子が導入 されていることが明らかとなった.化合物 21 との <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルの比 較と, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC, および HSQC-TOCSY の相関より C-1-C-10, C-19-C-22 の部分構造を明らかとした (Figure 42).先と同様の $\alpha,\beta$ -不飽和カルボニル基と 2 つ の水酸基に加え,エポキシドと 8 位の水酸基を有することが示された.エポキシドの位 置は,C-6 および C-7 の特徴的な化学シフト (C-6: & 59.2; C-7: & 59.7) により決定し た.また,HMBC の H-21 からカルボニル炭素 C-1 への相関により,C-1-C-21 間のエス テル結合により環を形成していることを確認した.残る 8 つの sp3 炭素は C-11 から C-18 間のメチレンの炭素と帰属した. $\Delta_{2,3}$ の構造は, $J_{2,3}$ のカップリング定数 (15.6 Hz) と H2/H4 の NOE 相関が観測されたことより E 体と決定した.以上の結果から,化合物 22 は 21 の 6,7 位のオレフィンにエポキシドに変換され,8 位に水酸基が導入された 22 員 環マクロライドであると決定した (Figure 42).

Ciml-3 (23)は高分解能 ESIMS (*m/z* 516.3455 [M-H]<sup>-</sup>, calcd 516.3449) および <sup>13</sup>C NMR スペ ペクトルより化学式を C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>6</sub>P と決定した.化合物 21 との <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペ クトルの比較と, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC, HMBC, および HSQC-TOCSY の相関より 22 員 環構造が Ciml-1 と一致していることを明らかとした (Figure 42).  $\Delta_{2,3} \ge \Delta_{7,8}$ の構造は,  $J_{2,3} \ge J_{7,8}$  のカップリング定数がそれぞれ 15.7 Hz および 15.2 Hz を示したことより E 体 と決定した. HMBC の H-21 からカルボニル炭素 C-1 への相関から, C-1 と C-21 がエ ステルを介して結合していることを確認した.また,オキシメチレン水素の H-1' ( $\delta_{\rm H}$ 4.22) とアミノメチレン水素の H-2' ( $\delta_{\rm H}$  3.60) との COSY 相関,ならびに, H-2'から C-1', 9H のシングレットのアミノメチル水素 H-3'から C-2'の HMBC 相関より,トリメチ

61

ルエタノールアミン (コリン) の存在が示された. 化合物 **21** との分子量の比較と変換 に関わる修飾酵素の機能の予測から, 5 位にホスホコリンが付加されていることが示唆 された. オキシメチン炭素の C-5 (& 76.4)とオキシメチレン炭素の C-1' (& 60.3) がダブ レット ( $^{2}J_{C-5,P}$ =5.5 Hz,  $^{2}J_{C-1',P}$ =4.9 Hz,) として観測され, それらに隣接する炭素のカーボ ンシグナルがダブレット (C-4: & 40.0,  $^{3}J_{C-4,P}$ =3.7 Hz; C-6: & 130.6,  $^{3}J_{C-6,P}$ =5.3 Hz) として 見られたことより, C-5 および C-1'がリン酸エステルにより結合していることが示され た. 以上の結果から, **23** は **21** の 5 位にホスホエタノールアミンが付加した構造である と決定した (Figure 42).

Ciml-4 (24) は高分解能 ESIMS および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>27</sub>H<sub>51</sub>NO<sub>8</sub>P と決定した. 化合物 22 および 23 との <sup>1</sup>H および <sup>13</sup>C NMR スペクトルの比較と, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC および HMBC の相関より 22 と共通の骨格構造をもつことが明らかとなった (Figure 42).  $\Delta_{2,3}$ の構造は,  $J_{2,3}$ のカップリング定数がそれぞれ 15.7 Hz を示したことより *E* 体と決定した. HMBC の H-21 からカルボニル炭素 C-1 への相関から, C-1 と C-21 がエステル結合により繋がっていることを確認した. また, 23 と同様に, オキシメチレン水素の H-1' ( $\delta_{H}$  4.30) とアミノメチレン水素の H-2' ( $\delta_{H}$  3.64) との COSY 相関, ならびに, H-2'から C-1', 9H のシングレットのアミノメチル水素 H-3' ( $\delta_{H}$  3.22) から C-2' (& 66.5)の HMBC 相関より, コリンの存在が示された. オキシメチン炭素の C-5 (& 75.6) とオキシメチレン炭素の C-1' (& 58.8) がダブレット ( $^{2}J_{C-5,P}$ =5.5 Hz,  $^{2}J_{C-1',P}$ =5.0 Hz,) として観測され, それらに隣接する炭素のカーボンシグナルがダブレット (C-4: & 36.1, br d; C-6: & 58.1,  $^{3}J_{C-6,P}$ =6.0 Hz; C-2': & 66.5, brd) として見られたことより, C-5 および C-1'がリン酸エステルにより結合していることが示された.

以上の結果から, 24 は 21 の 5 位にホスホコリンが付加した化学構造を有すると決定 した (Figure 42).

62

Ciml-1 ( <b>21</b> ) <sup>b</sup>				Ciml-2 ( <b>22</b> ) <sup>c</sup>		Ciml-3 ( <b>23</b> ) <sup>c</sup>	$\operatorname{Ciml-4} (24)^d$				
Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, J in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, J in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, J in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)			
1	165.8		167.5		167.5		166.1				
2	124.5	5.85 (1H, d, 15.7)	125.4	5.94 (1H, dt, 15.6, 1.4)	125.3	5.88 (1H, d, 15.7)	124.7	5.95 (1H, d, 15.7)			
3	143.8	6.90 (1H, dt, 15.7, 7.4)	145.3	7.02 (1H, dt, 15.6, 7.5)	145.4	6.94 (1H, dt, 15.7, 7.4)	142.4	7.00 (1H, dt, 15.7, 7.5)			
4	39.7	2.50 (2H, m)	38.3	2.53 (2H, m)	40.0	2.59 (1H, m)	36.1	2.65 (1H, m)			
						2.69 (1H, m)		2.77 (1H, m)			
5	71.6	4.28 (1H, m)	72.1	3.48 (1H, m)	76.4	4.74 (1H, m)	75.6	3.93 (1H, m)			
6	131.2	5.47 (1H, dd, 15.4, 7.2)	60.6	2.88 (1H, dd, 6.5, 2.2)	130.6	5.46 (1H, dd, 15.2, 6.9)	58.1	3.02 (1H, dd, 7.6, 2.1)			
7	133.6	5.68 (1H, dt, 15.4, 7.0)	61.1	2.83 (1H, dt, 7.1, 2.2)	134.6	5.75 (1H, dt, 15.2, 7.2)	60.4	2.83 (1H, dd, 6.5, 2.1)			
8	31.7	2.04 (2H, m)	73.5	3.26 (1H, dt, 7.1, 6.8)	32.8	2.05 (2H, m)	71.1	3.29 (1H, m)			
9	28.4	1.37 (2H, m)	35.3	1.56 (2H, m)	29.6	1.39 (2H, m)	33.7	1.47 (1H, m)			
								1.57 (1H, m)			
10	$27.5^{e}$		25.7	1.40 (2H, m)	$27.2^{g}$		24.7	1.40 (2H, m)			
11	$27.7^{e}$		29.1 <sup><i>f</i></sup>		$27.2^{g}$		$27.2^{h}$				
12	$27.8^{e}$		$29.2^{f}$		$27.3^{g}$		$27.4^{h}$				
13	$27.8^{e}$		29.3 <sup>f</sup>		27.5 <sup>g</sup>		$27.4^{h}$				
14	$28.0^{e}$	1.27-1.36 (18H)	29.4 <sup>f</sup>	1 29 1 26 (1611)	27.5 <sup>g</sup>	1.32-1.36 (18H)	$27.7^{h}$	1 21 1 20 (1611)			
15	$28.0^{e}$		29.5 <sup>f</sup>	1.28-1.30 (10H)	$27.8^{g}$		$27.7^{h}$	1.21-1.29 (10H)			
16	$28.0^{e}$		29.7 <sup>f</sup>		27.8 <sup>g</sup>		$27.8^{h}$				
17	$28.1^{e}$		29.9 <sup>f</sup>		$27.8^{g}$		$28.3^{h}$				
18	$28.3^{e}$		30.1 <sup><i>f</i></sup>		27.9 <sup>g</sup>		$28.7^{h}$				
19	24.8	1.33 (2H, m)	25.9	1.40 (2H, m)	25.8	1.34 (2H, m)	24.3	1.34 (2H, m)			
20	35.6	1.50 (1H, m)	36.2	1.60 (1H, m)	36.5	1.51 (1H, m)	35.1	1.51 (1H, m)			
		1.61 (1H, m)		1.66 (1H, m)		1.61 (1H, m)		1.61 (1H, m)			
21	70.7	4.99 (1H, m)	72.4	4.99 (1H, m)	71.8	4.96 (1H, m)	71.1	4.98 (1H, m)			
22	20.1	1.23 (3H, d, 6.3)	20.4	1.23 (3H, d, 6.3)	20.4	1.21 (3H, d, 6.3)	19.8	1.23 (3H, d, 6.3)			
1′					60.3	4.22 (2H, m)	58.8	4.30 (2H, m)			
2′					67.4	3.60 (2H, m)	66.5	3.64 (2H, m)			
3′					54.7	3.20 (9H, brs)	54.1	3.22 (9H, brs)			

Table 8. <sup>13</sup>C (125 MHz) and <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data for 21-24<sup>a</sup>.

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments.

[b] Recorded in CDCl<sub>3</sub>. [c] Recorded in CD<sub>3</sub>OD. [d] Recorded in CDCl<sub>3</sub> (20% CD<sub>3</sub>OD). [e-h] Interchangeable.

### 4-9. Ciakml-1 (25) の構造決定

化合物 25 は高分解能 ESIMS および<sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>NO<sub>6</sub>P と 決定した. 化合物 24 および 20 との<sup>1</sup>H および<sup>13</sup>C NMR スペクトルの比較と,各種 2 次 元 NMR の相関より 24 と共通の骨格をもち 5 位にホスホエタノールアミンをもつ構造 を示すことが明らかとした (Figure 43, Table 9).



- <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY -→ HMBC

Figure 43. 化合物 25 の 2D NMR 相関. 青線は<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 赤線は構造決定に重要な HMBC 相関を示した.

Table 9. <sup>13</sup>C (125 MHz) and <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data for 25<sup>a</sup>.

Ciakml-1 ( <b>25</b> ) <sup><i>b</i></sup>		
Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)
1	165.9	
2	124.9	5.95 (1H, d, 15.7)
3	142.2	6.99 (1H, dt, 15.7, 7.4)
4	36.0	2.63 (1H, m)
		2.71 (1H, m)
5	75.9	3.96 (1H, dd, 12.0, 7.6)
6	58.5	3.04 (1H, dd, 7.6, 1.9)
7	60.5	2.90 (1H, dt, 6.8, 1.9)
8	71.5	3.27 (1H, dt, 6.8, 6.8)
9	33.7	1.47 (1H, m)
		1.55 (1H, m)
10	24.7	
11	$27.4^{\circ}$	
12	$27.5^{\circ}$	
13	$27.6^{\circ}$	
14	$27.7^{c}$	1.24-1.32 (18H)
15	$27.9^{\circ}$	
16	$28.0^{c}$	
17	$28.5^{\circ}$	
18	$28.8^{c}$	
19	24.3	1.35 (2H, m)
20	35.0	1.53 (1H, m)
		1.62 (1H, m)
21	71.3	4.98 (1H, m)
22	19.8	1.23 (3H, d, 6.2)
1′	61.8	4.13 (2H, m)
2′	40.3	3.19 (2H, m)

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments.

[b] Recorded in CDCl<sub>3</sub> (20% CD<sub>3</sub>OD). [c] Interchangeable.
## 第5章

#### 多様な環骨格を有する糸状菌マクロライドの探索

#### 5-1. 緒言

第3章のゲノムマイニングの結果の通り、様々な糸状菌種のゲノム上に推定マクロ ライド生合成遺伝子クラスターが存在していた.これまで報告されているマクロライ ド化合物の化学構造は、生産菌種ごとに炭素鎖やラクトン環の大きさ、修飾様式が異 なっていることから、それら遺伝子資源は多様なマクロライド化合物の探索源となる ことが期待される (Figure 10). Figure 23 の type A に含まれる生合成遺伝子クラスター には、マクロライド骨格を形成すると推測される HR-PKS と MhpC-TE に加え、

P450, SDR および BBE 様酵素が共通してコードされていることから,ある特徴的な 部分構造を有するマクロライド化合物の生成が予想される.それら3つの修飾酵素そ れぞれの一般的な反応機構は明らかにされているものの,それらが協働してマクロラ イド骨格に修飾を行う例は報告されておらず,予測が困難である.5-2 では,type A に 含まれる peml クラスターの麹菌異種発現系の構築に取り組んだ.5-3 では,これまで マクロライド天然物の単離の報告がない Macrophomina 属菌由来の mpml クラスターの 再構築により新規マクロライドの取得を目指した.また,HR-PKS と MhpC-TE により マクロライドが生合成されるという知見を集積することを目的とした.

65

5-2. *peml* クラスター 5-2-1. クラスター解析



Figure 44. peml クラスターの遺伝子構成.

*peml* クラスターは, *Penicillium expansum* のゲノム上に見出された. HR-PKS (PemlA) と MhpC-TE (PemlB) に加え, 推定 SDR の PemlC, BBE 様酵素 PemlD, P450 の PemlE および推定 *O*-acetyltransfese の PemlF がコード保存されており, 第 3 章での解析では type A に属していた (Figure 44, Table 10). PemlA は KS, AT, DH, ER, KR, ACP ドメ インをもつ iterative Type I PKS, PemlB は mhpC ドメインが保存される $\alpha/\beta$ -hydrolase superfamily タンパク質であった (Figure 45). これまでの結果から, PemlA および PemlB によりマクロライド骨格が形成された後に, 周辺の修飾酵素群により変換されることが 推測された.

	Table 10.	. <i>peml</i> cluster (	(Penicillium	expansum	)
--	-----------	-------------------------	--------------	----------	---

Gene	Size (bp)	Protein homologue (accession number)	Identity (%)/ similarity (%)	Predicted function
pemlA	7,342	Highly reducing polyketide synthase Bref-PKS [Eupenicillium brefeldianum] (A0A068ABB7)	48/64	HR-PKS
pemlB	974	Thiohydrolase Bref-TH [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ACU9)	46/62	Thioesterase
pemIC	1,003	Short-chain dehydrogenase RED3 [ <i>Magnaporthe oryzae</i> ] (G4N292)	42/63	SDR
pemID	1,892	VAO-type flavoprotein oxidase VAO615 [Myceliophthora thermophila] (G2QDQ9)	43/60	BBE-like oxidase
pemlE	1,681	Cytochrome P450 monooxygenase orf4 [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068AA98)	41/58	P450
pemlF	1,556	Trichothecene 3-O-acetyltransferase [Madurella mycetomatis] (A0A175VYW6)	52/68	Acetyltransferase

#### PemIA 1500 1750 2250 1000 20,00 Query seq. (P) binding site 🔥 Specific hits PKS PKS\_KS Qor ynt Non-specific hits 00R1 PKS\_AT PS-DH KR\_2\_FAS\_S ox cond enzyme KR omega\_3\_PfaA <mark>KAS\_I\_II</mark> FabB polyketide\_synthase MDR3 PKS\_DH KR\_2\_SDR\_ Acyl\_transf\_1 KR\_1\_FAS\_ FabD FabD MDR3 MDR\_like\_2 QOR2 KR\_3\_FAS\_S Keto KRsynt\_C\_ elong\_cond\_enzymes PTZ00050 KR\_FAS\_SDR\_ malonate\_mdcH KR\_1\_SDR\_ PLN02752 fabG PemIB 100 5.0 15.0 200 Query seq. Non-specific hits 25 FrsA

hite.						
nits		Abhydrolase_1				
		Abhydrolase_6	1			
		MhpC				
	C0G2945					
Superfamilies	FrsA superfamily					
		Abhydrolase_1 superfamily				

### PemIC

		50	100	150	20	•	252
Query seq.			active site 👍	<u> </u>			
Specific hits	te <u>/////</u>		EabC	AA			
Non-specific			cash red eni	ffer like SDP c			
hits			PRK	06953			
			adh short	****			
		(	dhbA_paeA				
Superfamilies			NADB_Rossman	nn superfamily			
		ad	h_short superfam	ily			

### PemID

Query seq.		100			200				300				Ľ.,		500				590
Specific hits																	66E		
			- T							(	GlcD								
Non-specific hits				FA	D_bin	ndin	1g_4												
Superfanilies			F	AD_bi	nding_4	1 supe	erfamil	y								BBE	super	fa	
									G1	cD su	uperi	ami	ly					Г.	

### PemIE

Query seq.	150	225	300	375	450	521
Specific hits			CypX			
Non-specific			p450			
hits				PLN02655		
				P450_cyclo	AA_1	
Superfamilies		p	450 superfami	.ly		

Figure 45. PemlA-E のドメイン構造.

#### 5-2-2. peml クラスターの再構築と化合物 31-34 の取得

まず, PemlA および PemlB により構築されるマクロライド骨格を明らかとするため に *pemlA* および *pemlB* を導入した AO-*pemlAB* を作製した. CPS 培地を用いて液体培養 後, 乾燥菌体 MeOH 抽出物を HPLC 分析したところ, コントロールには見られない化 合物ピーク **31** が検出された (Figure 46). そこで AO-*pemlAB* を大量培養後, 各種クロマ トグラフィーを用いて菌体抽出物より Peml-1 (**31**) の単離精製を行った. 構造解析の結 果, α/β-不飽和カルボニル基を有する 16 員環マクロライドであることが明らかとなっ た (5-4 参照). この結果から, *peml* クラスターに関しても同様にマクロライド生合成遺 伝子クラスターであることが示された.

次に、複数の糸状菌種に広く保存される 3 つの修飾酵素 PemlC-E の機能解明に取り 組んだ.まず, pemlCおよび pemlD を AO-pemlAB に導入し, AO-pemlABCD を作製し, 同様に分析したところ,いずれの形質転換株においても 31 の変換は見られなかった. 一方で, pemlE を導入した AO-pemlABE の培地と菌体成分において,2 つの新たな化合 物ピーク 32,33 が見出された (Figure 46).単離精製後,構造解析したところ,Peml-2 (32)は 31 の 3 位に水酸基が導入された化合物であることがわかった.また,Peml-3 (33) は 3,4-ジオール体であった.この結果より,PemlE は 16 員環マクロライドの 3 位と 4 位に順次水酸化を行う P450 であることが明らかとなった.

続いて、残る修飾酵素より変換されたマクロライドを創出するために、AO-pemlABE に対して pemlC, pemlD, あるいは、その両方を組み込んだ AO-pemlABEC, AO-pemlABED および pemlABECD を作製し、それらの培地と菌体成分を分析した.その結果、AOpemlABEC では培地・菌体成分ともに変化は見られなかった一方で、AO-pemlABED お よび AO-pemlABECD において培地成分のみで検出される化合物ピーク **34** を確認した (Figure 46).構造解析を行ったところ、Peml-4 (**34**) はラクトン環が開環した新規カルボ ン酸体であることが明らかとなった (Figure 46, Table 12, 5-4 参照).また 3 位の水酸基 がケトンに酸化され、 $\alpha,\beta$ 位の二重結合はメチレンへと還元されていた. pemlD および

68

pemICD 導入株において同様の変化を示したことから, 33 は PemID により 34 への変換 されており PemIC は機能していないことがわかった.



Figure 46. AO-*pemlAB*, *ABE*, *ABED* を培養したときの菌体成分または培地成分の HPLC クロマトグラム (検出はそれぞれ 210 nm あるいはエアロゾルベース検出器 (NQAD)) と 31-34 の化学構造. コントロールとして空ベクターを導入した麹菌株を用いた.

P450, BBE, SDR は type A (第3章参照)の遺伝子クラスターに共通して保存されて いるため,修飾酵素として機能することが予想されたが,上述の通りはたらいていなか った. PemlC の機能には,その他酵素による基質の構造変換が必要な可能性があると考 え,近傍にコードされる推定 *O*-acetyltransferase の PemlF 遺伝子を PemlC 遺伝子ととも に導入した AO-*pemlABEDCF* を作製した.しかし,得られた形質転換体9株のいずれに おいても二次代謝パターンに変動が見られなかった.*pemlC* の機能に関しては,異なる ホストの検討,発現タンパクによる *in vitro* 反応等を用いた詳細な検証が必要とされる.

#### 5-2-3. 考察

麹菌異種発現系を基盤とした peml クラスターの再構築により,16 員環マクロライド 31-33 および新規カルボン酸体 34 の取得に成功し,その結果により peml クラスターの 生合成機構を推測した.まず PemlA と PemlB により 31 が構築され,PemlE による 2,3 位が順次水酸化されることで 32,33 へと変換される.次に 33 が BBE 様酵素により変 換されることで 34 に変換されると予想した (Scheme 2).

PemlC は type A の遺伝子クラスター中にも共通して保存されていたが, 麹菌内での 機能は見られなかった. 導入されている遺伝子の発現解析, 精製タンパク質を用いた in vitro 反応により, その酵素機能の有無を検証する必要がある.



Scheme 2. Peml-1-4 の推定生合成経路.

5-3. mpml クラスター 5-3-1. クラスター解析 mpmlB mpmlA TE HR-PKS + 1 kb

Figure 47. mpml クラスターの遺伝子構成.

*mpml* クラスターは, *Macrophomina phaseolina* のゲノム上に見出され, HR-PKS (MpmlA) と MhpC-TE (MpmlB) がコードされていた (Figure 47, Table 11). MpmlA はKS, AT, DH, ER, KR, ACP ドメインをもつ iterative Type I PKS であった (Figure 48). こ れまでの知見から MpmlA および MpmlB によりマクロライドが生合成されると推測した. なお, これまでに *Macrophomina* 属菌からマクロライドの単離の報告はなかった.



Figure 48. MpmlA-B のドメイン構造.

Table 11. <i>mpml</i> cluster	(Macrophomina	phaseolina MS6).
-------------------------------	---------------	------------------

Gene	Size (bp)	Protein homologue (accession number)	Identity (%)/ similarity (%)	Predicted function
mpmlA	7,935	Highly reducing polyketide synthase Bref-PKS [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ABB7)	49/65	HR-PKS
mpmlB	992	Thiohydrolase Bref-TH [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ACU9)	54/70	Thioesterase

#### 5-3-2. mpml クラスターの再構築と新規 12 員環マクロライドの取得

Mpml クラスター由来のマクロライドを取得するために, *mpmlA* および *mpmlB* を導入した AO-*mpmlAB* を作製し, CPS 培地を用いて液体培養後, 培養培地の EtOAc 抽出成分を HPLC 分析したところ, DAD では検出されず, エアロゾルベース検出器 (NQAD, OSAKA SODA) のみで見られる新たなピーク 35 を見出した (Figure 49). 単離精製後,構造解析により Mpml-1 (35) が新規 12 員環マクロライドであると決定した (Table 13, 5-5 参照). これにより, *mpml* クラスターがマクロライド生合成遺伝子クラスターであることが示された.



Figure 49. AO-*mpmlAB* を培養したときの培地成分の HPLC クロマトグラム (\*エアロゾ ルベース検出器 (NQAD, OSAKASODA)) と 29 の化学構造. コントロールとして空ベ クターを導入した麹菌株を用いた.

#### 5-3-3. 考察

MpmlA および MpmlB の異種発現により、12 員環マクロライド **35** の単離に至った. シンプルな構造であるもののこれまで報告がない新規化合物であった. 12 員環の糸状 菌マクロライドでは、植物毒性や抗真菌活性を示す cladospolides<sup>89</sup> や、抗真菌活性を有 する patulolides<sup>90,91</sup>,抗 HIV 活性をもつ balticolid<sup>92</sup> が知られており、水酸基の有無やオ レフィンの立体化学といったわずかな構造の違いによって活性の有無が大きく異なっ ている.現在,抗ウイルス活性,抗真菌活性,抗菌活性および細胞毒性に関して評価を 行なっている.

#### 5-4. peml クラスター由来マクロライドとカルボン酸体 34 の構造決定

既知化合物 **31-33** の化学構造は,高分解能 ESIMS および <sup>13</sup>C NMR により以下の通り 化学式を決定し,各種 2 次元 NMR スペクトル解析により化学構造を決定した (Table S3). **33** に関しては,既報のスペクトルとも比較を行い,化学構造を確認した <sup>93</sup>.化合 物 **32** の 4,5 および 15 位の水酸基の立体化学に関しては,X 線結晶構造解析により決定 した.

**31**: C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>2</sub>, (*m/z* 275.1985 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 275.1982), **32**: C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>, (*m/z* 291.1931 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 291.1926), **33**: C<sub>16</sub>H<sub>28</sub>O<sub>4</sub>, (*m/z* 307.1879 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 307.1887).

Peml-4 (34) は高分解能 ESIMS (*m*/z 301.2023 [M-H]<sup>-</sup>, calcd 301.2010) および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>16</sub>H<sub>30</sub>O<sub>5</sub> と決定した. <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, COSY および HSQC スペクトル解析により,末端メチル H-16 ( $\delta_{H}$  1.13) から,オキシメチレン水素 H-15 ( $\delta_{H}$ 3.69),メチレン水素 H-14 ( $\delta_{H}$  1.38, 1.44) と連続するスピンカップリング,および, H-16/C-14, H-15/C-13, C-14 の HMBC 相関が観測されたことにより, C-13-C16 の部分構造 を明らかとした (Figure 50). また同様に,メチレン水素 H-2 ( $\delta_{H}$  2.54), H-3 ( $\delta_{H}$  2.82) 間, および,オキシメチレン水素 H- 5 ( $\delta_{H}$  4.08),メチレン水素 H-6 ( $\delta_{H}$  1.55, 1.73) 間のスピ ンカップリングが観測され,H-2/C-1,C-4,H-3/C-1,C-4,H-5/C-4,C-7,H-6/C-1,C-7 の HMBC 相関が確認されたことにより,C-1-C-7 の部分構造が明らかとなった.<sup>13</sup>C NMR スペクトルの特徴的な化学シフトより,C-4 ( $\delta_{C}$  213.8) がケトン基であると決定した. 残る 5 つの sp3 炭素は C-8 から C-12 間のメチレンの炭素と帰属した.以上の結果から, 34 は Figure 46 に示す新規カルボン酸体であると決定した.



Figure 50. 化合物 34 の 2D NMR 相関. 青線は <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 赤線は構造決定に重要な HMBC 相関を示した.

Table 12. <sup>13</sup>C (125 MHz) and <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data for Peml-4 (34)<sup>*a,b*</sup>.

Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)
1	176.4	
2	28.4	2.54 (2H, t, 6.4)
3	33.8	2.82 (2H, dt, 6.5, 6.4)
4	213.8	
5	78.0	4.08 (1H, dd, 8.2, 4.2)
6	34.7	1.73 (1H, m)
		1.55 (1H, m)
7	26.1	1.40 (2H, m)
8	30.5	
9	30.6	
10	30.6	1 22 1 26 (16H)
11	30.7	1.32-1.30 (1011)
12	30.8	
13	26.9	
14	40.2	1.41 (1H, m)
		1.47 (1H, m)
15	68.6	3.69 (1H, m)
16	23.5	1.13 (3H, d, 6.2)

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments.

[b] Recorded in CD<sub>3</sub>OD.

### 5-5. mpml クラスター由来新規マクロライドの構造決定

Mpml-1 (35) は高解能質量分析 (m/z 235.1304 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 235.1310) および <sup>13</sup>C NMR スペクトルより化学式を C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub> と決定した. 1D NMR, COSY および HSQC スペ クトル解析により, 末端メチル H-12 ( $\delta_{\rm H}$  1.26) から, オキシメチレン水素 H-11 ( $\delta_{\rm H}$  5.18), メチレン水素 H-10 ( $\delta_{\rm H}$  2.18, 2.37), エチレン水素 H-9 ( $\delta_{\rm H}$  5.51), エチレン水素 H-8 ( $\delta_{\rm H}$  5.42), オキシメチレン水素 H-7 ( $\delta_{\rm H}$  4.10), メチレン水素 H-10 ( $\delta_{\rm H}$  1.51, 1.78) と連続するスピン カップリングが観測されたことにより, C-6-C12 の部分構造を明らかとした (Figure 51). また同様に,メチレン水素 H-2 (δ<sub>H</sub> 2.25, 2.35) から, H-3 (δ<sub>H</sub> 1.50, 1.80),メチレン水素 H-4 (δ<sub>H</sub> 1.25) に続くスピンカップリングが観測されたことより, C1-C-4 の部分構造を明ら かとした. 加えて, H-3/C-5, H-4/C-6, H-8/C-6 の HMBC 相関が確認されたことにより, C-4 と C-6 が C-5 を介して繋がっていることが明らかとなった.また, HMBC の H-11/C-1 の相関から, C-1 と C-11 間でエステル結合を形成していることを確認した.以上の結 果から, **35** は新規 12 員環マクロライドであると決定した (Figure 49).



Figure 51.35 の 2D NMR 相関. 青線は <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 赤線は構造決定に重要な HMBC 相関を示した.

Position	<sup>13</sup> C	$^{1}$ H (multi, J in Hz)
1	173.3	
2	32.8	2.35 (1H, m)
		2.25 (1H, m)
3	24.2	1.80 (1H, m)
		1.50 (1H, m)
4	23.8	1.25 (2H, m)
5	23.2	1.48 (2H, m)
6	34.2	1.78 (1H, m)
		1.51 (1H, m)
7	73.1	4.10 (1H, m)
8	135.5	5.42 (1H, ddd, 15.1, 9.2, 1.6)
9	130.0	5.51 (1H, ddd, 15.1, 10.7, 3.4)
10	40.6	2.37 (1H, m)
		2.18 (1H, dd, 13.9, 10.7)
11	68.3	5.18 (1H, m)
12	20.6	1.26 (3H, d, 6.3)

Table 13. <sup>13</sup>C (125 MHz) and <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data for 35<sup>*a,b*</sup>.

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments. [b] Recorded in CDCl<sub>3</sub>.

### 第6章

### Brefeldin A の生合成研究

#### 6-1. 緒言

Brefeldin A<sup>63</sup>は、1958年に糸状菌 Penicillium decumbens より単離された 16員環マク ロライドであり、これまでに10以上の類縁体が単離されている (Figure 52)<sup>94,95</sup>. Brefeldin A は様々な子嚢菌や担子菌に対する抗真菌活性や植物の生育阻害活性、抗腫瘍細胞活 性、抗ウイルス活性など幅広い生物活性が報告されている<sup>96-99</sup>. その作用機序に関する 研究は古くから行われており、上記の活性は細胞内(ウイルスでは宿主細胞内)の小胞 体からゴルジ体へのタンパク質輸送を阻害することに起因することが明らかとされて いる<sup>100,101</sup>. 強力なガン細胞のアポトーシス誘導活性を示すことから、新規抗がん剤の シード化合物としても注目されており、brefeldin A 誘導体の合成研究も盛んに行われて いる<sup>102</sup>. また、brefeldin A を添加することでゴルジ体から細胞外へのタンパク質の分泌 を阻害し、細胞内に捕捉できるため、分泌タンパクを細胞内で検出する際の研究試薬と しても汎用されている. このように brefeldin A は多方面の分野に渡り、研究、利用され ているマクロライド天然物である.

76



Figure 52. Brefeldins 類縁体の化学構造.

Brefeldin A の生合成研究に関しては、2014年に推定生合成遺伝子クラスター (bref クラスター) が報告された (Figure 53)<sup>82</sup>. しかし、その特徴的な C-C 結合の形成メカニズ ムおよびラクトン環構築機構は明らかにされておらず、また、そのクラスターが直接 brefeldin A の生産に関与するという実験結果は得られていなかった.



Figure 53. 先行研究による bref クラスターの生合成研究の概略.

先行研究において, Eupenicillium ludwigii のハイグロマイシン B 耐性株 (MT-3 株) が brefeldin A を生産することを見出していたので,その株について次世代シーケンス 解析後,ゲノムマイニングを行なった.その結果,HR-PKS と MhpC-TE を含む brefeldin A 生合成遺伝子クラスター候補 (elb クラスター) を見出した (Figure 54).そこで本研 究では, brefeldin A の分子内 C-C 結合およびラクトン環形成に必要な全生合成遺伝子を 同定し,生合成機構を解明するために,麹菌異種発現系を用いた brefeldin A 生合成経路の再構築に取り組んだ.



Figure 54. elb クラスターと bref クラスターの比較. 相同性 identity (%) を記した.

### 6-2. elb クラスターの解析

*elb* クラスターは *E. ludwigii* MT-3 のドラフトゲノム上に見出され, *bref* クラスターと 同様に HR-PKS (ElbA) と TE (ElbB), 4 つの P450 (ElbC-F) から構成されていた (Figure 54, Table 14). ElbA は KS, AT, DH, ER, KR, ACP ドメインをもつ iterative Type I PKS であった (Figure 55). ElbB は CDD を用いた解析では mhpC ドメインが見られなかった が, ApmlB (Identity: 38%, similarity: 58%) やその他機能同定した MhpC-TE と類似性が あることがわかった.4 つの P450 についてそれぞれアライメント解析を行ったところ, ElbC と ElbF が高い類似性を示した (Identity: 71%, similarity: 82%) (Table 15).

### ElbA

EIDA	1 250	500 750	1000 125	50 150	0 1750	2000 23	250 2373
Query seq.	active site 🗼 🗼 🛝			NAD(P) 6	inding site AAAAAA	active site	
Specific hits	PKS PKS_KS ketoacy1-synt	PksD			NAD(P) bindin PKS_EI encyl_r Qor	ed zinc	<b>)</b>
Non-specific	KAS_I_II	PKS_RT	PS-DH		KR_ QOR1	KR_2_FAS_SD	
EIbC Query seq.	1	15.0	225	300	375	450	513
Specific hits Non-specific hits			p450 PLN02	CypX :936			
Superfamilies			p450	) superfam.	ily		
ElbD							
Query seq.		150	228	300	376	450	495
Specific hits			45.4	CypX			
Non-specific hits			P450 PLN02	936 P450	_cycloAA_1		
Superfanilies			q	450 super	family		
EIbE Query seq.	1 75	150 I	225 	300	375	450 	537
Specific hits					CypX		
Non-specific hits				p450 P450_cuc	PTZ004	04	
Superfamilies				p450 s	uperfamily		
EIbF Query seq.	1 75	150 	225	300	375	450 	502
Specific hits				CypX			
Non-specific hits			p450 PLN025	936		7	
Superfamilies			p450	superfami	ly		

### Figure 55. ElbA-F のドメイン構造.

### Table 14. elb cluster (Eupenicillium ludwigii MT-3).

Gene	Size (bp)	Protein homologue (accession number)	Identity (%)/ similarity (%)	Predicted function
elbA	7,317	Highly reducing polyketide synthase Bref-PKS [Eupenicillium brefeldianum] (A0A068ABB7)	94/97	HR-PKS
elbB	965	Thiohydrolase Bref-TH [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ACU9)	96/98	Thioesterase
elbC	1,721	Cytochrome P450 monooxygenase orf3 [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068A9T2)	97/99	P450
elbD	1,640	Cytochrome P450 monooxygenase orf4 [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068AA98)	88/92	P450
elbE	1,826	Cytochrome P450 monooxygenase orf5 [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068AA78)	93/97	P450
elbF	1,509	Cytochrome P450 monooxygenase orf6 [ <i>Eupenicillium brefeldianum</i> ] (A0A068ACU3)	96/98	P450

	ElbC	ElbD	ElbE
ElbF	71/82	37/52	23/41
ElbE	23/41	22/42	
ElbD	37/52		

Table 15. Identity and similarity of Elb-C-F (Identity (%)/similarity (%)).

#### 6-3. Brefeldin A 生合成経路の再構築

まず, HR-PKS と TE によって生合成される化合物を取得することを目的として, elbA および elbB を導入した AO-elbAB を作製した. CPS 培地を用いて液体培養後, 乾燥菌体 MeOH 抽出物を HPLC 分析したところ, コントロールには見られない保持時間 14.1 min の化合物ピーク 37 が検出された (Figure 56). その構造解析の結果, Elb-1 (37) はラクト ン環構造をもたないエチルエステル体であることが明らかとなった (Figure 56). 化合物 37 は, 先行研究で報告されていた Bref-PKS と Bref-TH 由来のカルボン酸体 36 がエチ ルエステル化された構造であり,炭素鎖長や二重結合の位置は一致していた. 化合物 36, 37 とラクトン環を有する brefeldin C の構造を比較したところ, 5 位-9 位間の C-C 結合 と 4 位-5 位の二重結合の有無の違いが見られた (Figure 57). ラクトン環が構築されるた めには, 予め C-C 結合による 5 員環の形成あるいは二重結合の変換が必要とされるこ とが予想された.



Figure 56. AO-*elbAB*, *elbABF*, *elbABFD*を培養したときの菌体成分の HPLC クロマトグ ラム (検出波長 210 nm) と 36-38 の化学構造. コントロールとして空ベクターを導入し た麹菌株を用いた.



Figure 57. 化合物 36, 37 および brefeldin C の化学構造の比較.

*bref* クラスターと *elb* クラスターには共通して,4 つの P450 がコードされている.そこで,ラクトン環が形成されるためにはクラスター内にコードされる4 つの P450 のいずれかの機能が必要であると考え ElbC-E を順次導入し,二次代謝プロファイルの変化を調べることにした.



Scheme 3. ElbA-F の機能解析スキーム. \*elbC と elbE は cDNA よりクローニングした.

ElbC と ElbF が高い類似性を示したことから類似する機能をもつことが予想されたた め、まず AO-elbAB に elbC および elbF を同時に導入することで AO-elbABCF を、残り の elbD および elbE を同時に組み込むことで AO- elbABDE を作製した. 同様に分析した ところ、AO-elbABDE では変化は見られなかった一方で、AO-elbABCF の菌体成分にお いて保持時間 12.7 min に新たな化合物ピーク 38 が確認された (Scheme 3-②). elbC と elbF のどちらが機能したかを確かめるために、それぞれを AO-elbAB に組み込んだ AOelbABC と AO-elbABF の菌体成分を分析した結果、AO-elbABF において 38 の生産が見 られた (Scheme 3-③, Figure 56). 構造解析により、38 が brefeldin C であることを明ら かとした. この結果から、分子内 C-C 結合とラクトン環構造を有する brefeldin C の生産 には ElbA、ElbB に加え、ElbF の機能が必要であることが示された.

次に、7 位の水酸化を行う P450 の同定に取り組んだ. *elbD* と *elbE* をそれぞれ AO*elbABF* に導入した AO-*elbABFD*, *elbABFE* を作製し、その培養培地の EtOAc 抽出成分 と菌体 MeOH 抽出成分を同様に分析したところ、AO-*elbABFD* の培地抽出成分中に保持 時間 8.8 min の新しい化合物ピーク **39** が検出された (Scheme 3-④, Figure 56). 構造解 析した結果, **39** は brefeldin A であることが明らかとなった. なお、以前に *E. ludwigii* MT-3 より単離した brefeldin A の標品と HPLC 分析における保持時間は一致していた. これにより、ElbD が brefeldin C の7 位を水酸化することが示された. 以上の結果から、

82

brefeldin A の生合成に関わる全遺伝子 *elbA*, *elbB*, *elbE* および *elbD* を同定することがで きた.

続いて, brefeldin A に対して残る 2 つの P450 が機能して生合成される化合物を取得 することを目的に, *elbC* および *elbE* を順次導入した.しかし,詳細な検討をしたもの のいずれの条件においても変換が確認されなかった (Scheme 3-⑤, Figure S3).以上の結 果と, *E. ludwigii* MT-3 からは brefeldin A 以外の類縁体は単離されていなかったことか ら<sup>78</sup>, *elbC* および *elbE* は機能しないことが示唆された.

以上の結果から, E. ludwigii MfT-3 ゲノム上にコードされる elb クラスターが brefeldin A 生合成遺伝子クラスターであることが実証され, elbA, elbB, elbC および elbF が brefeldin A 生合成に関わる全ての遺伝子であることがわかった. ElbA と ElbB のみでは ラクトン環を形成せず, ElbF の機能が必須であること, ElbF は brefeldins 類縁体に特徴 的なシクロペンタン環の構築に関わることが明らかとなった. 加えて, ElbD は brefeldin A の 7 位の水酸基の導入に関わることが示された.

#### 6-4. ElbB の機能解析

6-3 の結果より, brefeldin C のラクトン環形成は ElbA と ElbB では不十分であり, P450 の ElbF の機能が必須であることが明らかとなった. 化学構造と酵素機能の予測から, ElbA 上で伸長された炭素鎖に対して ElbF が分子内 5 員環を形成することで, ElbB に よるラクトン環化が進行すると予想した.本節では,この仮説を確かめるために, ElbB の発現タンパクを用いた *in vitro* 反応による機能解析を行った.

#### 6-4-1. ElbB の精製

まず, *E. ludwigii* MT-3 より調製した cDNA ライブラリーをテンプレートに *elbB<sup>e</sup>* をク ローニングし, pET28a ベクターの N 末端 His6 タグ下流に組み込むことで,発現ベクタ ー pET28\_*elbB* を作製した. pET28\_*elbB* を導入した *Escherichia coli* BL21 (DE3) の小ス ケール培養 (30/40 mL) を行い, ElbB 発現に適した IPTG 濃度条件の検討を行ったとこ ろ, IPTG 0.1 mM または 0.4 mM 添加時に ElbB が可溶性タンパク質として発現することがわかった (Figure 58). 大量培養時はより低濃度の IPTG 0.1 mM を用いた.



Figure 58. SDS-PAGE 分析による His タグ融合 ElbB の発現条件の検討. 組み換え ElbB の発現株 *E. coli* BL21 (DE3)\_*elbB* は 16℃ で 20 h 培養を行なった. タンパク質発現誘導 に用いた IPTG の濃度は (A) 0.05 mM, (B) 1 mM, (C) 0.1 mM or (D) 0.4 mM とした. NC: ネガティブコントロール (*E. coli* BL21 (DE3), PC: ポジティブコントロール (CphE). タンパク質分子量の計算値; His-CphE: 48 kDa, His-ElbB: 35 kDa.

精製された ElbB を得るために,まず,上記形質転換体を大スケール (150 mL) で培養を行なった. 菌体より抽出されたタンパク質可溶性画分を Ni-カラムクロマトグラフィーを用いて分画することで, ElbB を精製した (Figure 59, Lane 7). なお,250 mM イ ミダゾールバッファーによる溶出画分は,アミコン<sup>®</sup>を用いてバッファー交換を数回行 うことで含有イミダゾール濃度を1 μM 以下にした (Figure 59, Lane 8).



Figure 59. 組み換え ElbB の発現と精製. タンパク質含有画分は12% ゲルを用いて SDS-PAGE and stained with CBB. Lane 1: 不溶タンパク質画分, Lane 2: 分子量マーカー, Lane
3: 細胞溶解液のタンパク質可溶画分; Lane 4: 素通り画分; Lane 5: 10 mM イミダゾール による洗浄画分; Lane 6: 60 mM イミダゾールによる洗浄画分; Lane 7: 250 mM イミダゾ ールによる溶出画分; Lane 8: アミコンによるバッファー交換後のサンプル.

#### 6-4-2. 基質 SNAC 体の合成

推定 ElbB 基質の SNAC 体 40 の合成を行なった.まず, AO-*elbABF* より単離した brefeldin C (38) を加水分解することで,カルボン酸体 41 を得た. 化合物 41 に対して縮 合剤 EDC 存在下で SNAC と反応させたところ,目的の 40 は得られず,分子内ラクト ン環化反応と SNAC のマイケル付加反応が進行した 42 が生成した (Scheme 4).



Scheme 4. 基質 SNAC 体 (40) の合成戦略スキーム.

そこで、15 位の水酸基による分子内ラクトン化を防ぐために 41 の水酸基の TBDPS 保護体 43 とした後に SNAC 化を検討したところ、予想通り SNAC がカルボン酸と縮合 した 44 が得られた (Scheme 5). 次に TBAF を用いた TBDPS 基の脱保護を検討したと ころ、TLC によりサンプルの分解が確認された.そこで、温和な条件下で脱保護が可能 な HF•Pyridine を用いて検討を行ったところ、反応開始 2 時間で TBDPS 基が一つ外れ た化合物のスポットが確認され、43 時間後には TBDPS 基が 2 つとも脱保護された化合 物が主に生成していた.なお、反応開始から 2.5 日時点では、原料のスポットは消失し ていた.そして反応開始から 12 日後に反応産物より、目的の 40 を得た.高分解能 ESIMS および各種 1 次元および 2 次元 NMR スペクトルを用いた解析により、化合物の構造を 決定した.



Scheme 5. 基質 SNAC 体の合成スキーム.

#### 6-4-3. ElbBの in vitro 機能解析

ElbB が HR-PKS 上で C-C 結合が導入された基質を認識してラクトン環構築すること を検証するために, ElbB 組み換えタンパク質との基質 SNAC 体を用いて *in vitro* 機能解 析を行った. 調製した基質 SNAC 体 40 を, N 末端 His タグ融合タンパク質として発現 させた組み替え ElbB と混合し,室温にて 1.5 時間インキュベートしたところ, ElbB 依 存的な基質の消費,および新たな 2 つの産物が確認された. 化合物 38 は標品との保持 時間 (12.5 min) と UV 吸収スペクトルが一致したことからラクトン環が形成された brefeldin C であることが明らかとなった. また, HPLC を用いて分取したサンプルの高 分解能 ESIMS の結果 (287.1615 [M+Na]<sup>+</sup>, caled 287.1618) もその構造を裏付けている. なお,保持時間 9 min の化合物ピークは標品との比較により,加水分解産物 41 と決定 した. このことから, ElbB は brefeldin C の生合成において, ACP ドメイン上で C-C 結 合が形成された炭素骨格を認識して,ラクトン環を形成することが示唆された. カルボ ン酸体 41 は,生体内とは異なる *in vitro* 中であること,あるいは,ElbB が N 末端に His タグ配列をもつことでタンパク質のコンフォメーションに変化が誘起され、本来の反応 とは異なる加水分解反応が起きたために生成されたと考えられる.



Figure 60. (A) 基質 SNAC 体 40 と組み換え ElbB との *in vitro* 酵素反応条件と, (B) 基質 SNAC 体 40 と組み換え ElbB との *in vitro* 酵素反応の HPLC クロマトグラム (検出波長 210 nm).

生体内において, ElbA から加水分解的に切り出された 36 が ElbF によって環化され ることで生じる 41 を, ElbB がラクトン環を形成し 38 へと変換している可能性がある (Figure 61A). そこで, 組み換え ElbB と 41 を同様にインキュベートしたところ, いず れの変化も認められなかった (Figure 61A). これにより 41 は ElbB の基質ではないこと が示唆された.

また, 麹菌内において ElbA と ElbB により生産されたエチルエステル体 37 が ElbF に より 45 へと変換された後に, 再び ElbB により認識され, ラクトン環を構築する可能性 がある (Figure 61B). そこで, 45 のミミックであるメチルエステル体 46 と組み換え ElbB を同様に反応させたところ, 46 のピークに変化は見られなかった (Figure 61B). この 結果から, 45 も ElbB の基質ではないことが示唆された. 加えて、ElbA から加水分解により切り出されて生じた 36 が ElbB によりラクトン環 を形成する経路も考えられる (Figure 61C). そこで、36 と組み換え ElbB を同様にイン キュベートしたところ、いずれの変化も確認されなかった (Figure 61C). 以上の結果か ら、ElbF の機能の有無に関わらず、一度 HR-PKS から切り出された炭素鎖が ElbB に基 質として認識されることはないことが示唆された.



Figure 61. 検証した brefeldin C の生合成経路と各基質と組み換え ElbB を用いた *in vitro* 酵素反応の HPLC クロマトグラム (検出波長 210 nm).

次に,組み換え ElbB のバッファーごとの反応効率を確かめるために,100 mM リン酸バッファー (pH 7.4), 50 mM リン酸バッファー (pH 7.4),および 10 mM Tris-HCl バ ッファー\*を用いて,先と同様に基質 SNAC 体 40 と反応させた.その結果,brefeldin C のピークに顕著な違いは見られず,バッファーによる影響はほとんど確認されなかった (Figure 62).



Figure 62. 異なるバッファー中での組み換え ElbB を用いた *in vitro* 酵素反応の HPLC クロマトグラム (検出波長 210 nm).<sup>\*</sup>10 mM Tris-HCl buffer は, 100 mM リン酸バッファーを mQ により 10 倍希釈することで調製した.

#### 6-5. 考察

本研究では、麹菌異種発現系を用いた elb クラスターの機能解析により、brefeldin A の C-C 結合による 5 員環の構築には、HR-PKS と TE に加え、P450 の機能を必要とする ことが明らかとした.また、発現タンパク質 ElbB を用いた機能解析により、ElbB は分 子内に 5 員環構造を有する基質 SNAC 体 40 として認識し、ラクトン環を形成すること で brefeldin C を生成することがわかった.また、brefeldin A の生合成に必要な 4 つの遺 伝子も同定した.

以上の結果より, brefeldin A の生合成メカニズムを以下のように推定した (Figure 63). まず, ElbA (HR-PKS) によりマロニル CoA を伸長基質として C16 の炭素鎖が形成され る. 次に ElbF (P450) が ACP 上にロードされている炭素鎖の 5 位-9 位の間に C-C 結合 を導入することでシクロペンタン環が構築される. 最後に, ElbB のセリン残基にその 炭素骨格が転移された後に, 15 位の水酸基と 1 位のカルボニル炭素間のラクトン環構 築を伴い HR-PKS から切り出されることで, brefeldin C が生成する. そして, ElbD (P450) が brefeldin C の 7 位を水酸化することで, brefeldin A へと変換されると考えられた (Scheme 1). ただし, P450 が機能しない場合は, HR-PKS 上にロードされた炭素鎖が TE の基質活性部位に適切に認識されないために加水分解されてしまい, カルボン酸体 として切り出されると推測された (Scheme 2). 麹菌内で異種発現により得られた 37 は, 麹菌内因性の酵素により変換されたと予想した.

先行研究において, *in vitro* および酵母での異種発現を用いた Bref-PKS と Bref-TH の 機能解析によりカルボン酸体 36 が生成されたという結果は、上述の推定生合成機構を 支持するものである.



Figure 63. Brefeldin A の推定生合成メカニズム.

ElbBがP450による環化前の炭素鎖を認識すると加水分解的に切り出すことを確かめ るためには、36のSNAC体とElbBとの*invitro*反応を確認する必要がある (Figure 64A). 本研究では 36のSNAC体の合成を試みたが、36へのSNACの縮合が進行せず、基質 を調製することができなかった. ElbBの基質認識機構や基質のシクロペンタン環の有 無による ElbB 活性部位でのコンフォメーションの違いなどを分子レベルで解明するために,現在, ElbB の X 線結晶構造解析に取り組んでいる.

今回, ElbF により brefeldin C における 5 位と 9 位の C-C 結合が形成されることが間 接的に示されたが、その基質および産物は明らかとなっていない. それらを直接明らか とするために、ElbF を発現する大腸菌のミクロソーム膜画分と対応する SNAC 体基質 を用いた *in vitro* アッセイが必要とされる (Figure 64B).



Figure 64. (A) ElbB および (B) ElbF の推定反応機構と今後行う予定の in vitro 機能解析 のスキーム.

P450 の ElbF による C-C 結合形成機構は,以下の経路が考えられる (Figure 65). ま ず, ElbF によって9位に発生させたラジカルが,4位-5位間の二重結合に付加すること で5位-9位間の C-C 結合が形成される.4位のラジカルは ElbB のヒドロキシラジカル と再結合することで,水酸化が達成されると推測した.



Figure 65. ElbF による 5 位-9 位間 C-C 結合の推定形成メカニズム.

本章では、brefeldin A の生合成遺伝子クラスターの同定、生合成に必須の全遺伝子の 解明およびラクトン環形成に関する推定メカニズムの提唱に至った.これにより、HR-PKS と TE 以外の酵素を必要とするマクロライド生合成機構が存在することが示され た.Brefeldin A と同様にマクロライド骨格内に C-C 結合を有する化合物として、 *Penicillium verrucosum* よりバクテリアの primase 阻害活性を有する Sch642305 が単離さ れている (Figure 66)<sup>80</sup>. その構造から類似のマクロライド形成機構を有することが予想 される.本研究の知見を足がかりとした生合成研究により、brefeldins や Sch642305 な どの化合物群に共通する生合成マシナリーが解明されること、そして、その知見が再び ゲノム情報を基盤とした天然物探索研究へと還元されることで、ほとんど報告例のない 分子内 C-C 結合を有する糸状菌マクロライド天然物が探索可能となることに期待した い.



Sch642305 Figure 66. Structure of Sch642305.

総括

本研究では、糸状菌由来の新規マクロライド天然物を取得することを目的に、ゲノム マイニングにより見出した HR-PKS と MhpC-TE をコードする遺伝子クラスターを標的 として, 麹菌異種発現系を基盤とする天然物探索に取り組んだ. 第2章では、 ケムシ内 生糸状菌のゲノム上に存在する apml クラスターの再構築により,共役したヘキサエン 構造を有する新規 34 員環マクロライド phaeospelide A を単離した. また, その生合成 には HR-PKS と MhpC-TE の両方の機能が必要であることを実証した. 第3章では、そ の知見に基づき、公開データベースと植物・昆虫内生糸状菌のドラフトゲノムデータベ ースを用いて HR-PKS と MhpC-TE を指標とした網羅的なゲノムマイニングを行い,計 159種の糸状菌のゲノム上に200以上の推定マクロライド生合成遺伝子クラスターを見 出した. 第4章では,機能未知の GPI-EPT 様酵素と P450 を含む akml, ciml クラスター を標的とした異種発現系の構築により, 天然物では報告例の少ないホスホエタノールア ミンおよびホスホコリンを側鎖に有する新規マクロライド天然物の取得に成功した.同 時に, 二次代謝物生産に関わるホスホエタノールアミン転移酵素とホスホコリン転移酵 素を初めて同定した、第5章では、その他異なる属の菌が有する推定マクロライド生合 成遺伝子クラスターにおいても、新規化合物を含むマクロライドの取得に成功した.以 上の結果より, ゲノムマイニングとバイオインフォマティクス解析に基づく生合成機能 の予測と、異種発現を用いた生合成経路の再構築により、生合成メカニズムを解明しな がら新規天然化合物を探索できることが示された.

第6章では,推定 brefeldin A 生合成遺伝子クラスターを用いた生合成研究により, HR-PKS と TE に加え P450 の機能を必要とする新たなマクロライド形成機構を明らか とし, brefeldin A の全生合成遺伝子を同定することに成功した.加えて, brefeldin A の 生合成に関わる TE が HR-PKS 上で P450 により変換された基質を認識してラクトン環 を形成することを示唆する結果を得た.以上の成果より,異種発現による天然物探索の 中で得られた生合成機構の知見を基盤とすることで、そこから派生した生合成システム を発見、解明できることが示された.

本研究では、推定マクロライド生合成遺伝子クラスターの機能予測に基づいた麹菌異 種発現系による再構築により、新規マクロライドの取得に成功した.本成果を得るにあ たり優れた異種ホストの麹菌から受けた恩恵は、これまでに数々の生合成研究や当研究 室での研究で示されている通りである<sup>36,41,43</sup>.他方で、本手法による天然物探索を進め る過程でいくつかの課題に直面した.一つ目は、推定生合成マシナリーに即さない遺伝 子クラスターが存在する点である.本研究では第2章で得られた知見を元に、HR-PKS と MhpC-TE によりマクロライド骨格が形成されるという仮説に基づいた天然物探索を 行うことで、第4章および第5章で記した成果を得た.一方で、第6章で証明した通 り、同じマクロライド天然物であっても HR-PKS と TE 以外の酵素機能を必要とする場 合があった.本論文に詳細は記載しなかったが、*Neonectria ramulariae* の有するクラス ターと *Beauveria bassiana* ゲノム上にコードされる推定 cephalosporolides 生合成遺伝子 クラスターの異種発現ではマクロライド化合物は生産されなかった (Figure 67). *N. ramulariae* のクラスター解析の結果、その HR-PKS と MhpC-TE は、fumagillin や atranone の側鎖形成に関わる酵素と系統的に比較的近かったことから、同様にテルペン骨格に



Figure 67. Neonectria ramulariae および Beauveria bassiana の有する生合成遺伝子クラス ターと麹菌異種発現により得られた化合物の構造.

対して炭素鎖を付加する機能をもつと推測された.しかし、そのクラスターの周辺には 天然物の母体骨格の構築に関わる遺伝子はコードされていなかった. このことから、こ のクラスターは離れた遺伝子座のクラスターと協働するなど、さまざまな理由が想像さ れるが、この結果をゲノム情報のみを用いた現在のバイオインフォマティクス解析技術 で予測することは困難である. また, cephalosporolides 生合成遺伝子クラスターにおい ては、5 つすべての遺伝子を導入した株であってもラクトン環を有さないエチルエステ ル体が生産された.予想産物である cephalosporolide B の構造からオレフィンの異性化 が必要であると推測されるが,その機能を担う酵素の同定には詳細な検討が必要である. 一方で, 第3章の系統樹解析において type C に含まれる, P450, SDR および β-lactamase 様酵素を共通してコードする3つのクラスターの異種発現にも取り組んだが,いずれの クラスターにおいても化合物の生産が認められなかった.遺伝子が不足しているのか, 導入した遺伝子が麹菌内で機能していないのか等の検証を要する.以上のように、同じ マクロライド化合物であっても共通する生合成メカニズムをもつとは限らず、また、そ れらのクラスターがすべて麹菌内で適切に機能する保証はない. そのため現時点では, 新規糸状菌マクロライドの取得を目指した組織的な大規模探索は困難である. ゲノムマ イニングにより見出した遺伝子資源を最大限活用するためには, 個々のクラスターを対 象にした試行錯誤の繰り返しによる生合成マシナリーの解明が引き続き必要とされる.

二つ目は、ゲノム DNA テンプレートに関する問題である.本手法では標的とした遺 伝子クラスターの異種発現系を構築する際に、遺伝子をクローニングするための DNA テンプレートが必要となる.そのため、ゲノムマイニングにより見出した 200 を超える 遺伝子クラスターの大半は、入手困難な菌種に含まれていることからゲノム DNA が入 手できず、探索を行うことができなかった.そこで現在、この課題を解決すべく Recombination Assembly-Replication Cycle Reaction (RA-RCR) 法を活用するゲノムテンプ レートに依存しない異種発現系の構築を検討している.RA-RCR とは、無細胞系での DNA 多断片連結反応 (RA) と長鎖環状 DNA の正確かつ高速な増幅反応 (RCR) を組み 合わせた長鎖 DNA 増幅技術である<sup>103</sup>.制限酵素処理した鎖状ベクターと人工遺伝子合 成により調達した標的遺伝子断片を用意し RA-RCR 法を適用することで,原理上,ゲ ノムテンプレートが手に入らない菌のクラスターであっても異種発現用ベクターを構 築可能である.検討段階ではあるが,現在,地衣類等のゲノム上にコードされる GPI-EPT 様酵素を有するクラスターを標的としたベクターの調製に取り組んでおり,人工遺 伝子合成時にエラーが複数見られるものの(1ヶ所/約1.4kbp),大腸菌にて増幅可能な 環状ベクターを得ることに成功している.今後,人工遺伝子合成精度の向上やコストの 低下により,信頼性のあるベクターが現実的な価格で調達可能となれば,ゲノムマイニ ングにより見出した全てのクラスターを対象に網羅的な天然物の探索が可能となる.そ のような天然物探索も遠くない将来,実現可能となる日が来るのではないだろうか.

麹菌異種発現系を基盤とする物質生産は、コンビナトリアル生合成による類縁体の創 出にも有用であることが実証されている<sup>36</sup>.本研究では*akml*および*ciml*クラスターの 遺伝子を活用し、ホスホエタノールアミン転移酵素が異なる環骨格に機能した新規マク ロライド化合物の創出に成功した.糸状菌マクロライド化合物は環のサイズや修飾様式 のわずかな違いによりその活性に顕著な違いが見受けられる.環構造と修飾パターンの 掛け合わせによる多様な非天然型マクロライド創生により、新たな活性化合物の発見に つながる事が期待される.バクテリアにおいても、大腸菌をホストに erythromycin の糖 鎖形成関わる遺伝子を4種の類縁体のものと組み合わせたコンビナトリアル生合成を 行うことで多様なアナログを創出し、本来の天然物より強力な抗菌活性を示す化合物の 取得にも成功している<sup>104</sup>.利用可能な糸状菌マクロライド骨格や修飾酵素の充実、およ び、修飾酵素の基質認識に関わる知見の集積は今後の大きな課題である.

ポストゲノム時代以降,糸状菌を含めた微生物の数多くの天然化合物の生合成研究の 成果により,生合成マシナリーに関する理解が大幅に進展した.また,微生物資源のゲ ノムデータベースが充実し,遺伝子機能の予測ツールが発達したことで,今では二次代 謝物生合成に関わる遺伝子情報を容易に入手可能となった.創薬研究における天然化合 物の重要性が再び注目されている現在において,遺伝子資源から狙った構造を有する天 然化合物群を直接かつ一挙に取得できる本手法は魅力的なツールのように思われる.今

97

後,本手法を含めた遺伝子資源を活用する天然物探索法の実用性が認知され,天然物創 薬の再興により新薬へとつながる化合物が発見されることを切に願う.

# 実験項

目次	99
実験器具・装置, 本研究で使用した糸状菌	101
異種発現に用いたホスト株, プラスミドベクター	102
糸状菌の培養に用いた寒天培地	103
Table S1. Reagents added to the media for selection and cultivation of <i>A. oryzae</i> transformants	104
糸状菌の培養に用いた液体培地	
大腸菌の培養に用いた培地	105
麹菌異種発現系の構築	106
形質転換株の培養と代謝物のHPLC分析, apmlAとapmlBのシーケンス解析	111
elbB <sup>c</sup> , elbC <sup>c</sup> およびelbE <sup>c</sup> のcDNAクローニング	112
組み換えElbB発現系の構築とIPTG濃度の検討	113
組み換えElbBの発現と精製	114
組み換えElbBを用いた <i>in vitro</i> 酵素反応	
elbA, elbB, elbCおよびelbEのcDNAシーケンス解析	115
Phaeospelide A (1) の単離	116
化合物3の合成と単離	
Figure S1. 化合物 <b>3</b> の 2 次元 NMR 相関	117
化合物4の合成と単離、化合物3のオゾン分解と還元処理	118
フラグメント16の合成と単離,標品 (S)-16と (R)-16の合成	119
VCD と IR スペクトル測定	
フラグメント5と7のTBDPS保護,化合物8と12の加溶媒分解	120
化合物 9 のアセトナイド保護と化合物 10 と 11 の単離	121
化合物 13 のアセトナイド保護と化合物 14 と 15 の単離	122

化合物 10 の (S)-および (R)-MTPA エステル体の合成	123
化合物 14 の (S)-および (R)-MTPA エステル体の合成	124
A. phaeospermum Kemushi-1の培養と代謝物分析	125
Akml-1-4 (17-20) の単離	126
Table S2. $^{13}$ C (125 MHz) and $^{1}$ H (500 MHz) NMR data for <b>20</b> and <b>26</b>	127
化合物 29 の合成	128
化合物 30a と 30b の合成	129
化合物 28 の合成, Ciml-1-4 (21-24) の単離	130
Ciakml-1 (25) の単離	131
Peml-1-4 ( <b>31-34</b> ) の単離	132
Table S3. $^{13}$ C (125 MHz) and $^{1}$ H (500 MHz) NMR data for <b>31-33</b>	133
Mpml-1 (35) の単離, Elb-1 (37) の単離	134
Elb-1 (37)の平面構造の解析, Figure S2. Elb-1 (37)の2次元 NMR 相関	135
Table S4. $^{13}$ C (125 MHz) and $^{1}$ H (500 MHz) NMR data for <b>37</b>	
Brefeldin C (38) の単離, Brefeldin A (39) の単離	136
Table S5. $^{13}$ C (125 MHz) and $^{1}$ H (500 MHz) NMR data for <b>38</b> and <b>39</b>	137
ElbB 酵素反応の基質の合成スキームの検討	138
化合物 43 と 44 の合成と単離	139
基質 SNAC 体 40 と化合物 45 の合成と単離	140
化合物 36 の合成と単離	141
Figure S3. AO-elbABFDC, elbABFDCE <sup>C</sup> を培養したときの培養培地と菌体成分の	
HPLC クロマトグラム	142
Table S6. Summary of <i>A. oryzae</i> transformants in this study	
Table S7. List of primers used for cloning of genes in this study	143
Table S8. List of primers used for cDNA sequencing in this study	144
ゲノムPCR	145
### 実験器具·装置

培養培地と菌体成分の分析および単離精製に用いた薄層クロマトグラフィー (TLC) には、TLCアルミプレート シリカゲル60 F254およびRP-18 F254 (Merck) を使用した.二 次代謝物の単離精製に用いたオープンカラムクロマトグラフィーには、シリカゲル60 (70-230および40-50 mesh), コスモシール140 C18-OPN (nacalai tesque)を使用した. NMR 装置には、Bruker AVANCE III 500 spectrometer (<sup>1</sup>H NMR, 500 MHz; <sup>13</sup>C NMR, 125 MHz), Bruker AVANCE III HD 800 spectrometer (<sup>1</sup>H NMR, 800 MHz; <sup>13</sup>C NMR, 200 MHz), Bruker AVANCE III HD 900 spectrometer (<sup>1</sup>H NMR, 900 MHz; <sup>13</sup>C NMR, 225 MHz) を用いた.<sup>1</sup>H と<sup>13</sup>C NMR スペクトル測定における化学シフトの内部標準には、CDCIa溶媒を使用した 際は、tetramethylsilane ( $\delta_{\rm H}$  0.00)と溶媒の残留シグナル ( $\delta_{\rm C}$  77.0)、MeODを使用した際は 溶媒の残留シグナル (δ<sub>H</sub>3.30,δ<sub>c</sub>49.0), DMSO-d<sub>6</sub>を使用した際は, 溶媒の残留シグナル溶 媒の残留シグナル (δ<sub>H</sub> 2.49, & 39.7)を用いた. 高分解能質量分析にはExactive Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo Fischer Scientific) を使用した. IR および VCD スペクトルの 測定には, JASCO FVS-6000 spectrometerを用いた. UV スペクトルの測定には, JASCO-V-730 spectrophotometerを使用した. 培養培地と菌体成分のHPLC分析には, JASCO AS-1555-10 Intelligent Sampler, JASCO PU-4180 RHPLC Pump, JASCO MD-4017 Photo Diode Array Detector (JASCO) および NQAD<sup>®</sup> (OSAKA SODA)を用いた.分析カラムには, COSMOSIL Packed Column 5C18-MS-II (*ϕ* 4.6 mm×150 mm) (nacalai tesque) を利用した. LC-MS 分析には, Chrommaster 5610 MS Detector (HITACHI, Ltd), a Chromaster 5110 Pump (HITACHI, Ltd) および Chromaster 5430 Diode Array Detector (HITACHI, Ltd) を用いた. 分析カラムには COSMOSIL Packed Column 5C18-MS-II (Ø 4.6 mm×150 mm) (nacalai tesque) を使用した.

## 本研究で使用した糸状菌

Arthrinium phaeospermum Kemushi-1 は東北大学青葉山キャンパスの敷地内で生息していたケムシ内部より,布木修士により単離された<sup>65</sup>.

101

*Cytospora* sp. は東北大学青葉山キャンパスの敷地内で生息していたガガンボ内部より, 布木修士により単離された<sup>65</sup>.

Hypoxylon fragiforme は東北大学青葉山キャンパスの敷地内で生息していたクモ内部 より、布木修士により単離された<sup>65</sup>.

*Eupenicillium ludwigii* MT-3 は以前当研究室において野生株に対して,化学変異原処 理とリボソーム標的薬剤への耐性化を指標とした選抜を行うことで作製した<sup>78</sup>.

Aspergillus kawachii NBRC 4308, Macrophomina phaseolina NBRC 7317, Penicillium expansum NBRC 5838は, Biological Resource Center, NITE (NBRC) より購入した.

Colletotrichum incanum MAFF237190 は, Ministry of Agriculture, Forestry Fisheries (MAFF) より購入した.

## 異種発現に用いたホスト株

*Aspergillus oryzae* NSAR1 (*niaD*<sup>-</sup>, *sC*<sup>-</sup>, Δ*argB*, *adeA*<sup>-</sup>)<sup>105</sup> および*Escherichia coli* BL21 (DE3) は、東京大学大学院薬学研究科 准教授 淡川孝義先生よりご提供頂いた.

A. oryzae NSAR1 は、糸状菌マクロライドの生合成遺伝子クラスターの異種発現のホスト株として用いた.

*E. coli* BL21 (DE3) (F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdSB* (rB<sup>-</sup>mB<sup>-</sup>), *gal*, *dcm*) は,組み換えタンパク質ElbBの 発現に用いた.

# プラスミドベクター

pUARA2 は東北大学大学院農学研究科教授 五味勝也先生よりご提供頂いた. pUAdeA2, pUPTRA2 およびpUSA2は以前,当研究室において塚田健人先生により作製 された<sup>36</sup>.

pUARA2, pUAdeA2, pUPTRA2 およびpUSA2 は*A.oryzae*由来の*α*-amylaseプロモーター (*amyB*) と栄養要求性のマーカーである*argB*, *adeA*, *ptrA*あるいは*sC*をそれぞれコードしている.

#### 糸状菌の培養に用いた寒天培地

#### •PDB 寒天培地

Potato-Dextrose Broth (DIFCO) 7.2 g とagarose (Nacalai tesque) 4.5 g を300 mL の蒸留水 に懸濁し, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行なった. 20 mLごとに滅菌済みのシャ ーレに分注し,室温で冷却した.この培地は*A. oryzae* NSAR1以外のすべての糸状菌の培 養に用いた.

### • PDB 寒天培地 (adenine 0.05%, arginine 0.1%)

Potato-Dextrose Broth (DIFCO) 7.2 gとagarose (Nacalai tesque) 4.5 g, adenine (TCI) 0.15 g, L-arginine (Wako) を300 mL の蒸留水に懸濁し, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行なった. 20 mLごとに滅菌済みのシャーレに分注し,室温で冷却した.この培地はA. oryzae NSAR1の培養に用いた.

## •CD 寒天培地 (NaCl 0.8 M)

Czapek-Dox Broth (Difco) 10.5 g, NaCl (Nacalai tesque) 14 g, agarose (Nacalai tesque) 4.5 g を300 mL の蒸留水に懸濁し, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行なった. 20 mLご とに滅菌済みのシャーレに分注し,室温で冷却した.この培地は*A. oryzae* NSAR1をホス トとして作製した形質転換株の培養に用いた.プラスミドベクターを保有している形質 転換株の選抜と培養する際には,Table S1に示すように試薬を添加した.

Reagents	Final cont.	Amount of reagents
L-arginine	0.1%	100 mg/100 mL medium
		before autoclave
adenine	0.01%	10 mg/100 mL medium
		before autoclave
L-methionine	0.15%	150 mg/100 mL medium
		before autoclave
pyrithiamine	0.1 µg/mL	100 µg (0.1 mg/mL)/100 mL medium
		after autoclave
ammonium sulfate	0.05%	50 mg/100 mL medium
		before autoclave

Table S1. Reagents added to the media for selection and cultivation of A. oryzae transformants.

## 糸状菌の培養に用いた液体培地

# •CC 液体培地

Czapek-Dox Broth (Difco) 2.1 g, Casamino Acids (Difco) 0.3 g を60 mL の蒸留水に懸濁 した後に, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行い,室温で冷却した.この培地はA. oryzae NSAR1とその形質転換株の前培養に用いた.

## •CPS 液体培地

Czapek-Dox Broth (Difco) 1.05 (2.63) g, peptone\* 0.3 (0.75) g, Soluble Starch (Nacalai tesque) 0.6 (1.5) g, Maltose Monohydrate (Nacalai tesque) 0.3 (0.75) g を 150 (60) mL の蒸留水に懸 濁した後に, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行い, 室温で冷却した. この培地は *A. oryzae* NSAR1 形質転換株と*A. phaeospermum* Kemushi-1の培養に用いた. \*peptone: 0.2 (0.5) g soy peptone, 0.2 (0.5) g casein peptone および 0.2 (0.5) g meat peptone (Nacalai tesque) の混合物.

#### •MYG 液体培地 (NaCl 3%)

Bacto Peptone (Difco) 0.06 g, Bacto Malt Extract (Difco) 1.2 g, D-(+)-glucose (Nacalai tesque) 1.2 g, agarose (Nacalai tesque) 0.9 g, NaCl (Nacalai tesque) 1.8 g を60 mL の蒸留水に懸濁した後に, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行い,室温で冷却した.この培地はA. phaeospermum Kemushi-1の培養に用いた.

## •PDB 液体培地

Potato-Dextrose Broth (Difco) 1.44 g, maltose 0.6 g を60 mL の蒸留水に懸濁した後に, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行い, 室温で冷却した. この培地はA. phaeospermum Kemushi-1の培養に用いた.

#### 大腸菌の培養に用いた培地

### •LB 寒天培地

LB Miller (Nacalai tesque) 5 g, agarose (Nacalai tesque) を200 mL の蒸留水に懸濁し, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行なった. 50°Cで保温し, ampicillin (最終濃度200 µg/mL) を添加した後に20 mLごとに滅菌済みのシャーレに分注し, 室温で冷却した.

## •LB 液体培地

LB Miller (Nacalai tesque) 5 g, agarose (Nacalai tesque) を60 mL の蒸留水に懸濁し, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行った. 室温で冷却した後に, ampicillin (最終濃度 100 µg/mL) を添加した.

## •TB 液体培地

Tryptone (Bacto) 10 g, Yeast Extract (OXOID) 12 g, Glycerol (Sigma) 2 mL を450mL の蒸 留水に懸濁し, 121°Cで20分間オートクレーブ滅菌を行った. 室温で冷却した後に, 50 mLのリン酸バッファー (0.17 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.72 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) を添加した.

#### 麹菌異種発現系の構築

# 遺伝子クローニングの基本手順

すべての遺伝子はPrimeSTAR<sup>®</sup> MAX DNA Polymerase (TAKARA) とTable S7に示した 遺伝子特異的プライマーを用いてPCR反応により増幅を行なった. 増幅したDNAフラグ ンメントはQIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精製し, In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit (TAKARA)の操作手順に従い各種ベクターに組み込んだ. 1 µLのIn-Fusion 反応液を1.5 mLのエッペンチューブ内の10 µLの*E. coli* DH5 $\alpha$ の懸濁液に添加し,氷上で 10 min静置した後に,40°Cで45 sインキュベートした. 直ちに200 µLのLB液体培地を添 加し,マイクロピペットを用いてピペッティングにより攪拌した. その懸濁液をLB寒 天培地 (100 µg/mL ampicillin) に塗布し,37°Cで16 hインキュベートした. 生育したコロ ニーに対してPCRを行い,ベクターの導入を確認した後に,2 mL LB液体培地 (50 µg/mL ampicillin)を用いて,15 mL遠沈管内で37°C,160 rpmで16 h培養を行った.得ら れた培養菌体よりGenElute<sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich)の操作手順に従いプ ラスミドを抽出,精製した.得られたプラスミドベクターは,遺伝子特異的プライマー を用いてPCR反応を行い,目的遺伝子の導入を確認した.過剰発現ベクターには, pUARA2, pUAdeA2, pUPTRA2 あるいは pUSA2を用いた.作製したベクターのクロー ニングには大腸菌*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ をホストとして用いた.

各遺伝子は遺伝子特異的プライマー (Table S7) を用いてPCR法 (98°C; 1 min, (98°C; 1 min, 55-65°C; 5-15 s, 72°C; 10-30 s/kb) x 40 cycles, 72°C; 7 min then cooled at 10°C) により増幅を行なった.

### • apml cluster

長鎖の*apmlA*は同程度サイズの2フラグメントとして増幅した. プライマーには *apmlA\_*IFpUKpnI-FWと*apmlA\_*R1, あるいは, *apmlA\_*F1と*apmlA\_*IFpUKpnI-RVのプライ マーを用いた. ゲノムテンプレートには*Arthrinium phaeospermum* Kemushi-1より抽出し たゲノムDNAを使用した. *apmlB*の増幅には*apmlB\_*IFpUNotI-FWと*apmlB\_*IFpUNotI-RV のプライマーを用いた.それぞれのPCR産物は上述の通りクローニングを行なった.得 られた*apmlA*フラグメントは制限酵素Asp718の処理を行ったpUARA2にクローニングを 行い,pUARA2-*apmlA*を得た.*apmlB*フラグメントは制限酵素NotIの処理を行った pUAdeA2にクローニングを行い,pUAdeA2-*apmlB*を作製した.*apmlA*と*apmlB*の両遺伝 子をAsp718とNotIにて処理したpUARA2にクローニングを行いpUARA2-*apmlAB*を得た.

*A. oryzae* NSAR1に対してpUARA2-*apmlAB*あるいはpUARA2-*apmlA*を形質転換することでそれぞれAO-*apmlAB*, AO-*apmlA*を作製した. 選択培地には, アデニンとメチオニンを添加したCD寒天培地を使用した. AO-*apmlA*に対してpUAdeA2-*apmlB* を形質転換することでAO-*apmlA*+*apmlB*を作製した. 選択培地には, メチオニンを添加したCD寒天培地を使用した.

#### • akml cluster

長鎖のakmlAは同程度サイズの2フラグメントとして増幅した.プライマーには akmlA\_IFpUKpnI-FWとakmlA\_R1,あるいは,akmlA\_F1とakmlA\_IFpUKpnI-RVのプライマ ーを用いた.akmlBの増幅にはakmlB\_IFpUNotI-FWおよびakmlB\_IFpUNotI-RVのプライマ ーを使用した.akmlCの増幅にはakmlC\_IFpUKpnI-FWとakmlC\_IFpUKpnI-RVのプライマ ーを用いた.akmlDの増幅にはakmlD\_IFpUNotI-FWおよびakmlD\_IFpUNotI-RVゲノムテ ンプレートにはAspergillus kawachii NBRC 4308より抽出したゲノムDNAを使用した.そ れぞれのPCR産物は上述の通りクローニングを行なった.精製したakmlAとakmlBの両遺 伝子をAsp718とNotIにて処理したpUARA2にクローニングを行いpUARA2-akmlABを得 た.akmlAおよび/あるいはakmlBをAsp718および/あるいはNotI処理したpUAdeA2にクロ ーニングし,pUAdeA2-akmlC,akmlDおよびakmlCDを得た.

*A. oryzae* NSAR1に対してpUARA2-*akmlAB*を形質転換することでAO-*akmlAB*を作製した.選択培地には,アデニンとメチオニンを添加したCD寒天培地を使用した.AO-*akmlAB*に対してpUAdeA2-*akmlC*, *akmlD*, あるいは*akmlCD*を形質転換することでAO-*akmlABC*, *D*および*CD*を作製した.選択培地には,メチオニンを添加したCD寒天培地を使用した.

#### ciml cluster

長鎖のcimlAは同程度サイズの2フラグメントとして増幅した.プライマーには cimlA\_IFpUKpnI-FWとcimlA\_R1,あるいは, cimlA\_F1とcimlA\_IFpUKpnI-RVのプライマ ーを用いた.cimlBの増幅にはcimlB\_IFpUNotI-FWおよびcimlB\_IFpUNotI-RVのプライマ ーを使用した.cimlCの増幅にはcimlC\_IFpUKpnI-FWとcimlC\_IFpUKpnI-RVのプライマー を用いた.cimlDの増幅にはcimlD\_IFpUNotI-FWおよびcimlD\_IFpUNotI-RVを使用した. ゲノムテンプレートにはColletotrichum incanum MAFF237190より抽出したゲノムDNA を使用した.それぞれのPCR産物は上述の通りクローニングを行なった.精製したcimlA とcimlBの両遺伝子をAsp718とNotIにて処理したpUARA2にクローニングを行い pUARA2-cimlABを得た.cimlCおよび/あるいはcimlDをAsp718および/あるいはNotI処理 したpUAdeA2にクローニングし, pUAdeA2-cimlC, cimlDおよびcimlCDを得た.

*A. oryzae* NSAR1に対してpUARA2-*cimlAB*を形質転換することでAO-*cimlAB*を作製した.選択培地には,アデニンとメチオニンを添加したCD寒天培地を使用した.AO-*cimlAB* に対してpUAdeA2-*cimlC*, *cimlD*, あるいは*cimlCD*を形質転換することでAO-*cimlABC*, D およびCDを作製した.選択培地には,メチオニンを添加したCD寒天培地を使用した. •*peml* cluster

長鎖のpemlAは同程度サイズの2フラグメントとして増幅した.プライマーには pemlA\_IFpUKpnI-FWとpemlA\_R1,あるいは,pemlA\_F1とpemlA\_IFpUKpnI-RVのプライマ ーを用いた.pemlBの増幅にはpemlB\_IFpUNotI-FWおよびpemlB\_IFpUNotI-RVのプライマ ーを使用した.pemlCの増幅にはpemlC\_IFpUNotI-FWとpemlC\_IFpUNotI-RVのプライマ ーを用いた.pemlDの増幅にはpemlD\_IFpUKpnI-FWおよびpemlD\_IFpUKpnI-RVを使用し た.pemlEの増幅にはpemlE\_IFpUKpnI-FWおよびpemlE\_IFpUKpnI-RVを使用した.ゲノ ムテンプレートにはPenicillium expansum IFM 47478より抽出したゲノムDNAを使用した. それぞれのPCR産物は上述の通りクローニングを行なった.精製したpemlAとpemlBの両 遺伝子をAsp718とNotIにて処理したpUARA2にクローニングを行いpUARA2-pemlABを 得た.pemlCおよび/あるいはpemlDをAsp718および/あるいはNotI処理したpUAdeA2にク ローニングし, pUAdeA2-*pemlCD, C, Dを*得た. *pemlE*をAsp718処理したpUPTRA2にクロ ーニングし, pUPTRA2-*pemlE*を得た. *pemlC*および/あるいは*pemlF*をAsp718および/ある いはNotI処理したpUSA2にクローニングすることで, pUSA2-*pemlC, CF*を作製した.

A. oryzae NSAR1に対してpUARA2-pemlABを形質転換することでAO-pemlABを作製した. 選択培地には,アデニンとメチオニンを添加したCD寒天培地を使用した. AOpemlABに対してpUAdeA2-pemlCDあるいはpUPTRA2-pemlEを形質転換することでAOpemlABCD, pemlABEを作製した. 選択培地には,それぞれメチオニン,あるいは,アデ ニンとメチオニン,ピリチアミンを添加したCD寒天培地を使用した.また,AO-pemlABE に対してpUAdeA2-pemlCD, C, D を導入しAO-pemlABECD, ABEC, ABEDを取得した. 選 択培地には,メチオニンとピリチアミンを添加したCD寒天培地を使用した. AOpemlABEDに対してpUSA2-pemlCF, Cを導入することで,AO-pemlABEDCF, ABEDCを作 製した. 選択培地には,ピリチアミンと硫酸アンモニウムを添加したCD寒天培地を使 用した.

### • mpml cluster

長鎖の*mpmlA*は同程度サイズの2フラグメントとして増幅した. プライマーには *mpmlA\_*IFpUKpnI-FWと*mpmlA\_*R1, あるいは, *mpmlA\_*F1と*mpmlA\_*IFpUKpnI-RVのプライ マーを用いた. *mpmlB*の増幅には*mpmlB\_*IFpUNotI-FWおよび*mpmlB\_*IFpUNotI-RVのプラ イマーを使用した. ゲノムテンプレートには*Macrophomina phaseolina* NBRC 7317より抽 出したゲノムDNAを使用した. それぞれのPCR産物は上述の通りクローニングを行なっ た. 精製した*mpmlAとmpmlB*の両遺伝子をAsp718とNotIにて処理したpUARA2にクロー ニングを行いpUARA2-*mpmlAB*を作製した.

*A. oryzae* NSAR1に対してpUARA2-*mpmlAB*を形質転換することでAO-*mpmlAB*を作製した. 選択培地には、アデニンとメチオニンを添加したCD寒天培地を使用した.

# elb cluster

長鎖の*elbA*は同程度サイズの2フラグメントとして増幅した. プライマーには *pemlA\_*IFpUKpnI-FWと*elbA\_*R1, あるいは, *elbA\_*F1と*elbA\_*IFpUKpnI-RVのプライマーを 用いた. *elbB*の増幅には*elbB*\_IFpUNotI-FWおよび*elbB*\_IFpUNotI-RVのプライマーを使用 した. *elbC/C*の増幅には*elbC*\_IFpUKpnI-FWと*elbC*\_IFpUKpnI-RVのプライマーを用いた. *elbD*の増幅には*elbD*\_IFpUKpnI-FWおよび*elbD*\_IFpUKpnI-RVを使用した. *elbE*の増幅に は*elbE/E*\_IFpUNotI-FW および*elbE*\_IFpUNotI-RVを使用した. *elbF*の増幅には *elbF*\_IFpUNotI-FW および*elbF*\_IFpUNotI-RVを使用した. *elbF*の増幅には *elbF*\_IFpUNotI-FW および*elbF*\_IFpUNotI-RVを使用した. *elbC*, *elbE*の増幅には *eDNAライブラリーを*用いた. それぞれのPCR産物は上述の通りクローニングを行なっ た. 精製した*elbA*と*elbB*の両遺伝子をAsp718とNotIにて処理したpUARA2にクローニン グを行いpUARA2-*elbA*を得た. また, *elbC*および/あるいは*elbF*をAsp718および/あるい はNotI処理したpUAdeA2にクローニングし, pUAdeA2-*elbCF*, *C*, *F*を得た. 加えて, *elbD* および/あるいは*elbE*をAsp718および/あるいはNotI処理したpUARA2にクローニングし, pUAdeA2-*elbDE*, *D*, *E*を得た. また, *elbC*をKpnI処理したpUPTRA2にクローニングし, pUPTRA2-*elbC*を得た. また, *elbC*をkpnI恐理したpUAdeA2にクローニングし,

A. oryzae NSAR1に対してpUARA2-elbABを形質転換することでAO-elbABを作製した. 選択培地には、アデニンとメチオニンを添加したCD寒天培地を使用した. AO-elbABに 対してpUAdeA2-elbCF, C, FあるいはpUPTRA2-elbDEを形質転換することでAOelbABCF,ABDE, ABC, ABFを作製した. 選択培地には、それぞれメチオニン、あるいは、 アデニンとメチオニン、ピリチアミンを添加したCD寒天培地を使用した. また、AOelbABFに対してpUPTRA2-elbDE, D, Eを導入し AO-elbABFDE, ABFD, ABFEを取得した. 選択培地には、メチオニンとピリチアミンを添加したCD寒天培地を使用した. AOelbABFDに対してpUSA2-elbC, CEを導入することで、AO-elbABFDC, ABFDCEを作製 した. 選択培地には、ピリチアミンと硫酸アンモニウムを添加したCD寒天培地を使用 した.

110

#### 形質転換株の培養と代謝物のHPLC分析

セレクション培地上で培養した形質転換株をCPS液体培地 (0.01% アデニン) へ播種 し、30°C、150 rpmで5-7日間培養を行なった。培養開始から3日と5-7日時点の培養培地 3 mLを5 mLチューブへ回収し、2 mLのEtOAcで抽出を行なった. EtOAc層 800 µLを1.5 mLへ回収後,遠心エバポレーターを用いて溶媒を留去した (x2). そのEtOAc抽出物を 100 µL MeOHに再溶解し, 室温, 13,500 rpmで15 min遠心分離を行なった後に100 µL の 上清を1.5 mLエッペンチューブに回収し、10 µLをHPLCヘインジェクションした. 培養 開始から5-7日時点で回収した培養菌体は、凍結乾燥を行なった後に、1.5mLエッペンチ ューブに回収した40 mgの粉砕した乾燥菌体を1 mL MeOHにて30 min抽出した.室温, 13,500 rpmで15 min遠心分離後, 500 μLの上清を新しい1.5 mLエッペンチューブに回収 し、遠心エバポレーターを用いて溶媒を留去した.そのMeOH抽出物に対して400 µLの H<sub>2</sub>Oと400 μLのEtOAcを加えて分液を行い, 300 μLのEtOAc層を新しい1.5 mLエッペンチ ューブに移し,遠心エバポレーターを用いて溶媒を留去した.続いて,100 μL MeOHに 再溶解し, 室温, 13,500 rpmで15 min遠心分離を行なった後に100 μL の上清を1.5 mLエ ッペンチューブに回収し, 10 μLをHPLCヘインジェクションした. HPLCの分析条件: 流 速; 1 mL/min, 溶媒系: acetonitrile: H<sub>2</sub>O (0.01% TFA) = (0-2 min: 20:80, 2-12 min: 20:80 to 100:0,12-24 min: 100:0). 検出波長200-400 nm.

### apmlAとapmlBのシーケンス解析

AO-*apmlAB*を60 mLのCPS液体培地を用いて培養し、培養開始から4日目の時点で回収 した培養菌体より、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を用いてRNAを抽出した.得られ た RNA 溶 液 に 対 し て DNase を 添 加 し 37°C で 1 h イ ン キュ ベート し た 後 に , phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)を用いてRNAを抽出後、エタノール沈殿を行 なった. 逆転写反応にはSuperscript<sup>®</sup> IV (Thermo Fischer Scientific)とオリゴ (dT) プライ マーを用いた.得られたcDNAライブラリーをテンプレートに、Table S7で示した遺伝子 特異的プライマーを用いて増幅し, QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いて精

製した後に, Table S8に示したプライマーを用いてシーケンス解析を行なった.

# アミノ酸配列

### ApmlA (accession number: P0CU84)

MSDHNHTNGTTNGNGIGSNGVQSHVPNGAHINGTSSGLKPNGISNGTTNGINGHAPSTAATQTPVAVVGLACRLPGKS NSPEALWKFLLDGGVADPTPPDHRYNFSTHYDGSQRPGTMPSPGGMLLRDVDLTAFDASFFNIGHAEAAVMDPQQRQL LEVTYECLENSGVPLGKLRGTRAGCVVANNAVEYEGFATHDREDNVSGGSTGFSRSILSNRISHYLDIQGPSISIDTA  $\tt CSGTLVGVDLACRYLQTNQADGMLVGGALLYLDPSALQDTGPMKGAFSPTGQCHTFDADADGYIRGEAISCVYLKRLD$ DAIRDGDPIRAVIRGSATNSDGNTTSLTQPSSAAQAAAIRMAYSNAGISDFNETGYLECHGTGTPTGDPLEVAGLASV FAPTRPAEKPLIIGSIKSNVGHSESAAGLSGLIKTVLTVERGVIPGTPTFIKPTPRIDFDKSRVRPSRRTIRWPQSAS  ${\tt GLRRASVNSFGFGGTNAHVVLEARDSMIKDPSVRKGFVFSNHGSSLFGLDADLEAGSERPYILALSANDKDALETNIQ}$ TLSTHLGDPAVGVKLSDVAYTLSERRTHHFHRGFVIADSLEISSDSMILGKKKAQPPRVAFIFTGQGAQWSQMGRDLI ESFPLAKATIQKLDAALQTLPNPPQWSLVDELCEAREGAVLRLPEFSQPLVTALQIAQLTVLSHWGISATRVLGHSSG EIAAAVAAGLVRPEEAIKIAYLRGLAAKFHQPDQPLGMLAVGVSAEAVAPYLETEPTVQIACFNSPTSLTLSGQQPDL VRVCDRLKADGHFARMLQVNLAYHSEHIRSIAEEYHSLLKEQVPGAAGSSGNKKVTMFSSVTGKPISEAYDALGPDYW RQNMVSPVRFAQAASNMLSGPESSEFLIEIGPAGALAGPVAQVIKAAPSARNTQYVAAAKRGADTLLALYETAGKLWA NSGVVDLAKVNGYDGQANLVVDLPNYQWNHSRRYWRESLSASEFLQRPFLSHDLLGSKILSVPWHNPTFYQVIELSDV PWLRDHKIGDQVIFPAAGYLSMAVEAIHQTTVMTQWREKGVPKSFAYCLKDVRFLRSLVLEEDVRAKISLALIPLHAS PRRWYNFRVRSLMEGVWVDHCDGLVRIDEEAFDTTAPSRALEPLAHPEPGAVGYKSANAGEFSFGPAFQRIEYFDWIW  ${\tt GSPETRAQVTTEYPVSAYSKQSEYPVHPVAMDCLLQLTGYSIAQMQMNALDDINCVPVGIEGIVIPSRSNPPAKSCMV}$ RSVAHLLDSSTSQTYGSRFASAGLYDPEDRSLVMEIKRIRFDPISSRGDQSEHVYMHFGWNADVSLTDAEGLNSYLAA AAGSPEEKDLVAVATPEEQKNDESRSSPFALVQRLLDALAHRRPEMAVLEANLDSDDSTCLWLDLPSKSNNSGPRSGY SKFHCVSKDPKALSHLQETHNEAPRTTWDLVDMAHPSGRIDSTDKFDLILVKSSDPETTFTTPALLSNIVASVSEGGM VILLNTQGKPTVFHDASQALEASGLCRTKDLSASVGGLAIVATARRVGPAATTASGDKVITCFRLTDDDGPSNVLAGL KDAGWAVNTCSDADALAHRSNILVVDELFTTVASRVTAEQWKMLQTIIRKECNVLWVTKGGQMEVTEPDRAAAPGLLR TIRSEELGIRLISLDVENPTGPRTLYAIEECLRLLQESHAGIQKDSEFVERGGVIFTPRLLADPALNAAKHEPVNGRK PQMESLQDKKTPVCLGVERVGTIDSLHYAERSPTPLPIKDGYIEIEIHAAGVNFKDLALTLGIVNSNDPFTLGGEAAG VVSRIGKGVPGDRFVAGQRVVAMFPGSFGNRIQVPWQVAHAIPDRLSFEEAATLPVAFLTAMHGLFDLGNLQAGQRVL IHSATGGTGSAAVQLCQHMGAEIFATAGTEEKRRFLQDIYNIPADHIFSSRTTDFEHQIMRLTGGLGVDVILNSLTGD LLEASWNIIAHGGTMVEIGKKDIMEHSRLSMEPFSRSASFRALDLSLDTADLYGKGAGLGOTVGRLFERLFSLLERGH VRPITPMQTFAFGQVTDALALMRSTKHMGKLVLSRGPDSNDQVAIRPAQRLVRFRPDATYLLVGGLKGICGSLAVDFA KKGAKHLAALSRSNYDDPQSQIVLRQLKDLDCQIDLLRGDITKVEDVRRVFAETTVPVAGIIQGAMVLRDRPFANMTV EEYHAAAACKIQGTWNLHNCAQEAQAPLDFFTILSSISSVLGNPAQGNYASGCSFQDAFSSYRQELGLPASTVNLGII  ${\tt EQIGYMARNEDLLEKNVSSEVAKGINERLLCKIIGYSILQQSGSPVSEDPYSRARMVTGLTMPQPPDSMLRLDARFAA}$ LFVRDGSSSNTQAGGSGAASQDVSQEIKELNLLLRSKSARAANLPQVVDATLAVVSGYLVRAMRLSEAIEPERSLSAY GIDSLAAVEFRNWLRLELGAAMSVIDITTAPSLLFLAEKIITKVDGVE

### ApmlB (accession number: P0CU85)

MGLSEKVEFKTLDGLVLRGFLYSARAKGPAIVMTPGFNFPVSLLYHEVALGFQAAGITALVYDPRSVGRS DGLPRSDINPAKQSEDFSDAITFLKTKPVVDPKRIALWGYSLSAAAALMAAGLDPRVKLVVAVCPAPVPY NFEAPGKRRKYLDLAIRDRESQARGKEPFYVQYIGDSEETALFDYRKQRGMEELEYDEVVENLTKIAPGF RNEVTIQTLRRLGSWSFADVPQRVGPTPVLQVFAVHEELEHIRKTQEAIWAGLTGPKERHTEDRGHMDVL TPDGHRFAHLVKVQVDFVLKNFAQRMR

# elbB<sup>c</sup>, elbC<sup>c</sup>およびelbE<sup>c</sup>のcDNAクローニング

E. ludwigii MT-3を60 mLのPDB液体培地を用いて培養し、培養開始から4日目の時点で

回収した培養菌体より, RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した.得

られたRNA溶液に対してDNaseを添加し37℃で1hインキュベートした後に, phenol/chloroform/isoamyl alcohol (25:24:1)を用いてRNAを抽出後,エタノール沈殿を行 なった.逆転写反応にはSuperscript<sup>®</sup> IV (Thermo Fischer Scientific)とオリゴ (dT) プライ マーを用いた.得られたcDNAライブラリーをテンプレートに,Table S7で示した遺伝子 特異的プライマーを用いて増幅し,QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて精 製した. *elbB*<sup>c</sup>は制限酵素のNdeIとEcoRIで処理したpET28a (+) にクローニングした. *elbC*<sup>c</sup>と*elbE*<sup>c</sup>は制限酵素のKpnIとNotIで処理したpUSA2にクローニングした.それら cDNA (*elbB<sup>c</sup>*, *elbC<sup>c</sup>*, *elbE<sup>c</sup>*)はTable S8に記載したシーケンス用プライマーを用いてシー ケンス解析を行なった.

## 組み換えElbB発現系の構築とIPTG濃度の検討

N末端にHisタグをもつ組み換えElbBの発現ベクターを作製するために, *elbBの*cDNA をpET28a (+) のNdel-EcoRI間にクローニングし, pET28-*elbB*を得た. pET28\_*elbB*をヒー トショック法により*E. coli* BL21 (DE3) に形質転換し, *E. coli* BL21 (DE3)\_*elbB*を作製し た. *E. coli* BL21 (DE3)\_*elbB*を3 mLのTB培地 (30 µg/mL カナマイシン) で16h 培養した 後, 300 µLの培養液を30 mLのTB培地 (50 µg/mL カナマイシン) に播種し (100倍希釈), 37°C, 120 rpmでOD<sub>600</sub>が0.6になるまで培養した. 次に, タンパク質の発現誘導のために 最終濃度0.05, 0.1, 0.4 または1 mMのisopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加し, 16°C, 120 rpmで20 hインキュベートした. 培養培地を50 mL遠沈管に回収した後に6,000 gで遠心分離し, 培養上清を除いた後に-30°Cで冷凍保存した. その菌体に氷上で溶菌溶 液 (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 300 mM NaCl, 5% glycerol, 5 mM imidazole) と0.4% (*v*/*v*) phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail (Merck) を加え懸濁した 後に, 菌体の超音波破砕 (30 s x 5) を行なった. 一部を1.5 mLエッペンチューブへ移し た後に, 4°C, 15,000 gで30 min 遠心分離を行い, その上清と菌体ペレットを分離した後 に, それぞれにローディングバッファーを添加しSDS-PAGEを行なった.

#### 組み換えElbBの発現と精製

*E. coli* BL21 (DE3)\_*elbB*を3 mLのTB培地 (30 µg/mL カナマイシン) で16 h培養した後, 1.5 mLの培養液を150 mLのTB培地 (50 µg/mL カナマイシン) に播種し (100倍希釈), 37°C, 120 rpmでOD<sub>600</sub>が0.6になるまで培養した.次に,タンパク質の発現誘導のために 最終濃度0.1 mMのIPTGを添加し,16°C,120 rpmで18 hインキュベートした.培養培地 を50 mL遠沈管に回収した後に6,000 gで遠心分離し,培養上清を除いた後に-30°Cで冷凍 保存した.その菌体に氷上で溶菌溶液と0.4% (*v/v*) PMSF, protease inhibitor cocktail (Merck) を加え懸濁した後に,菌体の超音波破砕 (1 min x8) を行なった.上清をNiカラムクロマ トグラフィーに付し, binding buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8.0), wash buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 5 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) を用いて洗浄し,組み換えElbB はelution buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 500 mM NaCl, 250 mM imidazole, pH 8.0) を用いて溶出した. Amicon 10,000 NMWLを用いて溶出 溶液のPBS緩衝液への置換と濃縮を行なった. ElbB溶液は液体窒素を用いて瞬間冷凍し た後,-78°Cで冷凍保存した.タンパク質濃度はBradford法により決定した.培地1L当た り約52.7 mgの精製タンパク質が得られた.

#### 組み換えElbBを用いたin vitro酵素反応

組み換えElbBを用いた酵素アッセイは、50/100 mMリン酸緩衝液 (pH7.4)、または10 mM Tris-HCl 緩衝液中で10 μM ElbBあるいは加熱処理 (70°C, 10 min) により不活化したElbBを用いた.反応基質濃度はいずれも0.2-0.4 mM (1% v/v DMSO) とした.反応溶液は室温で1.5 hインキュベートした後に、EtOAcで抽出し (x2)、遠心エバポレーターにより溶媒を留去した.濃縮サンプルを100 μL MeOHで再溶解し、13,500 rpmで10 min遠心分離した10 μLの上清をHPLCにインジェクションした. HPLCの分析条件: 流速; 1 mL/min、溶媒系: acetonitrile: H<sub>2</sub>O (0.01% TFA) = (0-2 min: 20:80, 2-12 min: 20:80 to 100: 0, 12-24 min: 100:0).検出波長200-400 nm.

## elbA, elbB, elbC およびelbEのcDNAシーケンス解析

*elbA*, *elbB*, *elbC* および*elbE*のcDNAを得るために,先述の*E. ludwigii* MT-3のcDNAライ ブラリーをテンプレートに, Table S7に記載した遺伝子特異的プライマーを用いてPCR 反応を行なった. 精製したRT-PCR産物はTable S8に記したプライマーを用いてシーケン ス解析を行なった.

## ElbA, B, CおよびEのアミノ酸配列

#### ElbA

MAPYNSRDGISQSSRAFIQEPIAVVGIACRLPGHSSTPKKLWDFLERGGIAANDTPSTRFNLAAHYDGSKKPKTMRTP GGMFIEDADPRDFDAGFFGISGADAAAMDPOOROLMEVVYECLENSGVPFEKLYGAOVACHVGSYAVDYDAIOARDPE DRAPGAVVGIGRAMLSNRISHFFNFKGPSMTIDTACSGSLVGLDVACRYLHTGEVDGAIIGGANMYFSPEHNLNTGAM SVANSLSGRCHTFDVKADGYCKAEAINCVYLKRLSDAVRDGDPIRAVIRGSATNSDGNTPGIASPNSAAQAAAIRSAY ANAGITNLNDTSYLEFHGTGTQAGDPLEAGGVASVFSESRKPEAPLYIGSVKSNIGHSEPAAGISGLIKAILSIEKDL IPGNPTFITPTPKIDFEGLKLQPSRANRRWPAAPFKRASVNSFGYGGSNAHVIVEDPKVLLPDMESTYVSSYQSETDL FADDDEVSAGRLQLLVLSANDEASLRANATTLKNHLTNPNVKISLEDLSHTLSERRSHHFHRGYLITDKASIDESTLV  ${\tt TGKKSTNEPRVGFIFTGQGAQWPQMGKAIIDTFHEARAVVVELDEFLQSSSLPPSWSLLGELTEPREAEHLRKPEFSQ}$ PLVTALQIALFDILKRWGISPRAVVGHSSGEIAAAYAAGLLSKKAAIRAAYYRGQAAALVEQGSEDQHQQAFGMMATG IGAEGITPYLQGVGQSVQIACYNSPSSLTLSGTVDALAKVQKQLSEDSVFARMLQVNLAYHSTFMQEISHGYTDLLNK DFEHLPFKQGAVRMFSSVTGEQLAGPTDSDYWKSNMVCPVRFDAALSNMLTSSDAPDFLIELGPAGALKGPTSQVLKS LQGVKAQYTSVMTRGAADMQSIFGVAGSLYVAGGKLDLGQVNKIDGIKPKVVIDLPNYSWNHSTKYWYESESSKDWRN RLFPPHDLLGSKVLGSPWRSPAFMRSLNVQDLPWIADHKMGPDTVFPATGYISMAIEAIYQRSEALHILEGEKKVKTP RYRLRDVQFKKALVLPDNQSTRMSLTLSAYTGVGDWFEFKVSSLAGTTWTEHVRGLIRIDEDVPQVASAEETKPLSHP VDASLWHKSMLDAGYSFGPKFLKQLQIEARPGSRTSRSILGLEVPESKYPQSEYPMHPAAMDGCFQTCAPSLWKGNRH AVNAVLVPAMIDSLTITSSKADRGLSLTSAAYVGLGRPTDNRNFMSDASVYDPETGNLLLRLSGLRYTRIDTGPSVYD  $\label{eq:ahtfsalvskpdlsllssqglerlaereqglndtsfgvateliklaahkkpaqrvlelnfvpglsqsiwasavtgqhn$  ${\tt IGKTYRQFAYRLTDPKALVEAGQQYTSEKMEISLLNPEDMALAEDEFDFVVVRLSPAADNVEPVAAQLKEVVKEGGQV}$  $\label{eq:linear} LFLRQRSVQNSEVIVNGEAEQFDNGSYADLLKSAGLTFAGHVSFEEGNEFASLSLCSVQPEADCTGKDVSVYHFVEPS$ TSALKVIAALKARGWNVTTYRADEASKAPPRVLVLNELDTALLPNLSPDHWDSLKDLLSLDKRVLWVTSGSQTVVSDP NKAMIHGLGRTVRAEDPLVQLTTLDVSANSTEATVDSVEVILDRLALPEVFHHVESEFIERNGLIHINRIQPDDQVNA VASASYEGSEPVEQSLHDSPNMIRLRCERVGTTDSLIYSEVSPCELPLDDNKVEVEVYAAGLNYKDVVITMGIVPENE HILGLEGAGIVRRLGKNVHKVRKLDIGQRVLVFKKGAFANRVHAEAERVYPIPDSMTFEETCTLASSYLTGIHSVFNL ADTKAGSKVLIHSASGGLGLACIQLCQYIGAEVFATCGNQEKRDFLVKQAGIPADHIFNSRDTSFGAAIMAATNGYGV DTILNSLTGDLLDESWRCIAAEGTMVELGKRDMLDRKGLSMEPFGRNASYRCFDMGHDIVSDAMINDLLKRLFALLEA GHVKPVHVATTFGWDNVSGAMRYMRSANHIGKIVISSGDKPVIVPVRPSRLPLQLRGEVGYLLIGGLKGLCGSVAVHL  $\label{eq:slganhivvmarsgyndevsqrvitdlaalgctitlgqgdvskaddvrrvikqspvpiggviqgamvlrdrvftdms$ IEEYHAAVDCKVAGTWNVHNALIEENMKVDFFTMLSSVSGVVGQKGQANYAAANAFLDAFAIYRRNLGLAGNSVNLGA IQDVGYMSHHVDLLENLSSDAWTPINEALMLKIVEFSLKQQLTPISEASAGQLVTSIAVPQRESSSLLRDARFSTLSF SDGEDAGAKGDGKDAGIQALQLLIKNKAAVSAIHDAVIDVTVRQFTTMLSLSEPMEPAKAPSSYGLDSLAAVEFRNWV RLELKAEVTTLDIISATSLEOLAOKIAGRLTAA

## ElbB

MPGRELAPRQDVEFPTLDGLTIRGWLFPAQSRGPAVIITPGFNCVKEMFVSEVAESFQHSDVTALVYDPRTLGESDGL PRNNIDPLAQVSDYSDALTFLKTHPIVDPTNISFWGMSFSALVALNAAALDKRARCCIAVCPLTGMQPEPDMLPKVLA RCMQDRESQVVGNPPVTISVLTEQGRNPAGMGIGADKMEYDYMVNAKFRGAPNYENRTTLQSYYKMMAWQPFEIMKYL SQTRVLMIIPENDTISPADKQQVLFDGLPEPKTAHVAKGKGHLDVLSGADYEILAEMQANFIKGPRAK

### ElbC

MFDLYDYSPRLVALGLIAATIVTYSLTLTVYRLFFHPLARIPGPKLCAITGWYEIFWDVLVGGQFTFKVEEWHKKYGP IMRIGPNEVHFNDPDFYNELYPSIGATYEKPAQWRWRFGCGTAIFDTIGHEHHAQRKAPVAAFFSRQKILQFSGFIQD QTDILVKRIRDNHRGQVICANEAFDALTMDIIGYYAFGLSYNSLQYPGFKAPYRNVTADIARMVHVGAHFPWVFTILN ALPEKKEISSQIRRIKDNKEYLDKNVNEHRTVFHEILNSNQPACELNEGRIYHEALSLVGAALETSKRTTALAVYYIL ATPGVEANLRAELMAAMPDKTKILSVPELEALPYLNAVIKEALRLAIGVSQRMRRYSPTETITYKDYTIPPNTVFGMC HWEQLRDARIWDRPTEFLPERWLAEQPLALNGQPLNKYFVPFHRGPRMCLGKEFGMAQLNIGLATLFRQEDIKLELYE TDRKDVDVVADFFVPLTIKESQGVRVLVK

## ElbE

MLPLLFLASGILVHLSVFRHGEWETKSPQVVLGYLFAALGGTSCLRASNSTAANDVSGIGPTEFVRLLAFHMIGLFAS ITVYRLFFHRLSGFRGPFIARLSSFYLAWLSAKRLHLHDEIDFLHSRYGDYVRTGPRELSIIDPQCVQAIYGSQTRCI KGPIYTLLDPRTNLSSTRDKTEHAKRRRAWDRGFSTTALHTYEPMVQDLTQELMTIIDELSENPINITEWVDKYAFEV MGQLTFGKPFNMLKERKEAYFLEVIRHDMNAIGYLLNLPWLSYLFLRTPGLNRNHLNFWKWIENEFAQRIARGQRRPD VFNWLHQAYLQGPQTKSDTLKLHGDGYLVIVAGSDTTASTITHLLFYLACNKPLTQKLQAQLDKLDELKDESLRNVEL LDACISETLRLRPAVPAGVQRETPKEGMYIGDRYIPDPRSFEQPNEFIPERFTSRPELVKDKSVFIPFLTGSYACVGR RLALMEVRRAVAAIVCQYDIALGPGQTREGFLNGKIDAFTLVAAPLSLKFTRQNQ

## Phaeospelide A (1) の単離

AO-*apmlAB* をCPS液体培地 (3.6 L; 150 mL x 24) を用いて30°Cで5日間培養した.回 収した培養菌体を凍結乾燥後,スパーテルを用いて粉砕し,MeOHで2回抽出すること で,MeOH抽出物3.2 gを得た.そのピリジン可溶画分を3 ccのフラッシュシリカゲルに 付し,エバポレーターと油圧式真空ポンプを用いて溶媒を減圧留去した.そのシリカゲ ルをフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し,CHCl<sub>3</sub>-MeOH (19/1-9/1) の溶媒系で溶出し,1(4.1 mg)とクルードの2(2.3 mg)を得た.クルードの2は高分解能 ESIMSを用いて分析し,その分子量をC<sub>32</sub>H<sub>46</sub>O<sub>7</sub> (*m*/*z* 565.3124 [M+Na]<sup>+</sup>, calcd 565.3136)と 決定した.

## 化合物3の合成と単離

化合物1のアセチル化体3を得るために、まず、AO-apmlABをCPS液体培地 (9.8 L; 150 mL x 65)を用いて30℃で5日間培養した.その菌体成分のMeOH抽出成分を先述と同様にフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画し (CHCl<sub>3</sub>-MeOH = 9/1)、クルードの1 (87.2 mg)を得た. そのクルードサンプルを1 mM pyridine中、無水酢酸 (500 μL, 5.3 mmol)と室温で12 h反応させた.反応溶液はエバポレーターと油 圧式真空ポンプを用いて溶媒を減圧留去した後に、フラッシュシリカゲルカラムクロ マトグラフィーに付し、CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (4/1)の溶媒系で溶出し、クルードの3 (44.0 mg)

を得た. 1.0 mg のクルードをさらにPTLC (*n*-hexane-EtOAc = 3/1) により分画し, 3を 精製した (0.6 mg).



化合物 **3**: Pale yellow powder; HRESIMS: *m/z* 861.3990 [M+Na]<sup>+</sup> (861.4032 calcd. for C<sub>46</sub>H<sub>62</sub>O<sub>14</sub>Na). <sup>1</sup>H (800 MHz) および <sup>13</sup>C (200 MHz) NMR スペクトルのすべてのシグナル は,各種 2D NMR 解析により, Table 2 に記載したように帰属した (Figure S1).



Figure S1. 化合物**3**の2次元NMR相関. 青線は<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSYとHSQC-TOCSY, 赤線は構造 決定に重要なHMBC相関を示した.

#### 化合物4の合成と単離

クルード4のCHCl<sub>3</sub>不溶画分 (0.87 mg) を50 μL pyridine中, 無水酢酸 (100 μL, 1.06 mmol) と室温で15 h反応させた. 反応溶液はエバポレーターと油圧式真空ポンプを用い て溶媒を減圧留去した. 同様の反応 (0.87 mg) を行った. その反応産物 (1.8 mg) を PTLC (*n*-hexane: EtOAc = 1/1) を用いて分画し, 化合物4を精製した (0.4 mg).



化合物 4: Pale yellow powder; HRESIMS: m/z 775.3639  $[M+Na]^+$  (775.3664 calcd. for C<sub>42</sub>H<sub>56</sub>O<sub>12</sub>Na). <sup>1</sup>H (900 MHz) および <sup>13</sup>C (225 MHz) NMR スペクトルのすべてのシグナル は,各種 2D NMR 解析により, Table 3 に記載したように帰属した (Figure S1).

化合物3のオゾン分解と還元処理



**3**の混合物 (44 mg) を4.2 mLのCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(1:1) に溶解し, -78°Cで35 min オゾン分 解を行なった. 過剰のオゾンは反応溶液中に窒素パージすることで取り除いた. 反応溶 液に過剰量のNaBH<sub>4</sub> (39.7 mg, 1.06 mmol) を加え, 氷上で30 min攪拌した後に, 水を加 え反応を停止した. EtOAcを用いて抽出した後に, 飽和食塩水で洗浄後, 硫酸マグネシ ウムを加え脱水した後に溶媒を減圧留去し, **5**, **6**および**7** (33.0 mg) の混合物を得た.

## フラグメント 16 の合成と単離

**5**,6 および 7 (7.6 mg) の混合物を 200 µL pyridine 中, 無水酢酸 (100 µL, 1.06 mmol) と 室温で 11 h 反応させた.反応溶液はエバポレーターと油圧式真空ポンプを用いて溶媒 を減圧留去した.その反応産物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付 し, *n*-hexane-EtOAc (1/1) を用いて溶出し化合物 **16** (1.8 mg) を単離した.



化合物 **16**: HRESIMS: *m/z* 427.1574 [M+Na]<sup>+</sup> 427.1580 calcd. for C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>O<sub>10</sub>Na), 1H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>); δ = 5.19 (m, H-25), 4.28 (dd, 12.0, 3.5, Ha-26), 4.13 (t, 6.3, H-23), 4.07 (dd, 12.0, 6.0, Hb-26), 2.07 (s, 3H x 2), 2.05 (s, 3H), 1.95 (m, H-24).

# 標品 (S)-16と (R)-16の合成

(*R*)-1,2,4-butanetriol (TCI B3137) (2.3 mg) または (*S*)-1,2,4-butanetriol (TCI B2404) (1.3 mg)を 100 µL pyridine 中, 無水酢酸 (50 µL, 0.53 mmol) と室温で 12 h 反応させた.反応 溶液はエバポレーターと油圧式真空ポンプを用いて溶媒を減圧留去し, それぞれ(*R*)-16 (2.3 mg) または (*S*)-16 (1.9 mg) を得た.各生成物の純度は 1H NMR スペクトルを用い て確認した.

## VCD とIR スペクトル測定

VCD と IR スペクトルは, JASCO FVS-6000 spectrometer と 2200-850 cm<sup>-1</sup>の光を透過 する光学フィルターおよび MCT-V detector を用いて分析した. VCD と IR データは室 温にて解像度を 8 cm<sup>-1</sup>に設定し,それぞれ 2000 回, 16 回スキャンを行なった. 50-µm BaF<sub>2</sub> cell (JASCO) を使用した. すべてのスペクトルは同条件で測定した溶媒のスペク トルを用いて補正した.

## フラグメント5と7の TBDPS 保護



5,6および7の混合物 (23.9 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (40/1-19/1) で溶出し,5と7 の混合物 (17.1 mg) を得た.その混合物 (17.3 mg) とイミダゾール (56.9 mg,831.4 µmol) を氷上で800 µL DMFに溶解した.TBDPS chloride (71.2 µL,277.3 µmol) をゆっくり添加した後に,氷浴を取り外し,室温で24 h攪 拌した.その反応液に対して水を加え,混合溶媒 (*n*-hexane/EtOAc=1/1) を用いて抽出を 行い,飽和食塩水を用いて洗浄後,溶媒を減圧留去した.反応産物のLC-MS分析により, 化合物8 (*m/z* 819 [M+Na]<sup>+</sup>) と12 (*m/z* 847 [M+Na]<sup>+</sup>) の存在を確認した.その混合物をフ ラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し,*n*-hexane-EtOAc (19/1-12/1-6/1) を用いて溶出し,8と12の混合物 (12.1 mg) を得た.



化合物8と12の加溶媒分解

**8**と12の混合物 (12.1 mg) を600 μL MeOHに溶解後, 1 M NaOMe (c.a. 360 μL) を添加 し,室温で1.5 h攪拌した. その反応溶液の溶媒を減圧留去後, MeOHに再溶解しLC-MS 分析を行った. その結果,反応産物のLC-MS分析により,9(m/z 733 [M+Na]<sup>+</sup>) と13(m/z 439 [M+Na]<sup>+</sup>)の存在を確認した. その混合物を2度のフラッシュシリカゲルカラムクロ マトグラフィー (EtOAc-MeOH=9/1 とCHCl<sub>3</sub>-MeOH=80/1-40/1) により分画を行い, ク ルード9 (5.5 mg) と13 (1.6 mg) を得た.

## 化合物 9 のアセトナイド保護と化合物 10 と 11 の単離



クルード9 (5.5 mg) と3当量のpyridinium *p*-toluenesulfonate (PPTS) のアセトン溶液 (250 μL) に対して, 2,2-dimethoxypropane (DMP) (20.8 μL, 170 μmol) を氷上で添加し, 室温で1.5 h攪拌した. 飽和重曹水を加えて反応を止めた後に, EtOAcを用いて抽出し, 溶媒を減圧留去した. その反応産物 (5.1 mg) をフラッシュシリカゲルカラムクロマト グラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (6/1) で溶出することで, 10 (0.8 mg) と11 (0.5 mg) を得た. それらの平面構造を決定するために,全てのプロトンシグナルを1H NMRスペ クトルと<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSYスペクトル解析により帰属した. 相対配置を決定するために, NOESY相関を解析した. まず,化合物10のH-21/H3-2′,Ha-20 およびH-19/H3-2′,Ha-20の 相関が見られ,化合物11のH-19/H3-2′ Ha-18 およびH-17/H3-2′,Ha-18の相関が確認され たことで, C-17とC-19, C-21の相対配置が全て*S*\*であることが明らかとなった (Figure 15).

化合物 10: HRESIMS: m/z 733.3699 [M+Na]<sup>+</sup> (733.3715 calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>58</sub>O<sub>5</sub>NaSi<sub>2</sub>), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 4.10 (m, H-19), 4.03 (m, H-17), 3.99 (m, H-21), 3.85 (m, Ha-15), 3.81 (m, Hb-15), 3.71 (dd, 10.4, 4.8, Ha-22), 3.59 (brs, 17-OH), 3.54 (dd, 9.6, 5.6, Hb-22), 1.75 (m, Ha-16), 1.66 (m, Hb-16), 1.66 (m, Ha-18), 1.62 (m, Ha-20), 1.58 (m, Hb-18), 1.44 (s, 3H-2'), 1.35 (s, 3H-3'), 1.21(m, Hb-20).

化合物 11: HRESIMS: m/z 733.3702 [M+Na]<sup>+</sup> (733.3715 calcd. for C<sub>43</sub>H<sub>58</sub>O<sub>5</sub>NaSi<sub>2</sub>), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 4.11 (m, H-17), 4.03 (m, H-19), 3.91 (m, H-21), 3.83 (m, Ha-15), 3.68 (m, Hb-15), 3.62 (dd, 10.2, 6.1, Ha-22), 3.57 (dd, 10.0, 5.1, Hb-22), 3.16 (brd, 17-OH), 1.69 (m, Ha-16), 1.66 (m, Hb-16), 1.65 (m, Ha-20), 1.60 (m, Hb-20), 1.46 (m, Ha-18), 1.39 (s, 3H-2'), 1.33 (s, 3H-3'), 1.17 (m, Hb-18).

# 化合物 13 のアセトナイド保護と化合物 14 と 15 の単離



クルード13 (1.6 mg) と2当量のPPTSのアセトン溶液 (80 μL) に対して, 2,2- DMP (9.4 μL, 77 μmol) を氷上で添加し, 室温で1.5 h 攪拌した. 飽和重曹水を加えて反応を止め た後に, EtOAcを用いて抽出し, 溶媒を減圧留去した. その反応産物 (1.5 mg) をフラッ シュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (12/1) で溶出するこ とで, 14 (0.5 mg) と15 (0.7 mg) を得た. それらの平面構造を決定するために, 全ての プロトンシグナルを1H NMRスペクトルと<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSYスペクトル解析により帰属した. 相対配置を決定するために, NOESY相関を解析した. 化合物14のH-31/H3-2', Hb-32, お よびH-33/H3-3', Ha-32.の相関が見られ, 化合物15のH-29/H3-2', Ha-30 およびH-31/H3-2', Ha-30の相関が確認されたことで, C-29とC-31, C-33の相対配置が全て*S*\*であることが明 らかとなった (Figure 15).

化合物 14: HRESIMS: m/z 479.2594 [M+Na]<sup>+</sup> (479.2588 calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>NaSi), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>+20% C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>);  $\delta$ = 4.00 (m, H-31), 3.98 (m, H-29), 3.91 (m, H-33), 3.83 (m, Ha-27), 3.80 (m, Hb-27), 3.55 (brs, 29-OH), 1.73 (m, Ha-28), 1.64 (m, Hb-28), 1.57 (m, Ha-32), 1.54 (m, Hb-30), 1.51 (m, Hb-32), 1.36 (s, 3H-2'), 1.32 (s, 3H-3'), 1.16 (d, 5.6, 3H-34).

化合物 **15**: HRESIMS: *m/z* 479.2590 [M+Na]<sup>+</sup> (479.2588 calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>O<sub>4</sub>NaSi), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 4.18 (m, H-31), 4.15 (m, H-29), 4.08 (m, H-33), 3.84 (m, Ha-27), 3.69 (m, Hb-27), 2.77 (brd, 33-OH), 1.71 (m, Ha-28), 1.68 (m, Hb-28), 1.60 (m, H2-32), 1.45 (s, 3H-2'), 1.37 (s, 3H-3'), 1.36 (m, Ha-30), 1.34 (m, Hb-30), 1.20 (d, 5.6, 3H-34).

化合物 10 の (S)-および (R)-MTPA エステル体の合成



化合物 10 の (*S*)-MTPA エステル体 10a を得るために, 0.2 mg の 10 を 30 µL pyridine で溶解し、2 µL (*R*)-MTPA chloride を添加した.反応液を室温で 2 h インキュベートした 後に、EtOAc と水を加えて分液を行い (x2)、その EtOAc 層の溶媒を減圧留去した.得 られた反応産物を PTLC (*n*-hexane-EtOAc = 6/1)を用いて分画し、(*S*)-MTPA エステル体 10a を得た. (*R*)-MTPA エステル体 10b も同様に、0.2 mg の 10 に対して 2 µL (*S*)-MTPA chloride を反応させることで合成した. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトル解析により、全てのプ ロトンを帰属した.

化合物 **10a**: HRESIMS: *m/z* 949.4116 [M+Na]<sup>+</sup> 949.4113 calcd. for C<sub>53</sub>H<sub>65</sub>O<sub>7</sub>F<sub>3</sub>NaSi<sub>2</sub>), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 5.52 (m, H-17), 3.91 (m, H-19), 3.90 (m, H-21), 3.69 (dd, 10.4, 5.1, Ha-22), 3.59 (m, Ha-15), 3.56 (m, Hb-15), 3.52 (dd, 10.4, 5.8, Hb-22), 1.92 (m Ha-18), 1.84 (m, Ha-16), 1.82 (m, Hb-16), 1.72 (m, Hb-18), 1.60 (m, Ha-20), 1.14 (m, Hb-20), 1.33 (s, 3H-2'), 1.31 (s, 3H-3').

化合物 **10b**: HRESIMS: *m/z* 949.4111 [M+Na]<sup>+</sup> 949.4113 calcd. for  $C_{53}H_{65}O_7F_3NaSi_2$ ), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 5.47 (m, H-17), 3.81 (m, H-21), 3.70 (m, Ha-15), 3.68 (m, Hb-15), 3.68 (m, H-19), 3.67 (m, Ha-22), 3.50 (dd, 10.2, 5.8, Hb-22), 1.93 (m, Ha-16), 1.90 (m, Hb-16), 1.84 (m, Ha-18), 1.68 (m, Hb-18), 1.51 (m, Ha-20), 1.06 (m, Hb-20), 1.27 (s, 3H-2'), 1.20 (s, 3H-3').

### 化合物 14 の (S)-および (R)-MTPA エステル体の合成



(S)-MTPA エステル体 14a と (R)-MTPA エステル体 14b に関しても、上述した 10a と 10b の合成と同様のスキームで調製した.

化合物 **14a**: HRESIMS: *m/z* 695.2966 [M+Na]<sup>+</sup> (695.2986 calcd. for  $C_{37}H_{47}O_6F_3NaSi$ ), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 5.51 (m, H-29), 3.93 (m, H-33), 3.88 (m, H-31), 3.59 (m, Ha-27), 3.57 (m, Hb-27), 1.95 (ddd, 14.2, 8.0, 6.2, Ha-30), 1.87 (m, Ha-28), 1.83 (m, Hb-28), 1.76 (ddd, 14.2, 5.6, 5.6, Hb-30), 1.60 (m, Ha-32), 1.57 (m, Hb-32), 1.32 (s, 3H-2'), 1.28 (s, 3H-3'), 1.18 (d, 6.2, 3H-34).

化合物 **14b**: HRESIMS: *m/z* 695.2972 [M+Na]<sup>+</sup> (695.2986 calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>47</sub>O<sub>6</sub>F<sub>3</sub>NaSi), 1H NMR (800 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 5.48 (m, H-29), 3.89 (m, H-33), 3.72 (m, H-31), 3.70 (m, Ha-27), 3.69 (m, Hb-27), 1.92 (ddd, 6.3, 6.3, 6.3, H2-28), 1.88 (ddd, 14.1, 7.4, 7.4, Ha-30), 1.71 (ddd, 14.1, 5.7, 5.7, Hb-30), 1.55 (m, Ha-32), 1.48 (m, Hb-32), 1.29 (s, 3H-2'), 1.20 (s, 3H-3'), 1.16 (d, 6.2, 3H-34).

## A. phaeospermum Kemushi-1 の培養と代謝物分析

PDB 寒天培地上, 25°C で培養した *A. phaeospermum* Kemushi-1 を MYG, PDB または CPS 液体培地に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得ら れた乾燥菌体 (40 mg) を粉砕後, 1 mL MeOH で 30 min 抽出した. 室温, 13,500 rpm で 15 min 遠心分離を行い, 500 μL の上清を新しい 1.5 mL エッペンチューブに移し, 遠心 エバポレーターを用いて溶媒を減圧留去した. 得られた MeOH 抽出物を 100 μL MeOH に再溶解し, 遠心分離後, 10 μL の上清を HPLC にインジェクションし分析した. HPLC の分析条件: 流速; 1 mL/min, 溶媒系: acetonitrile: H<sub>2</sub>O (0.01% TFA) = (0-2 min: 20:80, 2-12 min: 20:80 to 100: 0, 12-24 min: 100:0). 検出波長 200-400 nm.

### Akml-1-4 (17-20)の単離

## Akml-1 (17)の単離

AO-*akmlAB*を CPS 液体培地 (1.8 L; 150 mL x 12) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し,得られた乾燥菌体 (10.4 g) を粉砕後, MeOH を用いて2回抽出した. その MeOH 抽出溶液を *n*-hexane と分液後,溶媒を減圧留去し MeOH 抽出物 (250 mg) を得た. MeOH 抽出物 (250 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (1/1), EtOAc で溶出し, 17 を含む混合物を得た. その混合物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (1/1-1/2) で溶出することで akml-1 (17) (81 mg) を単離した.

### Akml-2(18)の単離

AO-*akmlABD* を CPS 液体培地 (3L; 150 mL x 24) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し,得られた乾燥菌体 (20 g) を粉砕後, MeOH を用いて 2 回抽出した. その MeOH 抽出溶液を *n*-hexane と分液後,溶媒を減圧留去し MeOH 抽出物 (450 mg) を得た. MeOH 抽出物 (450 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィー に付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (20/1) で溶出し, 18 を含む混合物 (92 mg) を得た. その混合物 (92 mg) をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (1/1-1/3) で溶出することで akml-2 (18) (60 mg) を単離した.

## Akml-3 (19) の単離

AO-*akmlABC* を CPS 液体培地 (3.2 L; 150 mL x 21) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間 培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体 (32.4 g) を粉砕後, MeOH を用い て 2 回抽出し MeOH 抽出物 (4.0 g) を得た. MeOH 抽出物 (4.0 g) の MeOH 可溶画分を シリカゲルカラムクロマトグラフィーに付した後に, EtOAc-MeOH(1/1-1/3) で溶出し, 19 を含む混合物 (100 mg) を得た. その混合物 (100 mg) を逆相カラムクロマトグラフ ィーに付し, MeOH-H<sub>2</sub>O (1/4-1/9) で溶出することで akml- 3 (19) (8.3 mg) を単離した.

#### Akml-4 (20) の単離

AO-*akmlABCD*を CPS 液体培地 (3.6 L; 150 mL x 24) に播種し, 30℃, 150 rpm で 5 日 間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体を粉砕後, MeOH を用いて 2 回 抽出した. その MeOH 抽出溶液を *n*-hexane と分液後, 溶媒を減圧留去し MeOH 抽出物 (500 mg) を得た. 逆相カラムクロマトグラフィーに付し, EtOAc-MeOH (2/1) (1% H<sub>2</sub>O) で溶出することで 20 を含む混合物を得た. その混合物を逆相 PTLC (acetonitrile- H<sub>2</sub>O = 2/1) で分画し, akml-4 (20) (11.2 mg) を単離した.





2	Δ
2	U



Akml-4 (20)b			Akml-4-Ac (26) <sup>c</sup>				
Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)	Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, J in Hz)	$\Delta \delta_{\mathrm{H}(\mathbf{26-20})}$	
1	166.1		1	165.7			
2	124.5	5.99 (1H, d,)	2	125.6	6.00 (1H, d, 15.7)	0.01	
3	143.1	7.05 (1H, dd, )	3	141.4	7.02 (1H, dt, 15.7, 7.5)	-0.03	
4	35.8	2.75 (1H, m)	4	35.5	2.72 (1H, m)	-0.03	
		2.71 (1H, m)			2.67 (1H, m)	-0.04	
5	75.7	3.97 (1H, m)	5	76.2	4.08 (1H, m)	0.11	
6	57.8	3.09 (1H, dd, 7.4, 2.3)	6	55.4	3.08 (1H, t, 7.7)	-0.01	
7	58.0	3.03 (1H, dd, 6.5, 2.3)	7	55.4	3.08 (1H, t, 7.7)	0.05	
8	74.4	3.16 (1H, m)	8	73.3	4.77 (1H, m)	1.61	
9	72.4	3.53 (1H, m)	9	72.3	5.08 (1H, m)	1.92	
10	32.4	1.55 (1H, m)	10	30.1	1.57 (2H, m)	0.02	
		1.45 (1H, m)					
11	25.2	1.40 (2H, m)	11	24.8 <sup>e</sup>			
12	$27.4^{d}$		12	$27.7^{e}$			
13	$28.2^{d}$		13	$28.5^{e}$	1 26 1 28 (1211)		
14	$28.4^{d}$	1.27-1.37 (10H)	14	$28.5^{e}$	1.20-1.38 (12H)		
15	$28.7^{d}$		15	$28.5^{e}$			
16	$28.8^{d}$		16	28.6 <sup>e</sup>			
17°	31.7	2.00 (1H, m)	17	32.1	1.99 (2H, m)		
18 <sup>d</sup>	130.6	5.35 (1H, m)	18	130.8	5.37 (1H, m)		
19 <sup>d</sup>	130.1	5.35 (1H, m)	19	130.0	5.37 (1H, m)		
20°	31.4	2.00 (2H, m)	20	31.8	1.99 (2H, m)		
21	25.0	1.39 (2H, m)	21	25.2	1.40 (2H, m)		
22	34.8	1.50 (1H, m)	22	35.1	1.49 (1H, m)		
		1.64 (1H, m)			1.65 (1H, m)		
23	71.1	4.92 (1H, m)	23	71.4	4.95 (1H, m)		
24	18.9	1.22 (3H, d, 6.3)	24	20.0	1.23 (3H, d, 6.2)		
1′	61.4	4.08 (2H, m)	1′	65.8	4.08 (2H, m)		
2'	40.3	3.16 (2H, m)	2'	40.1	3.51 (2H, m)		
			Ac-1	171.3			
				22.8	2.00 (3H, brs)		
			Ac-2	170.5			
				20.7	2.10 (3H, brs)		
			Ac-3	169.8			
				20.9	2.09 (3H, brs)		

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments.

[b] Recorded in CD<sub>3</sub>OD. [c] Recorded in CDCl<sub>3</sub>.

化合物29の合成



化合物 18 (7.5 mg, 0.0177 mmol) を 3 mL の MeOH に溶解し, 10% Pd/C (10.0 mg) を室 温で添加した.室温, H<sub>2</sub>環境下で 2.5 h 攪拌した後に,反応混合物を Celite<sup>®</sup> pad を用い て濾過し,溶媒を減圧留去した. そのクルードサンプルは精製せずに,次の反応に用い た. 化合物 27 のクルードを 500 µL の CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>に溶解し, iPr<sub>2</sub>NEt (62 µL, 0.353mmol) と Triphosgene (12.6 mg, 0.0424 mmol) を 0°C で添加した. 室温で 14 h 攪拌した後に,飽和 重曹水を加え,反応を停止した. そのクルード産物を EtOAc (x4) にて抽出し, EtOAc 層 を飽和食塩水で洗浄後,硫酸マグネシウムを用いて乾燥させ,溶媒を減圧留去した. 得 られた反応産物を,シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画を行い, 29 を 精製した.

化合物 **29**: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub> (20% MeOD));  $\delta$  = 4.96 (m, H-23), 4.54 (dt, 6.8, 6.8, H-9), 4.23 (dd, 6.8, 5.1, H-8), 3.62 (m, H-5), 3.21 (dd, 5.1, 2.1, H-7), 3.11 (dd, 4.5, 2.1, H-6), 2.38 (t, 6.8, 2H-2), 1.92 (m Hb-10), 1.85 (m, Hb-3), 1.74 (m, Ha-3), 1.74 (m, Ha-10), 1.69 (m, 2H-4), 1.60 (m, Hb-22), 1.49 (m, Ha-22), 1.23 (d, 6.3, 3H-24), 1.26-1.46 (22H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> (20% MeOD));  $\delta$  = 173.0 (C-1), 153.7 (C-1'), 80.2 (C-8), 78.4 (C-9), 71.0 (C-23), 69.6 (C-5), 58.3 (C-6), 54.5 (C-7), 35.6 (C-22), 33.4 (C-4), 33.1 (C-10), 20.5 (C-3), 20.1 (C-24), 23.7, 25.0, 28.0, 28.3, 28.3, 28.5, 28.5, 28.5, 28.5, 28.5, 28.7 (C11-C21).

化合物 30a と 30b の合成



化合物 29 の (S)-MTPA エステル体を得るために, 29 を pyridine で溶解し, (R)-MTPA chloride を添加した.反応液を室温でインキュベートした後に, EtOAc と水を加えて分 液を行い (x2), その EtOAc 層の溶媒を減圧留去した.得られた EtOAc 抽出物を PTLC (*n*-hexane-EtOAc) を用いて分画し, (S)-MTPA エステル体 30a を得た.(R)-MTPA エステ ル体 30b も同様に, 29 に対して 2 µL (S)-MTPA chloride を反応させることで合成した. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY スペクトル解析により,全てのプロトンを帰属した.

化合物 **30a**: HRESIMS: m/z 693.3192 [M+Na]<sup>+</sup> 693.3221calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Na), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 4.91 (m, H-5), 4.91 (m, H-23), 4.53 (dt, 6.4, 6.4, H-9), 4.33 (dd, 6.4, 3.6, H-8), 3.30 (dd, 7.1, 2.0, H-6), 3.06 (m, H-7), 2.29 (m, 2H-2), 1.76 (m, 2H-4), 1.66 (m, Hb-3), 1.54 (m, Ha-3), 1.20 (d, 6.3, H-24), 1.22-1.65 (26H).

化合物 **30b**: HRESIMS: *m/z* 693.3190 [M+Na]<sup>+</sup> 693.3221calcd. for C<sub>34</sub>H<sub>47</sub>F<sub>3</sub>O<sub>9</sub>Na), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 5.01 (m, H-5), 4.93 (m, H-23), 4.45 (dt, 6.6, 6.6, H-9), 4.20 (dd, 6.6, 4.0, H-8), 3.24 (dd, 6.0, 2.1), 2.90 (dd, 4.0, 2.1), 2.34 (m, 2H-2), 1.81 (m, 2H-4), 1.67 (m, 2H-3), 1.21 (d, 6.3, 3H-24), 1.24-1.64 (26H).

化合物 28 の合成



化合物 27 (5.7 mg, 0.013 mmol) を 1 mL acetone で溶解し, DMP (10.0 μL, 0.0798 mmol) と TsOH•H<sub>2</sub>O (0.8 mg, 0.00399 mmol) を 0 °C で添加した. 0°C で 2 h インキュベートした後に, 0°C で飽和重曹水を加えて反応を停止した. そのクルードサンプルを EtOAc (x5) を用いて抽出し, EtOAc 層を飽和食塩水で洗浄後, 硫酸マグネシウムを用いて乾燥させ, 溶媒を減圧留去した. 得られた反応産物を, シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて分画し 28 を精製した.

化合物 **28**: HRESIMS: *m/z* 491.3335 [M+Na]<sup>+</sup> 491.3343 calcd. for C<sub>27</sub>H<sub>48</sub>O<sub>6</sub>Na), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>);  $\delta$  = 5.04 (m, H-23), 3.89 (m, H-9), 3.37 (dd, 8.4, 6.2, H-8), 3.20 (m, H-5), 2.88 (dd, 6.2, 2.2, H-7), 2.77 (dd, 5.3, 2.2, H-6), 2.14 (m, 2H-2), 1.79 (m, Ha-3), 1.60 (m, Hb-3), 1.50 (m, Ha-22), 1.44 (s, 3H-3'), 1.42 (s, 3H-2'), 1.37 (m, 2H-4), 1.30 (m, Hb-22), 1.10 (d, 6.3, 3H), 1.23-1.44 (24H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>);  $\delta$  = 172.8 (C-1), 109.6 (C-1'), 82.5 (C-8), 78.3 (C-9), 71.2 (C-5), 70.8 (C-23), 59.0 (C-6), 56.4 (C-7), 36.1 (C-22), 34.8 (C-2), 34.2 (C-4), 33.2 (C-10), 27.9 (C-3'), 27.4 (C-2'), 21.6 (C-3), 20.7 (C-24), 25.1, 26.3, 28.8, 28.9, 29.1, 29.4, 29.4, 29.5, 29.6, 29.6, 29.7 (C11-C21).

### Ciml-1-4 (21-24)の単離

#### Ciml-1 (21) とCiml-3 (23) の単離

AO-*cimlABC*を CPS 液体培地 (300 mL; 150 mL x 2) に播種し, 30℃, 150 rpm で 5 日間 培養した. 培養菌体を凍結乾燥し,得られた乾燥菌体を粉砕後,MeOH を用いて 2 回抽 出した. その MeOH 抽出溶液を *n*-hexane と分液後,溶媒を減圧留去し MeOH 抽出物 (30 mg) を得た. MeOH 抽出物 (30 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, MeOH-H<sub>2</sub>O (9/1-20/1) で溶出し, 21 と 23 を含む混合物 (14.0 mg) を得た. その混合物 (14.0 mg) を逆相 PTLC (MeOH-H<sub>2</sub>O = 20/1) を用いて分画し, ciml-1 (21) (6.4 mg) と ciml-3 (23) (3.4 mg) を得た.

#### Ciml-2 (22) の単離

AO-*cimlABD* を CPS 液体培地 (300 mL; 150 mL x 2) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日 間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体を粉砕後, EtOAc を用いて 2 回 抽出した. 溶媒を減圧留去後, 得られた EtOAc 抽出物 (68 mg) をフラッシュシリカゲ ルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (3/1-1/2) で溶出することで ciml-2 (22) (21 mg) を単離した.

#### Ciml-4 (24) の単離

AO-*cimlABCD* を CPS 液体培地 (6 L; 150 mL x 40) に播種し, 30℃, 150 rpm で 5 日間 培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体を粉砕後, MeOH を用いて 2 回抽 出した. その MeOH 抽出溶液を *n*-hexane と分液後, 溶媒を減圧留去し MeOH 抽出物 (980 mg) を得た. MeOH 抽出物 (980 mg) を逆相カラムクロマトグラフィーに付し, MeOH-H<sub>2</sub>O (6/1-9/1)で溶出することで 24 を含む混合物を得た. その混合物を逆相 PTLC (MeOH-H<sub>2</sub>O = 6/1-9/1) を用いて分画を行い, ciml-4 (24) (16 mg) を単離した.

#### Ciakml-1 (25) の単離

AO-*cimlABD*+*akmlC*を CPS 液体培地 (3.6 L; 150 mL x 24) に播種し, 30℃, 150 rpm で 5 日間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体を粉砕後, MeOH を用いて 2 回抽出した. その MeOH 抽出溶液を *n*-hexane と分液後, 溶媒を減圧留去し MeOH 抽 出物を得た. MeOH 抽出物 (980 mg) を逆相カラムクロマトグラフィーに付し, MeOH-H<sub>2</sub>O (3/1)で溶出することで 25 を含む混合物 (18.3 mg) を得た. その混合物 (18.3 mg) を逆相 PTLC (acetonitrile-H<sub>2</sub>O=5/1 x2) を用いて分画を行い, ciakml-4 (25) (8.6 mg) を単 離した.

#### Peml-1-4 (31-34)の単離

### Peml-1 (31)の単離

AO-*pemlAB*を CPS 液体培地 (240 mL; 60 mL x 4) に播種し, 30°C, 150 rpm で 6 日間 培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体 (1.0 g) を粉砕後, EtOAc を用い て 2 回抽出した. 溶媒を減圧留去後, 得られた EtOAc 抽出物 (26.0 mg) をシリカゲル カラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (15/1) で溶出することで Fr.1 (8.9 mg) を得た. Fr.1 (8.9 mg) をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (3/1) で溶出し, peml-1 (**31**) (2.0 mg) を単離した.

### Peml-2 (32) とPeml-3 (33) の単離

AO-*pemlABE*を CPS 液体培地 (1.8 L; 150 mL x 12) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間 培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体を粉砕後, MeOH を用いて 2 回抽 出し, MeOH 抽出物 (1.25 g) を得た. その CHCl<sub>3</sub> 可溶画分をシリカゲルカラムクロマ トグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (1/1)で溶出し, Fr.2 (46.0 mg) と peml-3 (33) (101.2 mg) を得た. Fr.2 (46.0 mg) をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (4/1) で溶出し, peml-2 (32) (35.2 mg) を単離した.

#### Peml-4 (34) の単離

AO-*pemlABED* を CPS 液体培地 (3 L; 150 mL x 20) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間 培養した. 培養培地を EtOAc で 2 回抽出した後, 溶媒を減圧留去した. 得られた EtOAc 抽出物 (341.1 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (19/1) で溶出することで Fr.4 (49.0 mg) を得た. Fr.4 (49.0 mg) を EtOAc で洗浄し, peml-4 (34) (30.0 mg) を単離した.

Peml-1 (31) <sup>b</sup>			Peml-2 (32) <sup>b</sup>		Peml-3 (33) <sup>b</sup>	
Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, J in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, J in Hz)
1	166.2		166.6		166.0	
2	122.9	5.83 (1H, d, 15.6)	122.0	5.98 (1H, d, 15.6)	122.8	6.08 (1H, dt, 15.8, 1.6)
3	149.2	6.94 (1H, dt, 15.6, 7.6)	149.3	6.89 (1H, dt, 15.6, 7.4)	145.3	6.91 (1H, dt, 15.8, 5.3)
4	31.2	2.26 (2H, m)	71.1	4.40 (1H, m)	74.0	4.49 (1H, m)
5	26.8	1.49 (1H, m) 1.56 (1H, m)	35.3	1.69 (1H, m)	74.0	4.72 (1H, m)
6	25.6 <sup>c</sup>		21.5	1.24 (1H, m) 1.34 (1H, m)	29.7	1.38 (1H, m) 1.60 (1H, m)
7	26.4		27.1		23.2	1.48 (2H, m)
8	$26.5^{c}$	1 20 1 26 (1411)	$26.1^{d}$		$26.0^{e}$	
9	26.8 <sup>c</sup>	1.20-1.36 (14H)	$26.7^{d}$	1 10 1 20 (1211)	$26.1^{e}$	
10	$27.4^{\circ}$		$27.2^{d}$	1.18-1.38 (12H)	$27.6^{e}$	1.30-1.40 (10H)
11	$27.4^{c}$		$27.3^{d}$		$27.8^{e}$	
12	$28.1^{c}$		$28.1^{d}$		27.2	
13	23.9	1.35 (2H, m)	24.0	1.33 (2H, m)	23.8	1.31 (2H, m)
14	35.3	1.56 (1H, m)	35.5	1.57 (2H, m)	35.6	1.54 (1H, m)
		1.63 (1H, m)				1.60 (1H, m)
15	70.7	5.05 (1H, m)	71.3	5.05 (1H, m)	71.3	5.03 (1H, m)
16	20.3	1.28 (3H, d, 6.3)	20.4	1.27 (3H, d, 6.4)	20.4	1.27 (3H, d, 6.3)
			4-OH	1.79 (d, 4.0)	4-OH	2.54 (1H, brs)
					5-OH	2.16 (1H, brs)

Table S3.  $^{13}$ C (125 MHz) and  $^{1}$ H (500 MHz) NMR data for 31-33<sup>*a*</sup>.

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments.

[b] Recorded in CDCl<sub>3</sub>. [c-e] Interchangeable.

## Mpml-1 (35)の単離

AO-*mpmlAB*を CPS 液体培地 (3.6 L; 150 mL x 24) に播種し, 30°C, 150 rpm で 6.5 日間培養した.培養培地を EtOAc で 2 回抽出した後, 溶媒を減圧留去した.得られた EtOAc 抽出物 (514.2 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (2/1-3/2) で溶出することで mpml-1 (**35**) (11.8 mg) を単離した.

### Elb-1 (37)の単離

AO-*elbAB*を CPS 液体培地 (1.5 L; 150 mL x 10) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体 (13.5 g) を粉砕後, EtOAc (5% MeOH) を用いて 2 回抽出した. H<sub>2</sub>O を加えて分液を行い, 有機層の溶媒を減圧留去し, EtOAc 抽出物 (399.6 mg) を得た. その CHCl<sub>3</sub> 可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, *n*-hexane-EtOAc (4/1) で溶出することで Fr.7 (11.0 mg) を得た. Fr.7 (11.0 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (19/1-9/1)で溶出することで 37 (1.9 mg) と Fr.7-5 (2.7 mg) を得た. Fr.7-5 を PTLC (*n*-hexane: EtOAc = 9/1) で分画し, elb-1 (37) (1.5 mg, 計 3.4 mg) を単離した. Elb-1 の化学構造は <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR および各種 2 次元 NMR スペクトル解析により決定した (Figure S2, Table S4).



Figure S2. Elb-1 (**37**) の 2 次元 NMR 相関. 青線は <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, 赤線は構造決定に重要 な HMBC 相関, ピンク線は構造決定に重要な NOESY 相関を示した.

Table S4. <sup>13</sup>C (125 MHz) and <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data for 37<sup>a</sup>.

		Elb-1 $(37)^{b}$
Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)
1	167.3	
2	119.2	5.78 (1H, d, 15.4)
3	145.0	7.25 (1H, dd, 15.4, 10.1)
4	128.4	6.15 (1H, m)
5	144.5	6.13 (1H, m)
6	32.8	2.16 (2H, dt, 7.2, 6.8)
7	28.2	1.42 (2H, m)
8	29.1	1.36 (2H, m)
9	32.3 <sup>c</sup>	1.99 (2H, m)
10	130.3	5.37 (1H, m)
11	130.3	5.37 (1H, m)
12	32.5 <sup>c</sup>	1.99 (2H, m)
13	25.7	1.45 (1H, m)
		1.38 (1H, m)
14	38.8	1.45 (2H, m)
15	68.1	3.80 (1H, m)
16	23.5	1.19 (3H, d, 6.3)

[a] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments.

[b] Recorded in CDCl<sub>3</sub>. [c] Interchangeable.

#### Brefeldin C (38)の単離

AO-*elbABF* を CPS 液体培地 (3.6 L; 150 mL x 24) に播種し, 30°C, 150 rpm で 6 日間培養した. 培養菌体を凍結乾燥し,得られた乾燥菌体を粉砕後,MeOH を用いて 2 回抽出し,MeOH 抽出物 (2.2 g)を得た. その MeOH 抽出物を EtOAc と H<sub>2</sub>O を用いて分液操作を行い,回収した有機層の溶媒を減圧留去した.その抽出物を EtOAc (556.8 mg)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し,*n*-hexane-EtOAc (9/1)で溶出することで Fr.3 (230.0 mg)を得た. Fr.3 (230.0 mg)をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し,CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (19/1-9/1)で溶出することで brefeldin C (38) (84.4 mg)を得た. 38 の化学構造は <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR および各種 2 次元 NMR スペクトル解析により決定した (Table S5).

#### Brefeldin A (39)の単離

AO-*elbABFD*を CPS 液体培地 (3.0 L; 150 mL x 20) に播種し, 30°C, 150 rpm で 5 日間 培養した. 培養菌体を凍結乾燥し, 得られた乾燥菌体 (17.1 g) を粉砕後, EtOAc (20% MeOH)を用いて 2 回抽出し, EtOAc 抽出物を得た. その抽出物を EtOAc と H<sub>2</sub>O を用 いて分液操作を行なった後に, 回収した有機層の溶媒を減圧留去し, EtOAc 抽出物 (474.9 mg) を得た. その CHCl<sub>3</sub> 可溶画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付 し, *n*-hexane-EtOAc (4/1) で溶出することで Fr.3 (67.2 mg) を得た. Fr.3 (67.2 mg) をフ ラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (16/1)で溶出する ことで brefeldin A (**38**) (17.7 mg) を得た. Brefeldin A の化学構造は <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NMR および 各種 2 次元 NMR スペクトル解析により決定した (Table S5).
# Table S5. <sup>13</sup>C (125 MHz) and <sup>1</sup>H (500 MHz) NMR data for 38 and 39<sup>a</sup>.



Brefeldin C



Brefeldin A

Brefeldin C (38) <sup>b</sup>			Brefeldin A (39) <sup>c</sup>		
Position	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H (multi, <i>J</i> in Hz)	
1	166.3		168.4		
2	117.3	5.90 (1H, dd, 15.7, 2.0)	117.8	5.82 (1H, dd, 15.6, 2.0)	
3	151.9	7.37 (1H, dd, 15.7, 3.1)	155.1	7.45 (1H, dd, 15.6, 3.0)	
4	76.0	4.08 (1H, brd)	76.6	4.03 (1H, m)	
5	54.0	1.58 (1H, m)	53.1	1.85 (1H, m)	
6	31.8	1.63 (2H, m)	41.8	1.81 (1H, m)	
				2.00 (1H, m)	
7	25.2	1.58 (1H, m)	73.0	4.21 (1H, m)	
		1.65 (1H, m)			
8	35.1	1.38 (1H, m)	44.1	1.44 (1H, m)	
		1.85 (1H, m)		2.12 (1H, ddd, 13.6, 8.7, 5.4)	
9	46.9	2.24 (1H, m)	45.5	2.38 (1H, m)	
10	136.3	5.19 (1H, dd, 15.2, 9.5)	138.1	5.27 (1H, dd, 15.1, 9.6)	
11	130.2	5.72 (1H, ddd, 15.2, 10.2, 4.6)	131.4	5.75 (1H, ddd, 15.1, 10.2, 4.6)	
12	31.9	1.85 (1H, m)	33.0	1.85 (1H, m)	
		2.01 (1H, m)		1.99 (1H, m)	
13	26.7	1.84 (2H, m)	28.0	1.85 (2H, m)	
14	34.1	1.54 (1H, m)	35.0	1.58 (1H, m)	
		1.72 (1H, m)		1.76 (1H, m)	
15	71.6	4.86 (1H, m)	73.2	4.79 (1H, m)	
16	20.9	1.26 (3H, d, 6.3)	21.1	1.24 (3H, d, 6.3)	

[*a*] Assignments were based on <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HSQC and HMBC experiments.

[b] Recorded in CDCl<sub>3</sub>. [c] Recorded in CD<sub>3</sub>OD.

#### ElbB 酵素反応の基質の合成スキームの検討



化合物 **38** (9.6 mg, 36.3 µmol) を 180 µL の DME に溶解し, 180 µL の 2 N LiOH 水溶液 を添加し,室温で 24 h 攪拌した.反応溶液に 360 µL の 1 M 希塩酸を加え中和した後 に,0.1 M 希塩酸を用いて pH を 2 以下にした.その反応混合物を EtOAc で抽出し (x5), 飽和食塩水で洗浄した後に,溶媒を減圧留去した.得られた抽出成分の TLC 分析と高 分解能 ESIMS 分析により,化合物 **41** (*m*/*z* 281.1755 [M-H]<sup>-</sup>, calcd. 281.1747) (10.1 mg)の 生成を確認した.

続いて, 41 を 30 μL CHCl<sub>3</sub>に溶解し, SNAC (0.5 μL, 5 μmol) および EDC•HCl (1.0 mg, 5.0 μmol) を添加し, 室温で 1 h 攪拌した. 反応溶液に 70 μL の 0.1 M 希塩酸を添加した 後に, EtOAc で抽出し (x5), 溶媒を減圧留去した. LC-MS 分析により, 化合物 40 また は化合物 42 (LC-MS *m/z* 757 [M-H]<sup>-</sup>) の生成を確認した. 詳細な NMR 分析により, 生成 物は目的の 40 ではなく 42 であることが判明した.

化合物 43 の合成と単離



化合物 41 (20.5 mg, 72.5 µmol) とイミダゾール (63.6 mg, 933.8 µmol) を氷上で 500 µL の DMF に溶解した後に, TBDPS chloride (123 µL, 481.1 µmol) を添加した. 氷浴を取り 外し,室温で 18 h 攪拌した. 反応溶液に H<sub>2</sub>O を加え, EtOAc を用いて抽出し (x5),飽 和食塩水で洗浄した後に,溶媒を減圧留去した. LC-MS 分析により,化合物 43 (LC-MS *m*/z 757 [M-H]<sup>-</sup>) の生成を確認した. その反応混合物をフラッシュシリカゲルカラム クロマトグラフィーに付し,*n*-hexane-EtOAc (6/1) (0.5% 酢酸) で溶出することで 43 (14.2 mg) を得た.

化合物 44 の合成と単離



化合物 43 (14.2 mg, 18.7 µmol) を氷上で 500 µL CHCl<sub>3</sub>に溶解した後に, EDC (4.0 µL, 22.9 µmol) を加え,氷上で 10 min 攪拌した. その溶液に SNAC (2.1 µL, 18.7 µmol) を添加し,氷浴を取り外し,室温で 3h 反応させた.反応溶液に H<sub>2</sub>O を加え, EtOAc を用いて抽出し (x4),飽和食塩水で洗浄した後に,溶媒を減圧留去した. LC-MS 分析により,化合物 44 (LC-MS *m*/*z* 882 [M+Na]<sup>+</sup>)の生成を確認した.その反応混合物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し,CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (9/1)で溶出することで 44 (11.2 mg) を得た.



化合物 44 (9.0 mg, 10.5 μmol) を 400 μL THF に溶解した後に, 200 μL HF · Pyridine を 加え,室温で 12 日間攪拌した.その溶液に対し,適宜 HF · Pyridine (計 150 μL) および 200 μL THF (計 200 μL) を添加した.攪拌後,反応溶液に飽和重曹水を加え, EtOAc を 用いて抽出し (x5),飽和食塩水で洗浄した後に,溶媒を減圧留去した.LC-MS 分析に より,化合物 40 (LC-MS m/z 406 [M+Na]<sup>+</sup>)の生成を確認した.その反応混合物をフラッ シュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (19/1) で溶出すること で 40 (0.9 mg) を得た.

化合物 **40**: ESIMS: *m/z* 384 [M+H]<sup>+</sup>, 406 [M+Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 6.98 (dd, 15.4, 4.2, H-3), 6.38 (dd, 15.4, 1.8, H-2), 5.46 (dt, 15.2, 5.4, H-11), 5.30 (dd, 15.2, 8.6, H-10), 4.30 (m, H-4), 3.81 (m, H-15), 3.46 (m, 2H-2'), 3.09 (d, 6.6, 2H-1'), 2.29 (m, H-9), 2.02 (m, 2H-12), 1.97 (s, 3H-4'), 1.78 (m, H-5), 1.65 (m, 2H-7), 1.54 (m, H-6), 1.47 (m, H-13), 1.40 (m, H-14), 1.39 (m, 2H-8), 1.20 (d, 6.2, 3H-16); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 190.4 (C-1), 170.3 (C-3'), 147.0 (C-3), 134.0 (C-10), 130.9 (C-11), 126.5 (C-2), 72.2 (C-4), 68.0 (C-15), 51.2 (C-5), 45.8 (C-9), 32.4 (C-12), 28.4 (C-1'), 23.5 (C-16), 23.2 (C-4'), (C-6), (C-7), (C-8) (C-13), (C-14).

化合物 45 の合成と単離



化合物 **41** (3.1 mg, 11.0 μmol) を 150 μL MeOH に溶解した後に, TMS-diazomethane (30 μL, *ca*. 18 μmol) を加え, 室温で 15 min 攪拌した. その溶液の溶媒を減圧留去した. その反応混合物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl<sub>3</sub>-MeOH (19/1) で溶出することで化合物 **45** (1.9 mg) を得た. LC-MS 分析により, **45** (LC-MS *m/z* 297 [M+H]<sup>+</sup>) の生成を確認した.

化合物 **45**: ESIMS: m/z 297 [M+H]<sup>+</sup>, 1H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>);  $\delta$  = 7.01 (dd, 15.7, 4.4, H-3), 6.06 (dd, 15.7, 1.8, H-2), 5.46 (dt, 15.3, 6.7, H-11), 5.31 (dd, 15.3, 8.6, H-10), 4.32 (m, H-4), 3.80 (m, H-15), 3.74 (s, H-1'), 2.31 (m, H-9), 2.01 (m, 2H-12), 1.84 (m, Ha-8), 1.77 (m, H-5), 1.67 (m, 2H-6), 1.63 (m, Ha-7), 1.57 (m, Hb-7), 1.49 (m, Ha-13), 1.45 (m, 2H-14), 1.37 (m, Hb-8), 1.19 (d, 6.2, 3H-16).





クルードの**37** (26.3 mg) を200 μL DMEに溶解した後に,2N LiOH水溶液 (200 μL)を 加え,室温で25 h攪拌した.反応溶液に700 μLの1 M希塩酸を加え,pHを2以下にした. その反応混合物をEtOAcで抽出し (x5),飽和食塩水で洗浄した後に,溶媒を減圧留去し た.その反応混合物をフラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し,CHCl<sub>3</sub>-EtOAc (9/1) で溶出することで化合物**36** (10.3 mg) を得た.LC-MS分析により,**36** (LC-MS *m/z* 265 [M-H]<sup>-</sup>) の生成を確認した.

化合物 **36**: ESIMS: *m/z* 265 [M-H]<sup>-</sup>, 1H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD);  $\delta$  = 7.23 (dd, 15.3, 10.6, H-3), 6.26 (dd, 15.2, 10.6, H-4), 6.17 (dt, 15.2, 6.8, H-5), 5.82 (d, 15.3, H-2), 5.45 (m, 4H-10/11), 3.74 (m, H-15), 2.22 (m, 2H-6), 2.04 (m, 4H-9/12), 1.17 (d, 6.2, 3H-16), 1.40-1.52 (m, 8H-7/8/13/14).



Figure S3. AO-*elbABFDC*, *elbABFDC*E<sup>c</sup>を培養したときの培養培地と菌体成分の HPLC クロマトグラム (検出波長 210 nm). コントロールとして,空ベクターを導入した A. *oryzae* NSAR1 と AO-*elbABFD* を用いた.

Transformant name	Plasmid 1	Pladmid 2	Pladmid 3	Pladmid 4
AO-apmlAB	pUARA2-apmIAB			
AO-apmlA+apmlB	pUARA2-apmlA	pUAdeA2-apmIB		
AO-apmlA	pUARA2-apmlA			
AO-akmlAB	pUARA2-akmlAB			
AO-akmlABCD	pUARA2-akmlAB	pUAdeA2-akmlCD		
AO-akmlABC	pUARA2-akmIAB	pUAdeA2-akmIC		
AO-akmlABD	pUARA2-akmlAB	pUAdeA2-akmID		
AO-cimIAB	pUARA2-cimIAB			
AO-cimlABCD	pUARA2-cimIAB	pUAdeA2-cimICD		
AO-cimlABC	pUARA2-cimIAB	pUAdeA2-cimIC		
AO-cimlABD	pUARA2-cimIAB	pUAdeA2-cimID		
AO-pemIAB	pUARA2-pemIAB			
AO-pemIABE	pUARA2-pemIAB	pUAPTRA2-pemIE		
AO-pemIABCD	pUARA2-pemIAB	pUAdeA2-pemICD		
AO-pemIABEC	pUARA2-pemIAB	pUAPTRA2-pemIE	pUAdeA2-pemIC	
AO-pemIABED	pUARA2-pemIAB	pUAPTRA2-pemIE	pUAdeA2-pemID	
AO-pemIABECD	pUARA2-pemIAB	pUAPTRA2-pemIE	pUAdeA2-pemICD	
AO-pemIABEDC	pUARA2-pemIAB	pUAPTRA2-pemIE	pUAdeA2-pemID	pUSA2-pemICF
AO-pemIABEDCF	pUARA2-pemIAB	pUAPTRA2-pemIE	pUAdeA2-pemID	pUSA2-pemIC
AO-mpmIAB	pUARA2-mpmIAB			
AO-mpmIABC	pUARA2-mpmIAB	pUAdeA2-mpmIC		
AO-elbAB	pUARA2-elbAB			
AO-elbABCF	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbCF		
AO-elbABDE	pUARA2-elbAB	pUPTRA2-elbDE		
AO-elbABC	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbC		
AO-elbABF	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbF		
AO-elbABFDE	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbF	pUPTRA2-elbDE	
AO-elbABFD	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbF	pUPTRA2-elbD	
AO-elbABFE	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbF	pUPTRA2-elbE	
AO-elbABFCD	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbF	pUPTRA2-elbD	pUSA2-elbC
AO-elbABFDC°E°	pUARA2-elbAB	pUAdeA2-elbF	pUPTRA2-elbD	pUSA2-elbC <sup>c</sup> E <sup>c</sup>

Table S6. Summary of *A. oryzae* transformants in this study.

Primer name	DNA sequence 5' to 3'	Template strain
apmIA_IFpUKpnI-FW	CCGGAATTCGAGCTCGGCAGACATGTCGGACCATAACC	
apmIA IFpUKpnI-RV	ACTACAGATCCCCGGGATTCAGCCGTACAGTGTAGG	A 11 - 1 - 1 - 1
apmIA-F1	CGAGTACTTCGACTGGATCTG	Artnrinium
apmIA-R1	CAGATCCAGTCGAAGTACTCG	pnaeospermum
apmIB_IFpUNotI-FW	TTTGAGCTAGCGGCCATGATGGGTTTGAGTGAGAAGG	Kemushi-1
apmlB IFpUNotI-RV	<u>GTCACTAGTGCGGCC</u> GACTACATACCGACTCAACG	
akmlA IFpUKpnI-FW	CCGGAATTCGAGCTCGAACATGAACGGTAACATGAATG	
akmlA IFpUKpnI-RV	ACTACAGATCCCCGGCTACCGCACCAATTTGCCCAG	
akmlA-F1	GGTTGCATCTGGCGATGAAGC	
akmlA-R1	GCTTCATCGCCAGATGCAACC	
akmIB IFpUNotI-FW	TTTGAGCTAGCGGCCAAGATGCCTTCCCACCAAAAC	Asperaillus kawachii
akm/B_IFpUNotI-RV	GTCACTAGTGCGGCCAAGATCACTTCTTCCCTTCC	NBRC4308
akm/C_IFpUKpnI-FW	CCGAATTCGAGCTCGAAGATGATACTACTTTTTCG	
akm/C IFpUKpnI-RV	ACTACAGATCCCCGGTAATGCAGTCACCCTACACC	
akm/D_IEpUNotI-EW	TTTGAGCTAGCGGCCGATCATGCCGGCCCCTCATG	
akm/D IFpUNotI-RV	GTCACTAGTGCGGCCGCTGTGTTTACAATGAAAGC	
cimIA IEpUKppI-EW		
cim/A_IEpUKppI-RV		
cimIA-F1	GCTTIGTGAGTGACATCCTG	
cim/A-R1		
cim/B_IEpLINotI_EW	TTEACCTACCCCCAACATCCCCATTTCCAACATC	Colletotrichum
cim/B_IEpUNotI-RV		incanum
		MAFF237190
cimic_in portpin-i W		
cimiC_IEpUNotLEW		
cimiD_IEpUNoti-FW		
perilA_IFpOKphi-RV		
	CONTROLOCOCONTROLADO	
permA-RT		
periliB_IFpONoti-FW		
periliB_IFpUNotI-RV		Ponioillium ovnonoum
periliC_IFpUNoti-FW		
		IFIM 47463
pemiD_IFpUKpnI-Fvv		
periliD_IFp0KpnI-RV		
permiIFpUNoti-FW		
pemie_iFpUNoti-RV		
mpmIA_IFpUKpnI-Fvv		
	ACTACAGATCUCUGGAATCACUCAACACUTCUAUG	
	GUICUICICAAGCATACUIC	Macrophomina
mpmIA-R1		phaseolina
		NBRC 7317
mpmiB_IFpUNotI-RV		
mpmIC_IFpUNotI-FW		
elbA_IFpUKpnI-FW		
elbA_IFpUKpnI-RV		
elbA-F1	CCAIGCGGICAATGCTGTCC	
elbA-R1	GGACAGCATIGACCGCATGG	Eupenicillium ludwiaii
elbB_IFpUNotI-FW		MT-3
eibB_IFpUNotI-RV		
elbC_IFpUKpnI-FW		
elbC_IFpUKpnI-RV	ACTACAGATCCCCGGTCACTTCACCAGCACTCTGAC	
elbD_IFpUKpnI-FW	CCGGAATTCGAGCTCGAAACATGACGATGTATCACC	

## Table S7. List of primers used for cloning of genes in this study.

elbD_IFpUKpnI-RV	ACTACAGATCCCCGGCTAGAGCTTCCTAGTAGTGAGC	
<i>elbE_</i> IFpUNotI-FW	TTTGAGCTAGCGGCCAAAATGTTACCTTTGCTGTTCC	
elbE_IFpUNotI-RV	GTCACTAGTGCGGCCCTTCTATTGGTTTTGCCTGG	
<i>elbF_</i> IFpUNotI-FW	TTTGAGCTAGCGGCCTTGAATATGTTGGCACTGTGG	
elbF_IFpUNotI-RV	GTCACTAGTGCGGCCCTACTTAACGAGAACACGCAC	
<i>elbB_</i> IFpET28a_Ndel_Fw	CGCGCGGCAGCCATATGCCTGGTCGGGAACTTGC	Eupenicillium ludwigii
elbB_IFpET28a_EcoRI_Rv	GACGGAGCTCGAATTGTTTATTTCGCTCGTGGGC	MT-3 (cDNA)

### Table S8. List of primers used for cDNA sequencing in this study.

Primer name	DNA sequence 5' to 3'	Sequenced gene (template strain)	
apmIA_IFpUKpnI-FW	See above		
apmIA_IFpUKpnI-RV	See above		
apmIA-F1	See above		
apmlA-R1	See above		
apmIA_Seq_FW_R1	CCCAAACGAGTTCACACTGG		
apmIA_Seq_FW_R2	CTACCGCAGCAGCAATCTCG		
apmIA_Seq_FW_R3	GTCTACGACACCCGAGTTGG	(AO-apiniAB)	
apmlA_Seq_RV_R1	CCGTCGTGAACAGCTCATCC		
apmlA_Seq_RV_R2	CAGGGAACATGGCTACCACG		
apmlA_Seq_RV_R3	GCTTGGTAGACCGCATAAGC		
apmlA_Seq_RV_R4	TCTTCTCCAGCAGGTCCTCG		
apmIB_IFpUNotI-FW	See above	apmlB <sup>c</sup>	
apmlB_IFpUNotI-RV	See above	(AO-apmIAB)	
elbA_IFpUKpnI-FW	See above		
elbA_IFpUKpnI-RV	See above		
elbA-F1	See above		
elbA-R1	See above		
elbA_Seq_F1	CATGTACTTCAGCCCAGAGC	albAc	
elbA_Seq_F2	GCACGTCATTGTTGAGGACC		
elbA_Seq_F3	AAGAAAGCAGCCATCAGAGC	(E. Iddwigir WIT-SIAO-eibAB)	
elbA_Seq_F4	ATTGAAGGAGGTCGTCAAGG		
elbA_Seq_F5	TCACATCAACCGTATTCAGC		
elbA_Seq_F6	CTCGCGTGATACCTCATTCG		
elbA_Seq_F7	TACGGATCTTGCTGCTTTGG		
elbB_IFpUNotI-FW	See above	elbB <sup>c</sup>	
elbB_IFpUNotI-RV	See above	(E.ludwigii MT-3/AO-elbAB)	
elbC_IFpUKpnI-FW	See above	elbC <sup>c</sup>	
elbC_IFpUKpnI-RV	See above	(E. ludwigii MT-3)	
elbE_IFpUNotI-FW	See above elbE <sup>c</sup>		
elbE_IFpUNotI-RV	See above	(E. ludwigii MT-3)	
T7 promoter	TAATACGACTCACTATAGG	elbB	
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG (E. coli BL21 (DE3)		

### ゲノム PCR



## ゲノム PCR

	Transformants ① AO-pemIAB ② AO-pemIABCD ③ AO-pemIABECD	<ul><li>④ pemlABED</li><li>⑤ pemlABEC</li><li>⑥ pemlABEDC</li></ul>	DNA length pemlA_Fw: 3.9 kb pemlA_Rv: 3.7 kb	<i>pemIB</i> : 1.0 kb <i>pemIC</i> : 1.0 bp	<i>pemID</i> : 1.9 kb <i>pemIE</i> : 1.7 kb
株番号		2 3 4 5 M 1 2 4 kb	<ul> <li>S.₱</li> <li>3 4 5</li> </ul>		∑ M ←1.8 kb ←1.0 kb
2.0 kb → 1.0 kb →	③ <u></u> M 株番号 4 5 7 8	3     C     3       4     5     7     8     4     5	5) <u>5</u> 7 8 M M 2.0 kb → 1.0 kb →	<u>E</u> 123	<u>⊛</u>



## ゲノム PCR





#### Transformants

AO-akmlAB
 AO-akmlABD
 AO-akmlABC
 AO-akmlABCD

#### **DNA length** *akml*A: 0.6 kb *akml*C: 0.5 kb *akml*B: 1.0 kb *akml*D: 0.5 kb



# 謝辞

本研究に際し,始終御懇篤なる御指導,御鞭撻を賜りました東京大学大学院総合文化研究科准教授(現 東北大学大学院薬学研究科教授)浅井禎吾先生に謹んで御礼申し上げます.

副査として本論文の審査にあたり,有益なる御助言を賜り,タンパク質の発現と精製に関して, 御指導,御助言を賜りました東京大学大学院総合文化研究科准教授若杉桂輔先生に深く御礼申し 上げます.

副査として本論文の審査にあたり,有益なる御助言を賜りました東京大学大学院総合文化研究科 教授 新井宗仁 先生に深く御礼申し上げます.

副査として本論文の審査にあたり,有益なる御助言を賜りました東京大学大学院総合文化研究科 教授 村田昌之 先生に深く御礼申し上げます.

副査として本論文の審査にあたり,有益なるご助言を賜りました東京大学大学院総合文化研究科 准教授 吉本敬太郎 先生に深く御礼申し上げます.

本研究を進めるにあたり、細部に至る御指導を賜り、化合物の構造決定に関して御力添えを賜りました東京農工大学大学院工学研究科准教授森啓二先生に深く御礼申し上げます.

NMR スペクトルの測定に関して、御力添えを頂きました理化学研究所放射光科学研究センター NMR 研究開発部門 張恵平 先生に厚く御礼申し上げます.

VCD スペクトルの測定に関して,御力添えを頂きました北海道大学大学院先端生命科学研究院講師 谷口透 先生に厚く御礼申し上げます.

X 線結晶構造解析に関して、御力添えを頂きました大阪大学大学院理学研究科助教 小島達弘 先 生に厚く御礼申し上げます.

糸状菌株およびゲノム DNA を御提供いただきました千葉大学真菌医学研究センター 准教授 矢 口貴志 先生に厚く御礼申し上げます.

麹菌株および発現ベクターを御提供頂きました東北大学大学院農学研究科教授 五味勝也 先生 に厚く御礼申し上げます.

麹菌株および発現ベクターを御提供頂きました東京大学大学院薬学系研究科 准教授 淡川孝義 先生に厚く御礼申し上げます. 麹菌の発現ベクターを御提供頂きました岩手医科大学薬学部教授 藤井敷 先生に厚く御礼申し上 げます.

抗ウイルス活性試験に関して、御力添えを賜りました東北大学大学院医学系研究科教授 児玉栄一 先生、研究員 河治久美 様に厚く御礼申し上げます.

抗菌活性試験に関して,御力添えを賜りました広島大学大学院医歯薬総合研究科教授黒田照夫 先生に厚く御礼申し上げます.

抗真菌活性試験に関して,御力添えを賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授 萩原 大祐 先生に厚く御礼申し上げます.

タンパク質の発現と精製に関して、御力添えを賜りました東京大学大学院総合文化研究科 横沢匠 修士に厚く御礼申し上げます.

公私ともに御支援頂いた東京大学大学院総合文化研究科浅井研究室の先輩,後輩の諸氏に心より 感謝致します.

本研究の期間に必要不可欠な御支援頂いた日本学術振興会ならびに国民の皆様に感謝の意を表し ます.

最後に常に御支援頂き,暖かく見守って頂いた父母および姉妹に心より感謝致します.

## 参考文献

- 1. Cragg, G. M.; Newman, D. J. Biochim. Biophys. Acta. 2013, 1830, 3670-3695.
- 2. Dewick, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, 3rd ed., Wiley, 2009.
- 3. Fleming, A. Novel Lecture, 1945.
- Carter, H. E.; Clark, R. K.; Dickman, S. R.; Loo, Y. H.; Skell, P. S.; Strong, W. A. J. Biol. Chem. 1945, 160, 337-342.
- Burg, R. W.; Miller, B. M.; Baker, E. E.; Birnbaum, J.; Currie, S. A.; Hartman, R.; Kong, Y.; Monaghan, R. L.; Olson, G.; Putter, I.; Tunac, J. B.; Wallick, H.; Stapley, E.; Oiwa, R.; Omura, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1979, 15, 361–367.
- 6. Liao, F. Molecules 2009, 14, 5362-5366.
- Wongsrichanalai, C.; Pickard, A. L.; Wernsdorfer, W. H.; Meshnick, S. R. Lancet. Infect. Dis. 2002, 2, 209-218.
- 8. Marvin, G.; Norbert, N.; Gordon, S. H. J. Am. Chem. Soc. 1959, 81, 4745-4746.
- Wani, M. C.; Taylor, H. L.; Wall, M. E.; Coggon, P.; McPhail, A. T; J. Am. Chem. Soc. 1971, 93, 2325-2327.
- 10. Gold, W.; Stout, H. A.; Pagano, J.F.; Donovick, R. Antibiotics Annual 1955, 3, 579-586.
- Kino, T.; Hatanaka, H.; Hashimoto, M.; Nishiyama, M.; Goto, T.; Okuhara, M.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H. J. Antibiot. 1987, 40, 1249-1255.
- 12. Newman, D. J.; Cragg, G. M. J. Nat. Prod. 2016, 79, 629-661.
- 13. Yim, G.; Wang, H. H.; Davies, J. Phil. Trans. R. Soc. B. 2007, 362, 1195-1200.
- 14. Oxford, A. E.; Raistrick, H.; Simonart, P. Biockem. J. 1939, 33, 240-248.
- 15. Newton, G. G.; Abraham, E. P. Biochem. J. 1956, 62, 651-658.
- Dreyfuss, M; Hani, E.; Hofmann, H.; Kobel, H.; Pachc. W.; Tscherter, H. *Eur. J. Appl. Microbiol.* **1976**, *3*, 125-133.

- Alberts, A.W.; Chen, J.; Kuron, G.; Hunt, V.; Huff, J.; Hoffman, C.; Rothrock, J.; Lopez, M.; Joshua, H.; Harris, E.; Patchett, A.; Monaghan, R.; Currie, S.; Stapley, E.; Albers-Schonberg, G.; Hensens, O.; Hirshfield, J.; Hoogsteen, K.; Liesch, J.; Springer, *J. Proc. Natl. Acad. Sci.* 1980, 77, 3957-3961.
- Kong, D. X.; Guo, M. Y.; Xiao, Z. H.; Chen, L. L.; Zhang, H. Y. Chem. Biodivers. 2011, 8, 1968-1977.
- 19. Keller, N. P.; Turner, G.; Bennett, J. W. Nat. Rev. Microbiol. 2005, 3, 937-947.
- 20. Fischbach, M. A.; Walsh, C. T. Chem. Rev. 2006, 106, 3468-3496.
- 21. Walsh, C. T. Science 2004, 303, 1805-1810.
- 22. Schmidt-Dannert, C. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 2015, 148, 19-61.
- 23. Dirk, Hoffmeister.; Keller, N. P. Nat. Prod. Rep. 2007, 24, 393-416.
- Hamed, R. B.; Gomez-Castellanos, J. R.; Henry, L.; Docho, C.; MacDonough, M. A.; Schofield, C. J. Nat. Prod. Rep. 2013, 30, 21-107.
- 25. Sanchez, J. F.; Somoza, A. D.; Keller, N. P.; Wang, C. C. Nat. Prod. Rep. 2012, 29, 351-371.
- Tammi, C. V.; Jane, L. N.; Sebastian, T.; Jens C. F.; Thomas, O. L.; Kristian, F. N.; Jakob, B. H.; Julian, B.; Asaf, S.; Robert, R.; John, M. G.; Pallavi, P.; Morten, T. N.; Ellen, K. L.; Martin, E. K.; Kimchi, S.; Erin, M.; Kerrie, B.; Alicia, C.; Cindy, C.; Kurt, L.; Sajeet, H.; Matt, N.; Laura, S.; Alan, K.; Anna, L.; Matthieu, H.; Elodie, D.; Adrian, T.; Jon, K. M.; Bernard, H.; Ad, W.; Blake, A. S.; Miia R. M.; Ronald, P. V.; Igor, V. G.; Uffe, H. M.; Scott, E. B.; Mikael, R. A. *Nat. Genet.* 2018, *50*, 1688-1695.
- Inglis, D. O.; Binkley, J.; Skrzypek, M. S.; Arnaud, M. B.; Cerqueira, G. C.; Shah, P.;
   Wymore, F.; Wortman, J. R.; Sherlock, G. A. *BMC Microbiol.* 2013, 13, 91.
- 28. Hawksworth, D. L.; Lücking, R. A. Microbiol. Spectr. 2017, 5.
- 29. Ziemert, N.; Alanjary, M.; Weber, T. Nat. Prod. Rep. 2016, 33, 988-1005.
- Marnix, H. M.; Kai, B.; Peter, C.; Victor, J.; Piotr, Z.; Michael, A. F.; Tilmann, W.; Eriko, T.; Rainer, B. *Nucleic Acids Res.* 2011, *39*, W339–W346.

- Khaldi, N.; Seifuddin, F. T.; Turner, G.; Haft, D.; Nierman, W. C. Wolfe, K. H. Fedorova, N. D. Fungal. Genet. Biol. 2010, 47, 736–741.
- Tran, P. N.; Yen, M. R.; Chiang, C. Y.; Lin, H. C.; Chen, P. Y. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019, 103, 3277-3287.
- Hang, L.; Tang, M. C.; Harvey, C. J. B.; Page, C. G.; Li, J.; Hung, Y. S.; Liu, N.; Hillenmeyer, M. E.; Tang, Y. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 2017, 56, 9556-9560.
- Tang, M. C.; Fischer, C. R.; Chari, J. V.; Tan, D.; Suresh, S.; Chu, A.; Miranda, M.; Smith,
   J.; Zhang, Z.; Garg, N. K.; St Onge, R. P.; Tang, Y. J. Am. Chem. Soc. 2019, 141, 8198-8206.
- Baccile, J. A.; Spraker, J. E.; Le, H. H.; Brandenburger, E.; Gomez, C.; Bok, J. W.; Macheleidt, J.; Brakhage, A. A.; Hoffmeister, D.; Keller, N. P.; Schroeder, F. C. *Nat. Chem. Biol.* 2016, *12*, 419-424.
- 36. 塚田健人,平成 30 年度博士論文(麹菌異種発現系を基盤とする多様な擬天然型ポリ ケタイドの半合成およびジテルペノイドピロン類コンビナトリアル生合成).
- Kaneko, A.; Morishita, Y.; Tsukada, K.; Taniguchi, T.; Asai, T. Org. Biomol. Chem. 2019, 17, 5239-5243.
- 38. Meyer, V. Biotechnol. Adv. 2008, 26, 177-185.
- 39. Alberti, F.; Foster, G. D.; Bailey, A. M. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017, 101, 493-500.
- 40. Heneghan, M. N.; Yakasai, A. A.; Halo, L. M.; Song, Z.;Bailey, A. M.; Simpson, T. J.; Cox,
  R. J.; Lazarus, C. M. *ChemBioChem* 2010, *11*, 1508-1512.
- 41. Fujii, R.; Minami, A.; Tsukagoshi, T.; Sato, N.; Sahara, T.; Ohgiya, S.; Gomi, K.; Oikawa, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011, 75, 1813-1817.
- 42. Matsuda, Y.; Wakimoto, T.; Mori, T.; Awakawa, T.; Abe, I. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 15326-15336.
- Narita, K.; Minami, A.; Ozaki, T.; Liu, C.; Kodama, M.; Oikawa, H. J. Org. Chem. 2018, 83, 7042-7048.
- 44. Cichewicz, R. H. Nat. Prod. Rep. 2010, 27, 11-22.

- 45. Asai, T.; Yamamoto, T.; Oshima, Y. Tetrahedron Lett. 2011, 52, 7042-7045.
- Asai, T.; Yamamoto, T.; Chung, Y. M.; Chang, F. R.; Wu, Y. C.; Yamashita, K.; Oshima, Y. *Tetrahedron Lett.* 2012, *53*, 277-280.
- Asai, T.; Chung, Y. M.; Sakurai, H.; Ozeki, T.; Chang, F. R.; Yamashita K.; Oshima, Y. Org. Lett. 2012, 14, 513-515.
- 48. Asai, T.; Morita, S.; Taniguchi, T.; Monde, K.; Oshima, Y. Org. Biomol. Chem. 2016, 14, 646-651.
- Morishita, Y.; Okazaki, Y.; Luo, Y. Y.; Nunoki, J.; Taniguchi, T.; Oshima, Y.; Asai, T. Org. Biomol. Chem. 2019, 17, 780A.
- Jiang, T.; Wang, M.; Li, L.; Si, J.; Song, B.; Zhou, C.; Yu, M.; Wang, X.; Zhang, Y.; Ding,
   G.; Zou, Z. J. Nat. Prod. 2016, 79, 2487-2494.
- Harvey, C. J. B.; Tang, M.; Schlecht, U.; Horecka, J.; Fischer, C. R.; Lin, J.; Li, H. C.; Naughton, B.; Cherry, J.; Miranda, M.; Li, Y. F.; Chu, A. M.; Hennessy, J. R.; Vandova, G. A.; Inglis, D.; Aiyar, R. S.; Steinmetz, L. M.; Davis, R. W.; Medema, M. H.; Sattely, E.; Khosla, C.; St. Onge, R. P.; Tang, Y.; Hillenmeyer, M. E. *Sci. Adv.* 2018, *4*, eaar5459.
- Clevenger, K. D.; Bok, J. W.; Ye, R.; Miley, G. P.; Verdan, M. H.; Velk, T.; Chen, C.; Yang,
   K.; Robey, M. T.; Gao, P.; Lamprecht, M.; Thomas, P. M.; Islam, M. N.; Palmer, J. M.;
   Wu, C. C.; Keller, N. P.; Kelleher, N. L. *Nat. Chem. Biol.* 2017, *13*, 895-901.
- 53. Nozawa, K.; Nakajima, S. J. Nat. Prod. 1979, 42, 374-377.
- 54. Ichihara, A.; Tazaki, H.; Sakamura, S. Tetrahedron Lett. 1983, 24, 5373-5376.
- 55. Herbst, D. A.; Townsend, C. A.; Maier, T. A. Nat. Prod. Rep. 2018, 35, 1046-1069.
- 56. Gerber, R.; Lou, L.; Du, L. A. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 3148-3149.
- Kasahara, K.; Miyamoto, T.; Fujimoto, T.; Oguri, H.; Tokiwano, T.; Oikawa, H.; Ebizuka,
   Y.; Fujii, I. *ChemBioChem* 2010, *11*, 1245-1252.
- Lin, H. C.; Chooi, Y. H.; Dhingra, S.; Xu, W.; Calvo, A. M.; Tang, Y. J. Am. Chem. Soc.
   2013, 135, 4616-4619.

- Chiang, Y. M.; Szewczyk, E.; Davidson, A. D.; Keller, N.; Oakley, B. R.; Wang, C. C. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 2965-2970.
- Kim, Y. T.; Lee, Y. R.; Jin, J.; Han, K. H.; Kim, H.; Kim, J. C.; Lee, T.; Yun, S. H.; Lee, Y. W. *Mol. Microbiol.* 2005, *58*, 1102-1113.
- Ackland, M.; Hanson, J R.; Hitchcock, P. B.; Ratcliffe, A. H. J. Chem. Soc. PERKIN TRANS. 1 1985, 843-847.
- Surup, F.; Kuhnert, E.; Böhm, A.; Pendzialek, T.; Solga, D.; Wiebach, V.; Engler, H. Berkessel, A.; Stadler, M.; Kalesse, M. Chem. Eur. J. 2018, 20, 2200-2213,
- 63. Singleton, V. L.; Bohonos, N.; Ullstrup, A. J. Nature 1958, 181, 1072-1073.
- Hosoe, T.; Fukushima, K.; Takizawa, K.; Itabashi, T.; Kawahara, N.; Vidotto, V.; Kawai, K.
   *J. Antibiot.* 2006, *59*, 597-600.
- 65. 布木純 平成24年度特別実習報告書 (エピジェネティック制御に基づく天然物探索 に有用な微生物資源の開拓 –植物や節足動物の内生糸状菌の探索)
- Li, C.; Montgomery, M. G.; Mohammed, F.; Li, J. J.; Wood, S. P.; Bugg, T. D. J. Mol. Biol.
   2005, 346, 241-251.
- Irschik, H.; Schummer, D.; Höfle, G.; Reichenbach, H.; Steinmetz, H.; Jansen, R. J. Nat. Prod. 2007, 70, 1060-1063.
- Jansen, R.; Reifenstahl, G.; Gerth, K.; Reichenbach, H.; Höfle, G. Liebigs Ann. Chem. 1983, 1081-1095.
- 69. Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y.; Kakisawa, H. J. Am. Chem. Soc. 1991, 113, 4092-4096.
- Li, H.; Gilchrist, C. L. M.; Lacey, H. J.; Crombie, A.; Vuong, D.; Pitt, J. I.; Lacey, E.; Chooi,
   Y. H.; Piggott, A. M. Org. Lett. 2019, 21, 1287-1291.
- 71. Thomas, A. H.; Newland, P.; Sharma, N. R. Analyst. 1982, 107, 849-854.
- 72. Croatt, M. P.; Carreira, E. M. Org. Lett. 2011, 13, 1390-1393.
- 73. Matsumori, N.; Sawada, Y.; Murata, M. J. Am. Chem. Soc. 2005, 127, 10667-10675.

- 74. Oller-L'opez, J. L.; Iranzo, M.; Mormeneo, S.; Oliver, E.; Cuerva, J. M.; Oltra, J. E.; Oltra, J. E. Org. Biomol. Chem. 2005, 3, 1172-1173.
- Meyer, W. L.; Schweizer, W. B.; Beck, A. K.; Scheifele, W.; Seebach, D.; Schreiber, S. L.;
   Kelly, S. E. *Helv. Chim. Acta.* 1987, 70, 281-291.
- Rukachaisirikul, V.; Pramjit, S.; Pakawatchai, C.; Isaka, M.; Supothina, S. J. Nat. Prod. 2004, 67, 1953-1955.
- 77. Ishida, T.; Wada, K. J.C.S. Chem. Commun. 1975, 209-210.
- 78. 山本崇史 平成27年度博士論文 (エピジェネティック制御およびリボソーム標的薬 剤耐性変異を鍵とする糸状菌由来新規二次代謝物の探索)
- 79. Kim, H. L.; Kochevar, J. A. Gen Pharmacol. 1995, 26, 363-364.
- Chu, M.; Mierzwa, R.; Xu, L.; He, L.; Terracciano, J.; Patel, M.; Gullo, V.; Black, T.; Zhao,
   W.; Chan, T. M.; McPhail, A. T. *J. Nat. Prod.* 2003, *66*, 1527-1530.
- 81. Nukina, M.; Sassa, T.; Ikeda, M. Tetrahedron Lett. 1980, 21, 301-302.
- 82. Zabala, A. O.; Chooi, Y. H.; Choi, M. S.; Lin, H. C.; Tang, Y. ACS Chem. Biol. 2014, 9, 1576-1586.
- 83. Semeiks, J.; Borek, D.; Otwinowski, Z.; Grishin, N. V. BMC Genomics. 2014, 15, 590.
- Burrell, R. A.; McClelland, S. E.; Endesfelder, D.; Groth, P.; Weller, M. C.; Shaikh, N.; Domingo, E.; Kanu, N.; Dewhurst, S. M.; Gronroos, E.; Chew, S. K.; Rowan, A. J.; Schenk, A.; Sheffer, M.; Howell, M.; Kschischo, M.; Behrens, A.; Helleday, T.; Bartek, J.; Tomlinson, I. P.; Swanton, C. A. *Nature* 2013, 494, 492-496.
- Hong, Y.; Maeda, Y.; Watanabe, R.; Ohishi, K.; Mishkind, M.; Riezman, H.; Kinoshita, T.
   A. J. Biol. Chem. 1999, 274, 35099-35106.
- Gaynor, E.C.; Mondésert, G.; Grimme, S. J.; Reed, S. I.; Orlean, P.; Emr, S. D. Mol. Biol. Cell 1999, 10, 627-648.
- Kozone, I.; Ueda, J.; Watanabe, M.; Nogami, S.; Nagai, A.; Inaba, S.; Ohya, Y.; Takagi, M.;
   Shin-ya, K. *J. Antibiot.* 2009, *62*, 159-162.
- 88. Kitagawa, A.; Hosoe, T.; Kawai, K.; Kitagawa, H.; Kawai, K. JSM Mycotoxins 2019, 69, 65-69.

- 89. Hirota, A.; Sakai, H.; Isogai, A. Agric. Biol Chern. 1985, 49, 731-735.
- 90. Sekiguchi, J.; Kuroda, H.; Yamada, Y.; Okada, H. Tetrahedron Lett. 1985, 26, 2341-2342.
- 91. Rodphaya, D.; Sekiguchi, J.; Yamada, Y. J. Antibiot. 1986, 39, 629-635.
- 92. Shushni, M. A.; Singh, R.; Mentel, R.; Lindequist, U. Mar. Drugs 2011, 9, 844-851.
- Persich, P.; Llaveria, J.; Lhermet, R.; Haro, T.; Stade, R.; Kondoh, A.; Fürstner, A. *Chemistry* 2013, 23, 13047-13058.
- 94. Hu, Z. F.; Qin, L. L.; Ding, W. J.; Liu, Y.; Ma, Z. J. Nat. Prod. Res. 2016, 30, 2311-2315.
- 95. Cheng, X.; Yu, L.; Wang, Q.; Ding, W.; Chen, Z.; Ma, Z. Nat. Prod. Res. 2018, 32, 282-286.
- 96. Betina, V. Folia Microbiol. 1992, 37, 3-11.
- 97. Nebenführ, A.; Ritzenthaler, C.; David G. Robinson Plant Physiology, 2002, 130, 1102-1108.
- 98. Betina, V. Neoplasma 1969, 16, 23-32.
- 99. Maynell, L. A.; Kirkegaard, K.; Klymkowsky, M. W.; J. Virol. 1992, 66, 1985-1994.
- 100. Misumi, Y.; Miki, A.; Takatsuki, A.; Tamura, G.; Ikehara, Y. J. Biol. Chem. 1986, 261, 11398-11403.
- 101. Fujiwara, T.; Oda, K.; Yokota, S.; Takatsuki, A.; Ikehara, Y. J. Biol. Chem. 1988, 263, 18545-18552.
- 102. Paek, S. M. Mar. Drugs 2018, 16, 133.
- 103. Su'etsugu, M.; Takada, H.; Katayama, T.; Tsujimoto, H. Nucleic Acids Res. 2017, 45, 11525-11534.
- 104. Zhang, G.; Li, Y.; Fang, L.; Pfeifer, B. A. Sci. Adv. 2015, 1, 500077.
- 105. Jin, F. J.; Maruyama, J.; Juvvadi, P. R.; Arioka, M.; Kitamoto, K. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004, 68, 656-662.

# 発表論文リスト

1. <u>Yohei Morishita</u><sup>a</sup>, Huiping Zhang<sup>b</sup>, Tohru Taniguchi<sup>c</sup>, Keiji Mori<sup>d</sup>, Teigo Asai<sup>a</sup>

"The Discovery of Fungal Polyene Macrolides via a Postgenomic Approach Reveals a Polyketide Macrocyclization by *trans*-Acting Thioesterase in Fungi"

Organic Letters (ACS Publications), Volume 21, Issue 12, pp4788-4792, 2019.

(<sup>a</sup>Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, <sup>b</sup>Faculty of Advanced Life Science, Frontier Research Center for Post-Genome Science and Technology, <sup>c</sup>Faculty of Advanced Life Science, Frontier Research Center for Post-Genome Science and Technology, <sup>d</sup>Department of Applied Chemistry, Graduate School of Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology )