

博 士 論 文

抗炎症性ペプチド(-)-ditryptophenaline の生合成研究

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科

博士論文である。

2014 年 3 月

猿渡隆佳

Biosynthetic study of (–)-ditryptophenaline

March, 2011

Takayoshi SARUWATARI

略語及び語句の定義

AcOEt	: ethyl acetate
Amp ^r	: ampicillin resistance gene, β -lactamase gene
CD	: chemically defined
cDNA	: complementary DNA
CHCl ₃	: chloroform
[CoCl(PPh ₃) ₃]	: chlorotris(triphenylphosphine)cobalt(I)
DBF	: (–)-dibrevianamide F
DPPE	: 1,2-bis(diphenylphosphino)ethane
DMA	: dimethylacetoamide
DTP	: (–)-ditryptophenaline
dtpA	: DTP biosynthetic gene (NRPS)
dtpB	: DTP biosynthetic gene (methyl transferase)
dtpC	: DTP biosynthetic gene (P450)
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
Gal	: galactose
6 x His	: 6 x histidine tag
<i>HIS3</i>	: imidazoleglycerol-phosphate dehydratase that catalyzes the sixth step in the histidine biosynthesis
HPLC	: high performance liquid chromatography
LC-MS	: liquid chromatography-mass spectrometry
<i>LEU2</i>	: β -isopropylmalate dehydrogenase (IMDH) that catalyzes the third step in the leucine biosynthesis pathway
<i>LEU2d</i>	: β -isopropylmalate dehydrogenase (IMDH) that catalyzes the third step in the leucine biosynthesis pathway, deletion mutant gene
2 micron	: 2 micron origin
mRNA	: messenger RNA
MeCN	: acetonitrile
MeOH	: methanol
NiI ₂ ·6H ₂ O	: nickel(II)iodide hexahydrate
NMR	: nuclear magnetic resonance
NRPS	: nonribosomal peptide synthetase
NRPs	: nonribosomal peptides
ORF	: open reading frame
pBR322	: pBR322 origin
PCR	: polymerase chain reaction
PDA	: photodiode array

PEG	: polyethylene glycol
PKS	: polyketide synthase
PKs	: polyketides
pRS423	: YE-type (episomal) shuttle vector encoding the beta-galactosidase alpha peptide. The order of the major features in this plasmid is:ori (f1) - lacZ - T7 promoter - MCS (KpnI-SacI) - T3 promoter - lacI – ori (pMB1) - ampR - ori (2 micron) - HIS3.
pRS426	: YE-type (episomal) shuttle vector encoding the beta-galactosidase alpha peptide. The order of the major features in this plasmid is:ori (f1) - lacZ - T7 promoter - MCS (KpnI-SacI) - T3 promoter - lacI – ori (pMB1) - ampR - ori (2 micron) - URA3.
rt	: room temperature
RT	: retention time
SD	: standard deviation
SIM	: selected ion monitoring
sssDNA	: salmon sperm single strand DNA
TADH	: alcohol dehydrogenase terminator
TFA	: trifluoroacetic acid
TTFA	: thallium(III) trifluoroacetate
URA3	: orotidine-5'-phosphate (OMP) decarboxylase that catalyzes the sixth enzymatic step in the <i>de novo</i> biosynthesis of pyrimidines
UV	: ultraviolet
YPD	: yeast peptone dextrose

培地及び試薬の組成

LB 培地	: 1% Bacto Trypton, 0.5% Yeast Extract, 1%NaCl (pH 7.2)
LB/Carb	: 1% Bacto Trypton, 0.5% Yeast Extract, 1%NaCl (pH 7.2) , 0.1% carbenicillin
SOC 培地	: 2% Bacto Trypton, 0.5% Yeast Extract, 0.5%NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM glucose, 500 mM NaOH
SC/His	: 0.67% YNB with ammonium sulfate, 0.2% drop out mix without histidine, 2% glucose
SC/Ura	: 0.67% YNB with ammonium sulfate, 0.2% drop out mix without uracil, 2% glucose
SC/His, Leu, Ura	: 0.67% YNB with ammonium sulfate, 0.2% drop out mix without histidine, Leucine, Uracil, 2% glucose
Dropout mix	: Adenine 0.5 g, Alanine 2.0 g, Arginine 2.0 g, Asparagine 2.0 g, Aspartic acid 2.0 g, Cysteine 2.0 g, Glutamine 2.0 g, Glutamic acid 2.0 g, Glycine 2.0 g, Histidine 2.0 g, Inositol 2.0 g, Isoleucine 2.0 g, Leucine 10.0 g, Lysine 2.0 g, Methionine 2.0 g, <i>p</i> -aminobenzoic acid 2.0 g, Phenylalanine 2.0 g, Proline 2.0 g, Serine 2.0 g, Threonine 2.0 g, Tryptophan 2.0 g, Tyrosine 2.0 g, Uracil 2.0 g, Valine 2.0 g, Total weight 54 g
YPD 培地	: 2% glucose, 2% Bacto pepton, 1% Yeast extract, pH 5.6-6.0
CD 培地	: NaNO ₃ 6.0 g/L, KCl 0.52 g/L, KH ₂ PO ₄ 1.52 g/L, 2 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O, <i>D</i> -Glucose 10 g/L, Trace elements solution* 1mL/L,
CD/UU 培地	: CD 培地 + 0.5% Uridine, 0.1% Uracil
CD/starch 培地	: NaNO ₃ 6.0 g/L, KCl 0.52 g/L, KH ₂ PO ₄ 1.52 g/L, 2 mM MgSO ₄ · 7H ₂ O, starch 10 g/L, Trace elements solution* 1mL/L,
Trace elements solution	: FeSO ₄ · 7H ₂ O 1 g/L, ZnSO ₄ · 7H ₂ O 8.8 g/L, CuSO ₄ · 5H ₂ O 0.4 g/L, Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O 0.1 g/L, (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O 0.05 g/L
Lytic buffer	: 0.8M NaCl, 100mM Na ₂ HPO ₄ 12 mL/L, 100mM NaH ₂ PO ₄ 88 mL/L
Solution 1	: 1 M sorbitol, 0.1M Na ₂ EDTA (pH 7.5)
Solution 2	: 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM Na ₂ EDTA, 0.5M EDTA (pH8.0)
STC buffer	: 1M Sorbitol, 10mM CaCl ₂ , 10mM Tris-HCl
TE buffer	: 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
TAE buffer	: 1 mM EDTA, 40 mM Tris-acetate (pH 8.0)

ミクロソーム画分調製試薬

TE buffer : 50 mM Tris-HCl(pH 7.4), 1 mM EDTA

TEK buffer : 0.1 M KCl / TE buffer

TES B buffer : 0.6 M sorbitol, 1 mM PMSF / TE buffer

TEG buffer : 20% glycerol / TE buffer

1% Tween 20 または 1% Nonidet P-40 を加えたものも用意した

宿主

BY4741 : *Saccharomyces cerevisiae* [genotype, *Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*]

SCKW-5 : *S. cerevisiae* [genotype, *Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FCY1::matB npgA*]

XL1 blue : *Escherichia coli* [genotype, *hsdR17, supE44, recA1, endA1, gyrA46, thi, relA1, lac/F'* [proAB⁺, lac I^q, lacZ Δ M15:: Tn10 (tet^r)]]

NBRC 4186 : *Aspergillus flavus*

A1421 : *A. flavus* [CA14 deltaKu70 delta PyrG]

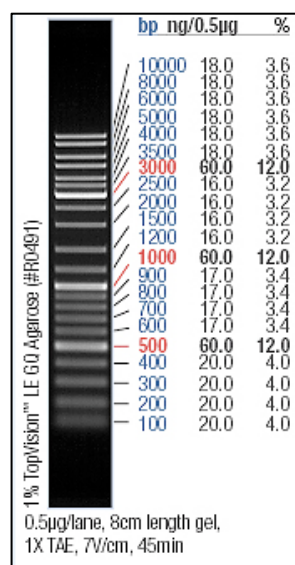
A1179 : *Aspergillus. niger* [Delta kusA pyrG-]

本実験で用いた分子量マーカー

1. DNA 電気泳動用マーカー

Fermentas 社製

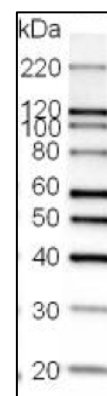
DNA Ladder mix



2. Western blotting 用染色マーカー

Invitrogen 社製 MagicMark XP

ウェスタンプロテインスタンダード



目次

第1章 序論

第1節 ポリケチド化合物とペプチド化合物	1
第2節 二量体化ジケトピペラジン類	5
第3節 参考文献	9

第2章 (-)-ditryptophenaline 生産能力の確認

第1節 緒言	12
第2節 (-)-ditryptophenaline 生産能力の確認	13
第3節 (-)-ditryptophenaline の単離・構造決定	14
第4節 考察	15
第5節 実験項	16
第6節 NMR データ	18
第7節 参考文献	22

第3章 (-)-ditryptophenaline 生合成遺伝子クラスターの推定および遺伝子破壊による同定

第1節 緒言	23
第2節 予想生合成遺伝子破壊株生産化合物の解析	25
第3節 考察	27
第4節 実験項	28
第5節 NMR データ	32
第6節 参考文献	36

第4章 dtpA および dtpB の異種発現による *in vivo* 実験

第1節 緒言	37
第2節 出芽酵母 SCKW-5 における dtpA の異種発現	38
第3節 糸状菌 <i>Aspergillus niger</i> における dtpA および dtpB の異種発現	39
第4節 考察	42
第5節 実験項	43
第6節 NMR データ	48
第7節 参考文献	56

第5章 *in vivo* 実験による dtpC の酵素機能解析

第1節 緒言	57
第2節 dtpC の ORF の決定	58
第3節 出芽酵母 SCKW-5 による化合物 10 の bioconversion 実験	
第1項 DtpC の物性予測および発現宿主の選択	60

第2項 異種発現ベクターの作成	62
第3項 ウエスタンブロッティングによる dtpC の発現確認	63
第4項 DtpC による 10 の bioconversion 実験	64
第4節 考察	65
第5節 実験項	66
第6節 参考文献	68
 第6章 <i>in vitro</i> 実験による DtpC の酵素機能解析	
第1節 緒言	69
第2節 ミクロソーム画分による dtpC の <i>in vitro</i> 酵素反応実験	
第1項 DtpC による化合物 10 の変換反応	70
第2項 10 アナログ (brevianamide F) を用いた dtpC の <i>in vitro</i> 酵素反応	71
第3節 考察	74
第4節 実験項	76
第5節 NMR・X線結晶構造解析データ	78
第6節 参考文献	93
 第7章 dtpC が合成する微量成分の解析	
第1節 緒言	94
第2節 ftmA および dtpC 共発現系の構築	94
第3節 (–)-dibrevianamide F (2) 類縁体の合成と単離精製	95
第4節 (–)-dibrevianamide F (2) 類縁体の構造解析	96
第5節 考察	97
第6節 実験項	100
第7節 NMR データ	102
第8節 参考文献	112
 第8章 総括	113
 謝辞	114

第1章 序論

第1節 ポリケチド化合物とペプチド化合物

天然に存在する放線菌を中心としたバクテリアや、一般的にカビとして認識されている真菌からはこれまでに多くの有用化合物が単離されており、現在も医薬品として活躍するものが数多く存在する。これらの中でも、酢酸マロン酸経路で生じる酢酸単位の縮合反応によって生成されるポリケトメチレン鎖に由来するポリケチド化合物 (PKs) や、アミノ酸の縮合によって生成されるペプチド系化合物の種類の多さと生物活性の強さは特筆に値する。ポリケチド化合物の例としてマクロライド系抗生物質 erythromycin A、脂質異常症改善薬 lovastatin、カビ毒の aflatoxin B₁ 等が知られ、ペプチド化合物としては、 β -ラクタム系抗生物質 penicillin G、免疫抑制剤 cyclosporin などが知られている (Fig. 1-1)。

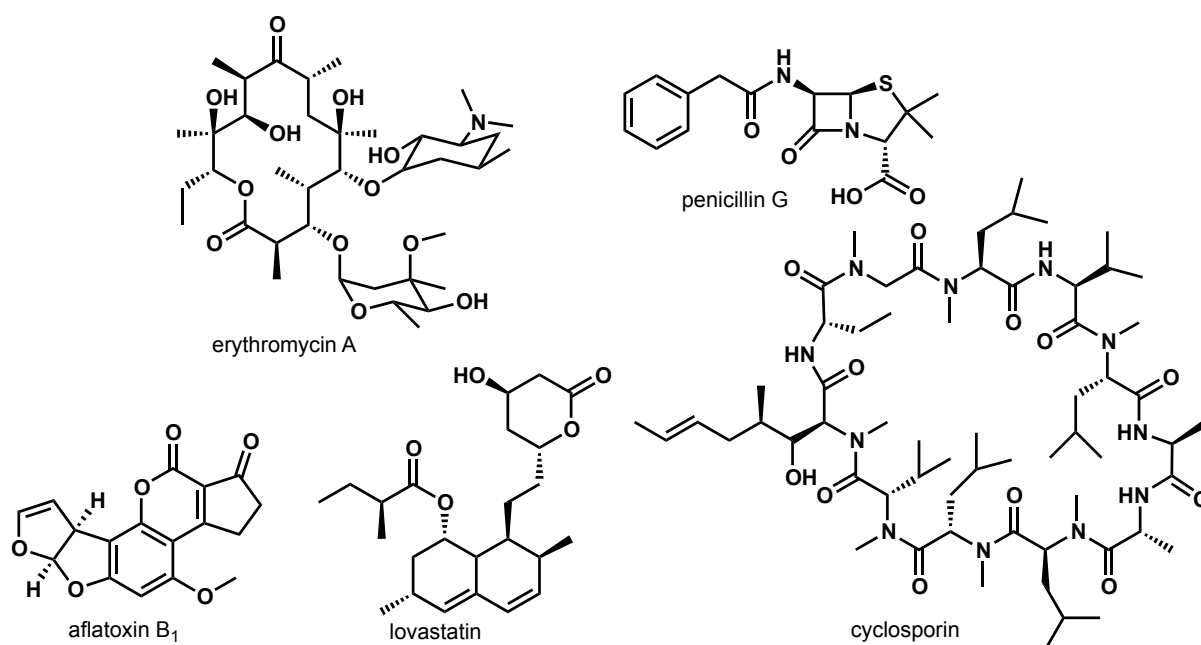


Fig. 1-1 微生物が生産するポリケチド化合物およびペプチド化合物

ポリケチド化合物は、生体内でポリケチド合成酵素 (PKS) によって生合成される。PKS は分子進化的には脂肪酸合成酵素と同一の起源を持つものとして考えられており、大別して I 型から III 型に分類される。

I 型 PKS はさらにモジュール型 (module) と繰り返し型 (iterative) の 2 種類に分けることができる。I 型 PKS は酵素反応を触媒する各反応の活性中心 (ドメイン) が 1 本あるいは複数の酵素タンパク質上に存在する大きな多機能型酵素である。II 型 PKS は、I 型 PKS において一つの酵素に存在する各ドメインが個々のペプチドに分かれたもの (サブユニット) であると言える。通常出発単位

となる基質としてはアセチル CoA やプロピオニル CoA が、また主な伸長単位としては、マロニル CoA やメチルマロニル CoA が基質となる。

モジュール型 I 型 PKS (Fig. 1-2) は炭素鎖伸長サイクルごとに、ケト還元酵素、脱水酵素、エノイル還元酵素の存在に応じて縮合反応により生成した β -ケト基を保持、あるいは水酸基、二重結合へ修飾し、さらに二重結合の還元も行う。1 サイクルの縮合と続く各反応を触媒する活性中心が並ぶ PKS 上の領域はモジュールと呼ばれ、このモジュールにより、生成物であるポリケチドの炭素骨格の化学構造が決定される。代表的な化合物として、マクロライド系抗生物質であるエリスロマイシン等が知られている。これに対し繰り返し型 I 型 PKS は主に真菌において見出された PKS であり、モジュール型 I 型 PKS と同様に複数のドメイン、モジュール構造を持つ。モジュール型 I 型 PKS との大きな違いは、1 つのモジュールがポリケトメチレン鎖伸長反応を複数回触媒し、化合物を生成する。ポリケトメチレン鎖の伸長回数やドメインの選択規則性は不明である。代表的な化合物として強力なカビ毒であるアフラトキシン B1 等が知られている。

これら I 型 PKS の最小のモジュールは β -ケトアシル合成酵素 (KS)、アシル基転移酵素 (AT) とアシルキャリアープロテイン (ACP) をドメインとして含み、炭素数 2 個を増炭する。AT が持つ基質特異性によって、基質となるアシル-CoA が決定される。各縮合反応後の β 位の酸化状態は、そのモジュールに β -ケトアシル還元酵素 (KR) か、KR+脱水酵素 (DH) か、あるいは KR+DH+エノイル還元酵素 (ER) が存在するかによって決定される。この一連の反応は、酵素からポリケチド鎖を切り離し閉環させるチオエステラーゼ (TE) の反応により完了する。全体として、AT の特異性と各モジュールの触媒ドメインの構成により伸長単位の化学構造と立体化学が、また、モジュールの並び方により伸長単位の順が、そしてモジュールの数によりポリケチド鎖の鎖長が決まる。

一方 II 型 PKS (Fig. 1-3) では β -ケト基のほとんどが反応中そのまま保持され、反応性の高いポリ- β -鎖が、酵素による分子内閉環反応を受け様々な構造の芳香族化合物を生成する。KS の 2 つのサブユニットと、ポリケチドと直接共有結合を形成する ACP の 3 つのタンパク質で PKS としての最小単位を構成している。これに KR、環化酵素 (CYC)、芳香族化酵素 (ARO) などの酵素が加わって、ポリケチド鎖が修飾を受け、閉環反応後生成物を与える。

III 型 PKS (Fig. 1-4) はカルコン合成酵素 (CHS) に代表される PKS で KS のみから構成される。フラボノイドやスチルベンのようなポリフェノール化合物の多くは III 型 PKS により生合成されることが明らかとなっている。

これに対し、微生物の二次代謝産物に含まれるペプチド系化合物の多くが、非リボソーム依存性ペプチド合成酵素 (NRPS) (Fig. 1-5) によって合成されている。NRPS は I 型 PKS と同様のモジュール構造を持ち、PKS がポリケトメチレン鎖を伸長するのに対し、NRPS はペプチド鎖を伸長する。そのモジュールの内部も I 型 PKS に類似しており、I 型 PKS の最小モジュールが KS、AT、ACP から構成されるのに対し、NRPS ではアデニル化ドメイン (A)、ペプチジルキャリアープロテイン (PCP)、および縮合 (C) または伸長ドメインからなっている。A ドメインの基質特異性によって伸長単位となるアミノ酸が決定され、アデニル化された後、PCP ドメインに運搬され、アミノアシルチオエステル中間体を形成する。隣接したアミノアシルチオエステルのアミノ基による求核攻撃が C ドメインにより触媒されペプチド結合を形成する。この NRPS により合成される非リボソーム性ペプチド (NRPs) はコドンにコードされていないアミノ酸を含む場合も多い。

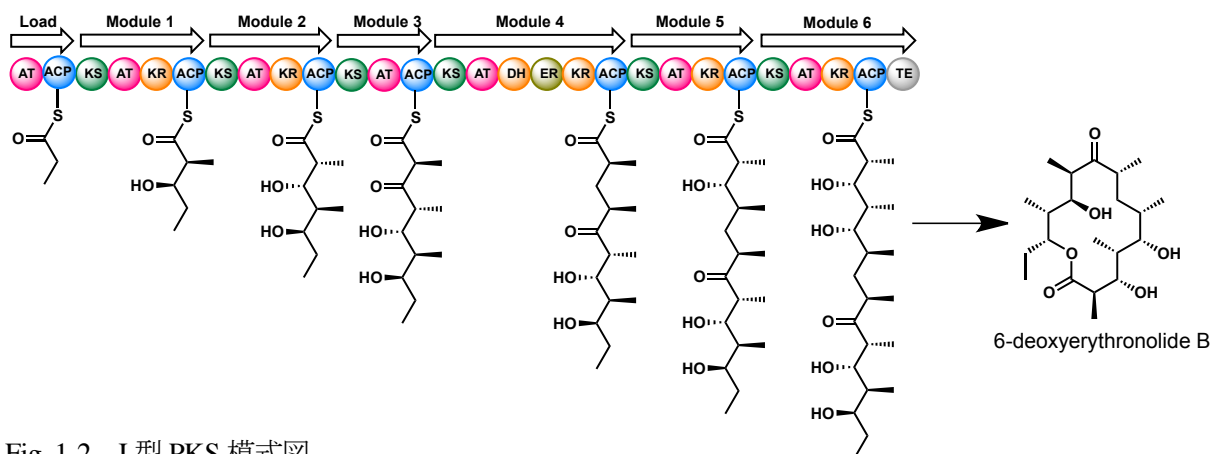


Fig. 1-2 I 型 PKS 模式图

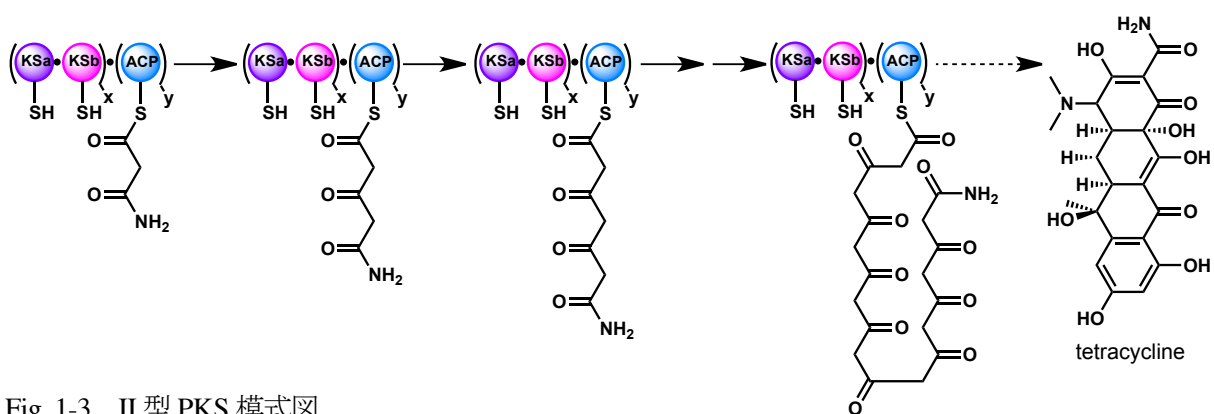


Fig. 1-3 II 型 PKS 模式图

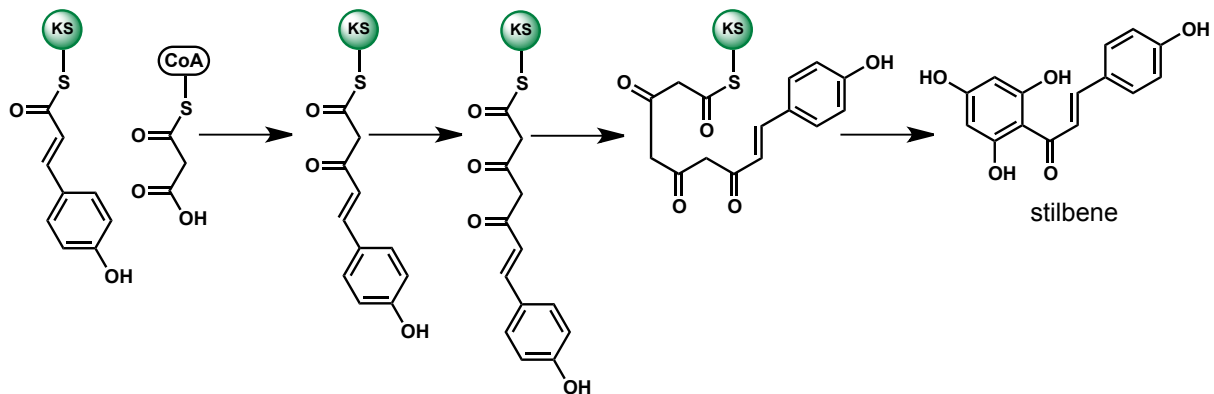


Fig. 1-4 III 型 PKS 模式图

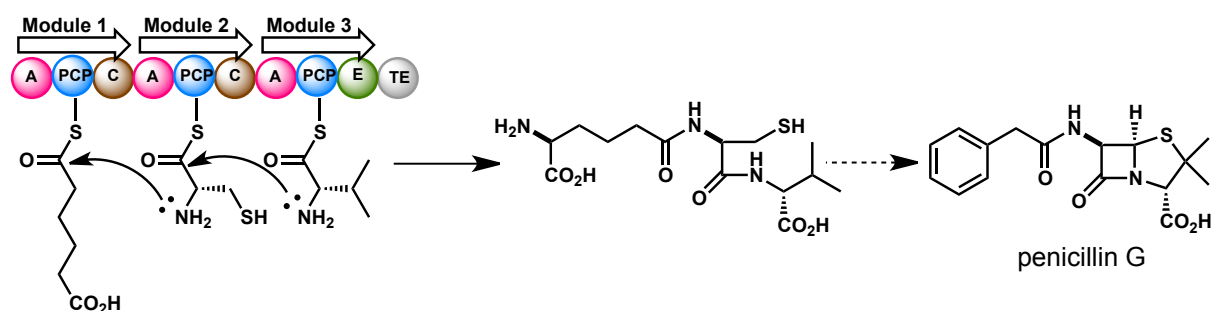


Fig. 1-5 NRPS 模式図

冒頭でも紹介した様に、これまでに多くの生物活性物質が天然から単離され、極めて有効な医薬品が市場に送り出されてきた。現在用いられている医薬品の実に約 1/3 が天然から単離された化合物、あるいはその誘導体である。また、カビ毒であるマイコシキンなど、それ自体が医薬品として使用されることは無くとも、非常に強い生物活性を持ち、医薬品のリードとして期待されている化合物はそれ以上に存在する。これら天然物を医薬品として使用する場合の問題点を挙げる (1) 天然に存在する絶対量が少なく、大量に使用することができない。(2) 生物や植物に由来するため、環境の変化等により安定に供給することができない。未だ人類に発見されておらず、今後発見される天然物は存在する。しかしながら天然に大量に存在するために単離が容易である化合物は、既にほぼ取り尽くされてしまったと考えられる。そこで、天然において生産量の少ない化合物、あるいは生産されている天然物を獲得する方法として、生合成遺伝子を利用する方法がある。天然物はすべて生合成酵素によって作られており、これら生合成酵素遺伝子を手し、大腸菌や酵母など培養が容易であるモデル微生物で異種発現できるシステムがあれば、天然における化合物自体の存在量とは関係なく、医薬品として用いることができる。つまり、大腸菌や酵母を培養するだけで、天然から単離することが困難である化合物を、その菌体内や培地中から簡便に回収することが可能となる。本方法を実現するためには、まず植物や微生物等が有する生合成遺伝子に対する知見が必要となる。これにより、染色体上のどの部位の遺伝子を用いるか、また発現した酵素をどのように取り扱うか等が決まるはずである。また、今日医薬品創出の場では、生物活性物質にさらに優れた薬効を持たせるため、あるいは副作用を低減させ医薬品として化合物を使用するため、有機合成的に天然物の構造変換が行われている。一方、天然化合物は多くの不斉炭素原子を有し、またカルボニル基を始め反応性の高い官能基をも多数保持している。このため全合成には多大な時間と労力、卓越した技術を要し、これらの化合物を実用的に全合成で供給することが困難な場合がある。ここで、もし変異導入により生合成酵素の持つ機能を自由自在に改変、酵素反応により有機合成と同様に、化学構造の合理的な設計に基づき、予想可能な形で分子を変換することができれば、極めて有効な方法論となる。生合成酵素の論理的機能改変により、非天然新規天然物類縁体を得るには、上述した I 型 PKS および NRPS をモデルとして研究する利点は多いと考えられる。これは、炭素骨格の生合成酵素がモジュール構造をとっているために、様々なモジュールを組み合わせることにより、誘導体合成が可能となるためである。このように、生合成遺伝子の活用は、天然物の単離および有機合成に続く新たな医薬品創出の方法論となり、前者らを補完する方法論となる可能性を秘めている。従って、今後の医薬品創出には、さらなる生合成研究が必要であると考えられる。

第2節 二量体化ジケトピペラジン類

(-)-ditryptophenaline (1)¹⁾および(+)-WIN 64821 (4)²⁾は、それぞれ *Aspergillus flavus* および *Aspergillus versicolor* から単離された二次代謝物であり、二量体化ジケトピペラジンアルカロイドの代表的な化合物である。これらのアルカロイドは2つの hexahydropyrroloindole 構造が立体中心となる第四級炭素を介して互いに二量体を形成しており、同様の特徴を有し類似の生合成経路を辿ると考えられる化合物が多数知られている¹⁻⁶⁾ (fig. 1-6)。これら二量体化合物は、痛覚情報伝達物質サブスタンス P の阻害活性、ヒストンリジンメチル基転移酵素の阻害活性、抗菌作用等、様々な生物活性を示すことが知られている。

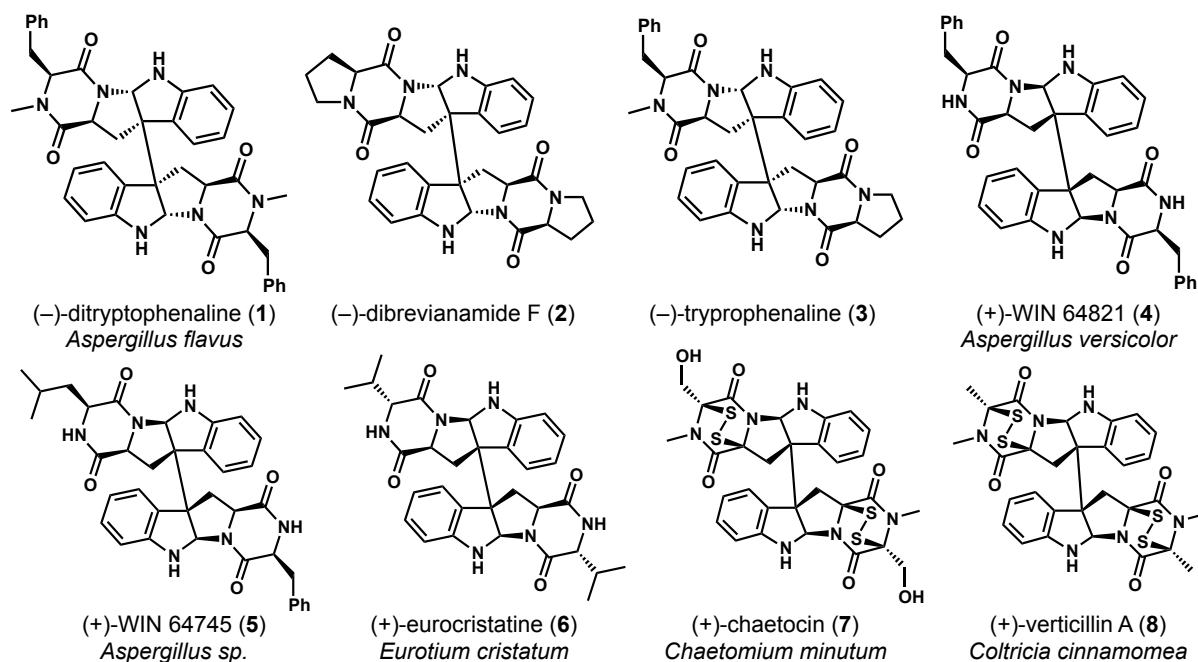


fig. 1-6 二量体化ジケトピペラジン系化合物

上段に化合物名、下段に化合物の単離由来を記した

(2) , (3) は本研究において単離された新規化合物

このように特徴的な構造と多様な生物活性を有することもあり、これら二量体化ジケトピペラジン化合物は積極的に有機化学的合成が試みられてきた。類似した骨格を有する(-)-calycanthine や (+)-calycanthine が tryptophan もしくは tryptamine を基質から合成される生合成仮説を、1950 年代に Woodward⁷⁾らや Robinson⁸⁾らが提唱した (fig. 1-7)。さらに 1969 年に Kirby らにより、同位体標識した(±)-[β-¹⁴C, 2-³H]tryptophan および [β-¹⁴C, 2-³H]tryptamine を *Chimonanthus fragrans* に取り込ませると(-)-chimonanthine へと変換されることが確認された⁹⁾ことから、先述の生合成仮説の妥当性が示された¹⁰⁾ (fig. 1-8)。

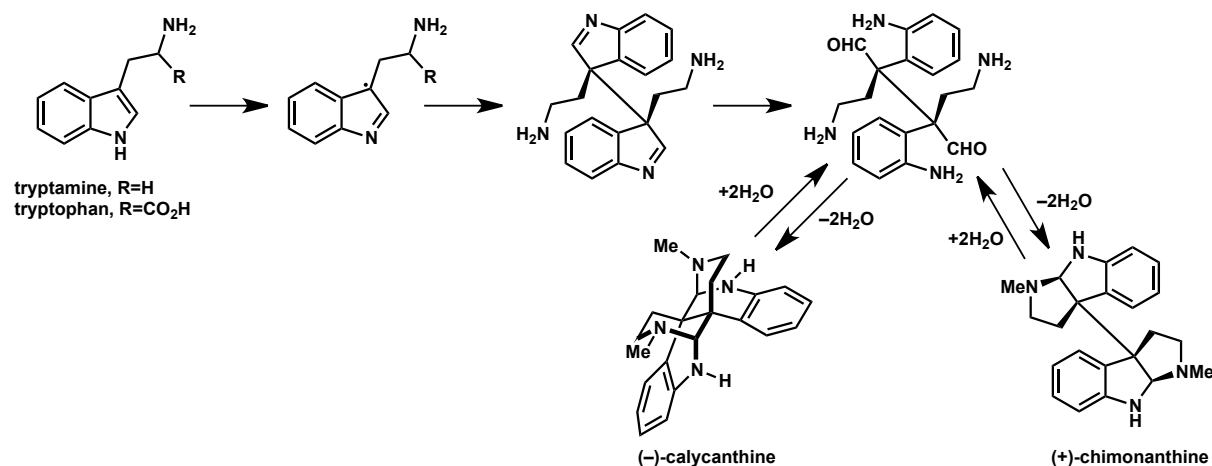


fig. 1-7 (-)-calycanthine および(+)-calycanthine の生合成仮説

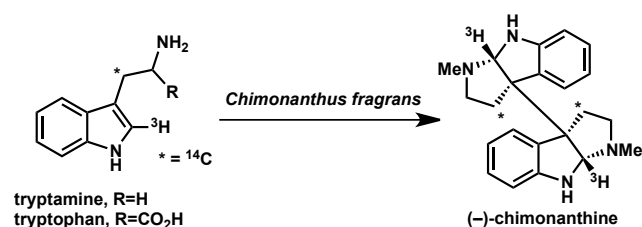
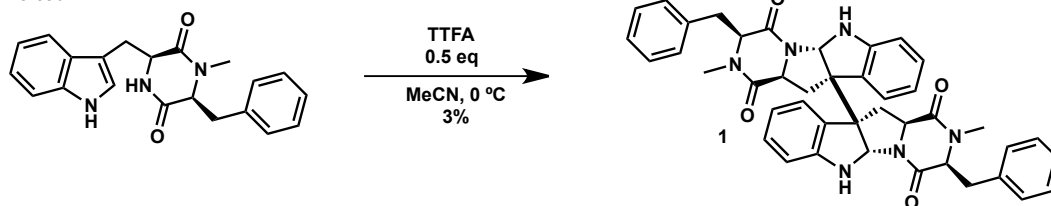


fig. 1-8 同位体標識した tryptamine および tryptophan の取り込み実験

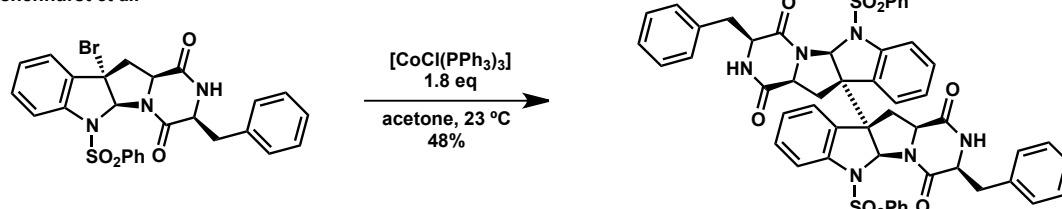
二量体化ジケトピペラジン化合物 **1** の最初の全合成は 1981 年に Hino¹¹⁾らにより達成され、その方法はモノマーを一電子酸化剤として知られる thallium(III) trifluoroacetate (TTFA) にて処理することで二量体化させるものであった (fig. 1-9)。続く二量体反応を介した全合成としては、2008 年に Ashenhurst¹²⁾らにより達成されたものであり、臭素化されたモノマーをコバルト試薬で処理することで、還元的に二量体化反応を進行させることに成功した。この臭素化されたモノマーおよびコバルト試薬を用いた二量体化ジケトピペラジン化合物の全合成例は他にも知られており、2009 年に Movassaghi¹³⁾らにより達成された(+)-11, 11'-dideoxyverticillin Aおよび2010年に Sodeoka¹⁴⁾らにより達

成された(+)-chaetocin (7) もその例である。また、2014 年になり、ニッケル試薬を用いた還元的二量体化を介した(+)-WIN 64821 の全合成を Oguri¹⁵⁾らが報告した。このように近年では還元的二量体化反応が活発に行われる一方で、2012 年に Ishikawa¹⁶⁾らのグループはトリプトファンのエチルエステル体を酸性条件下バナジウム試薬などの酸化剤で処理し酸化的に二量体化を達成した。本合成法は、閉環反応と二量体化反応が同時に進行する点、水中反応である点、one pot にて複数の立体および結合様式を有する中間体を一挙に合成できる点において、これまでの二量体化反応と一線を画すものであった。

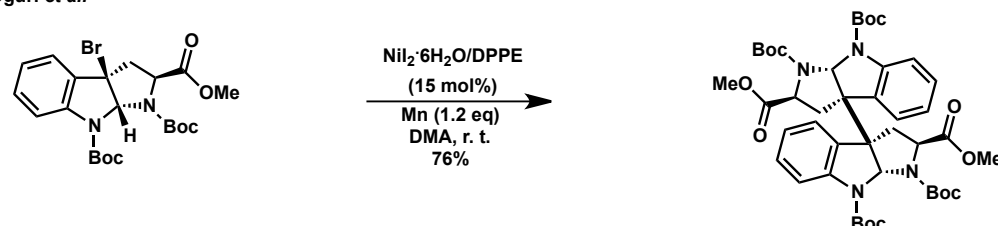
Hino *et al.*



Ashenhurst *et al.*



Oguri *et al.*



Ishikawa *et al.*

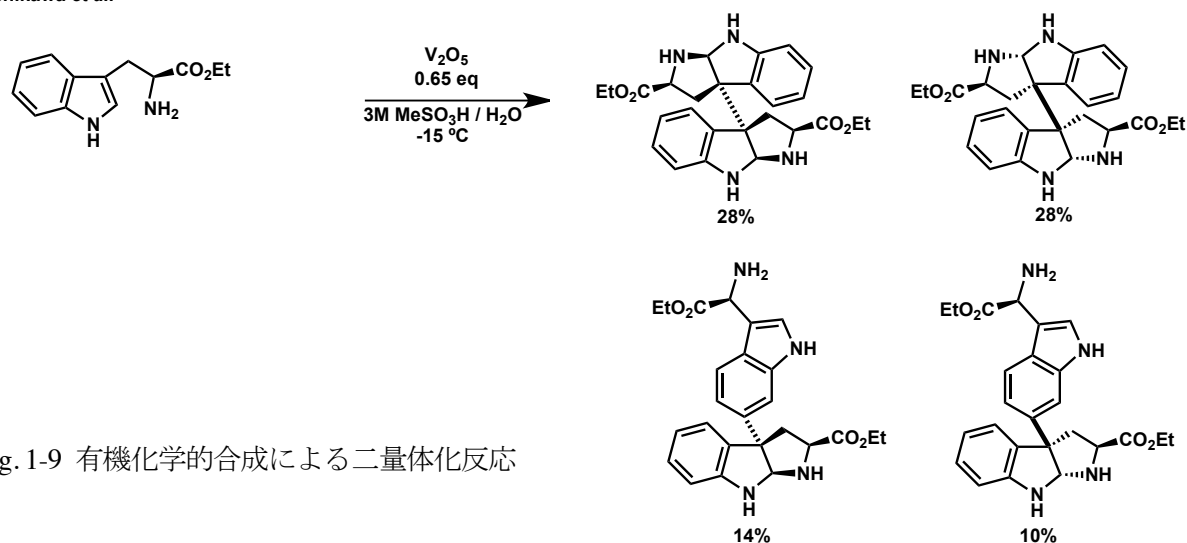


fig. 1-9 有機化学的合成による二量体化反応

これら種々の二量体化反応は全てラジカル反応を介して合成されることから、天然においてもモノマーがラジカル反応により二量体化するものと考えられた。しかしながらこれまでに二量体化ジケトピペラジナルカロイドの生合成遺伝子クラスターおよび二量体化酵素を同定した研究例は報告されておらず、その二量体化を担う酵素が還元酵素であるか、酸化酵素であるか、あるいは全く異なる機能の酵素であるかは解明されていなかった。

これら二量体化ジケトピペラジナルカロイドを含め、現在では 600 以上の二量体天然物が知られている¹⁷⁾。そのなかには二量体化が生物活性の強度に顕著な影響を及ぼす例も知られており¹⁸⁾、このような化合物の二量体化を担う酵素を同定し、理解することに非常に興味を持たれている。しかしながら、上述したように、ジケトピペラジンの二量体化を担う酵素はこれまで一例も報告されていない。さらに、二量体化ジケトピペラジンの特徴的な骨格である hexahydropyrroloindole 構造についても、その詳細な閉環メカニズムを示した報告は知られていない。類似の構造として、ベンゼン環とジケトピペラジンの間の閉環反応として、*notoamide D* や *gliotoxin*¹⁹⁾におけるエポキシ環の形成を介した閉環反応が提唱されているのみである (fig. 1-10)。

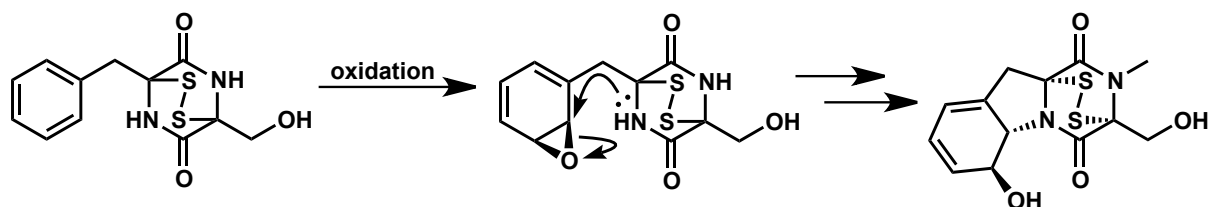


fig. 1-10 Gardiner らにより予想された *gliotoxin* の生合成機構

フェニルアラニン由来のベンゼン環が酸化されエポキシドを形成した後、アミド窒素からの求核攻撃が進行し、水酸基の生成と同時に閉環反応が進行すると予想されている

そこで本研究では、二量体化ジケトピペラジンの代表的化合物とも言える **1** に着目し、その閉環および二量体化のメカニズムを明らかにすることを目的として実験に着手した。本研究により二量体化ジケトピペラジンの生合成機構を明らかとすることができれば、今後の有機化学的合成における合成計画の一助となることや、さらなる二量体化ジケトピペラジン化合物の探索における有効なツールとなることが期待できる。

第3節 参考文献

第1節

1. Cane, D. E.; Walsh, C. T.; Khosla, C. Harnessing the biosynthetic code : combinations, permutations, and mutations. *Science* **1998**, 262, 63-68.
2. Hutchinson, C. R. Microbial polyketide synthases: more and more prolific. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **1999**, 96, 3336-3338.
3. Katz, L. Manipulation of modular polyketide synthases. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2557-2575.
4. Khosla, C. Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthases. *Chem. Rev.* **1997**, 97, 2577-2590.
5. Khosla, C.; Gokhale, R. S.; Jacobsen, John R.; Cane, D. E. Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **1999**, 68, 219-253.
6. Saruwatari, T.; Praseuth, A. P.; Sato, M.; Torikai, K.; Noguchi, H.; Watanabe, K. A comprehensive overview on genomically directed assembly of aromatic polyketides and macrolide lactones using fungal megasynthases. *J. Antibiot.* **2011**, 64, 9-17.

第2節

1. Springer, J.P.; Büchi G.; Kobbe, B.; Demain, A. L.; Clardy et Jon. The structure of ditryptophenaline - a new metabolite of *Aspergillus flavus*. *Tetrahedron Lett.* **1977**, 18, 2403-2406.
2. Barrow, C. J.; Cai, P.; Snyder, J. K.; Sedlock, D. M.; Sun, H. H.; Cooper et, R. WIN 64821, a new competitive antagonist to substance P, isolated from an *Aspergillus* species: structure determination and solution conformation. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 6016-6021.
3. Katagiri, K.; Sato, K.; Hayakawa, S.; Matsushima, T.; Minato, H. Verticillin A, a new anti-biotic from *Verticillium* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1970**, 23, 420-422.
4. Greiner, D. Bonaldi, T.; Eskeland, R.; Roemer, E.; Imhof, A. Identification of a specific inhibitor of the histone methyltransferase SU(VAR)3-9. *Nat. Chem. Biol.* **2005**, 1, 143-145.

5. Oleynek, J. J.; Sedlock, D. M.; Barrow, C. J.; Appell, K. C.; Casiano, F.; Haycock, D.; Ward, S. J.; Kaplita, P.; Gillium, A. M. WIN 64821, a novel neurokinin antagonist produced by an *Aspergillus* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)* **1994**, *47*, 399-410.
6. Gomes, N. M.; Dethoup, T.; Singburaudom, N.; Gales, L.; Silva, A. M. S.; Kijjoa A. Eurocristatine, a new diketopiperazine dimer from the marine sponge-associated fungus *Eurotium cristatum*. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 717-720.
7. Woodward, R. B.; Yang, N. C.; Katz, T. J.; Clark, V. M.; Harley-Mason, J.; Ingleby, R. F.; Sheppard, N. *Proc. Chem. Soc., London* **1960**, 76-78
8. Robinson, R.; Teuber, H. J.; *Chem. Ind. (London)* **1954**, 783
9. Kirby, G. W.; Shah, S. W.; Herbert, E. J. Biosynthesis of chimonanthine from [2-³H]tryptophan and [2-³H]tryptamine *J. Chem. Soc. C* **1969**, 1916-1919.
10. Schmidt, M. A.; Movassaghi, M. New strategies for the synthesis of hexahydropyrroloindole alkaloids inspired by biosynthetic hypotheses. *Synlett* **2008**, 313-324.
11. Nakagawa, M.; Sugumi, H.; Kodato, S.; Hino, T. Oxidative dimerization of Nb-acyltryptophans total synthesis and absolute configuration of ditryptophenaline. *Tetrahedron Lett.* **1981**, *22*, 5323-5326.
12. Movassaghi, M. Schmidt, M. A.; Ashenhurst, J. A.; Concise total synthesis of (+)-WIN 64821 and (–)-ditryptophenaline. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 1485-1487.
13. Kim, J.; Ashenhurst, J. A.; Movassaghi, M. Total synthesis of (+)-11,11'-dideoxyverticillin A *Science* **2009**, *324*, 238-241.
14. Iwasa, E. Hamashima, Y.; Fujishiro, S.; Higuchi, E.; Ito, A.; Yoshida, M.; Sodeoka, M. Total synthesis of (+)-chaetocin and its analogues: their histone methyltransferase G9a inhibitory activity *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 4078-4079.
15. Wada, M.; Murata, T.; Oikawa, H.; Oguri, H. Nickel-catalyzed dimerization of pyrrolidinoindoline scaffolds: systematic access to chimonanthines, folicanthines and (+)-WIN 64821. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 298-306.

16. Tadano, S. Mukaeda, Y.; Ishikawa, Hayato. Bio-inspired dimerization reaction of tryptophan derivatives in aqueous acidic media: three-step syntheses of (+)-WIN 64821, (–)-ditryptophenaline, and (+)-naseaeazine B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 7990-7994.
17. Lian, G. & Yu, B. Naturally occurring dimers from chemical perspective. *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 2660–2691.
18. Bérubé, G. Natural and synthetic biologically active dimeric molecules: anticancer agents, anti-HIV agents, steroid derivatives and opioid antagonists
Curr. Med. Chem. **2006**, *13*, 131-154.
19. Gardiner, D. M.; Waring, P.; Howlett, B. J. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class offungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* **2005**, *151*, 1021-1032.

第2章 (-)-ditryptophenaline 生産能力の確認

第1節 緒言

1 の生合成研究を行うにあたり、生合成遺伝子の破壊や異種発現を中心とした分子生物学的実験と、化合物の単離精製・構造決定が必要となると考えた。そこで、1 の生産能力を有するとともに、遺伝子工学の手法が整備されており実験を円滑に行うことが可能である株が必要となった。前章でも触れたように、1 は糸状菌 *Aspergillus flavus* が生産するマイコトキシンのひとつであるため、遺伝子工学的な環境が整った *A. flavus* を入手することとした。そこで、種々の *Aspergillus* 株を分譲している Fungal Genetics Stock Center が保有する *A. flavus* の菌株を検索し、A1421 株¹⁾が本研究に適していると判断した。第一の利点として、A1421 株は非相同末端結合に必要となる *ku70*²⁾の破壊株であった。糸状菌は、遺伝子を構成する DNA 二本鎖に損傷を受けた際に主に2つの方法を用いて修復を試みる。一方の方法が遺伝子相同組換え (homologous recombination : HR) であり、もう一方の方法が非相同末端結合 (non-homologous end-joining : NHEJ) である。遺伝子相同組換えは、DNA の二重鎖が損傷を受けた際に、よく似た配列を用い損傷箇所を置き換える方法である。一方で非相同末端結合は、損傷を受けた部位を取り除き、その後核酸を除去した末端同士をそのまま貼り合わせる方法である。一般的に糸状菌は非相同末端結合が優位に働いているため、特定の部位に遺伝子を導入することは困難である。しかし、この非相同末端結合に関与する *ku70* が破壊された株では、相同組換えが起こりやすくなっている。そのため、特定の部位と相同的な配列を有する遺伝子を外部から導入すると、ゲノム上の相同的な位置に目的遺伝子が導入される確率が飛躍的に上昇する。これにより、ある特定遺伝子の破壊を円滑に行うことが可能となる。第二の利点として、*pyrG*³⁾が破壊されていることが挙げられる。*pyrG* が破壊された株はウリジン要求性となり、ウリジンが欠損している培地では生育することができないため、*pyrG* 遺伝子を形質転換時のマーカーとして利用することが可能である。

以上2つの利点から、本研究では *A. flavus* A1421 株を使用することとし、本菌株が 1 を生産するかどうかを確認することとした。

第2節 (-)-ditryptophenaline 生産能力の確認

まず通常の培養条件において、**1**を生産しているかどうかを確認することとした。A1421株は窒素源の代謝に異常があり、最小培地で生育させる際には硫酸アンモニウムやカザミノ酸の添加が必要であることが分かっていた⁴⁾。そのため、栄養の制限が少ない完全培地で培養することで、今後の実験の簡略化を図るとともに、菌体の生育に制限がかかりにくいと考えた。そこで、potato dextrose agar 培地にて A1421 株を生育させ、菌体と培地をアセトンにて抽出後、酢酸エチルと水を用いて分配した。得られた有機層を濃縮し、LC-MS により解析したところ、**1**とその生合成中間体であると考えられる cyclophenylalanyltryptophenyl (**9**)、*N*-methylatedcyclophenylalanyltryptophenyl (**10**) に高分解能質量電荷比が一致する化合物の存在が確認できた (fig. 2-1)。そこで、より大量スケールでの培養を行い、まず **1** を単離精製し、構造決定を行うこととした。

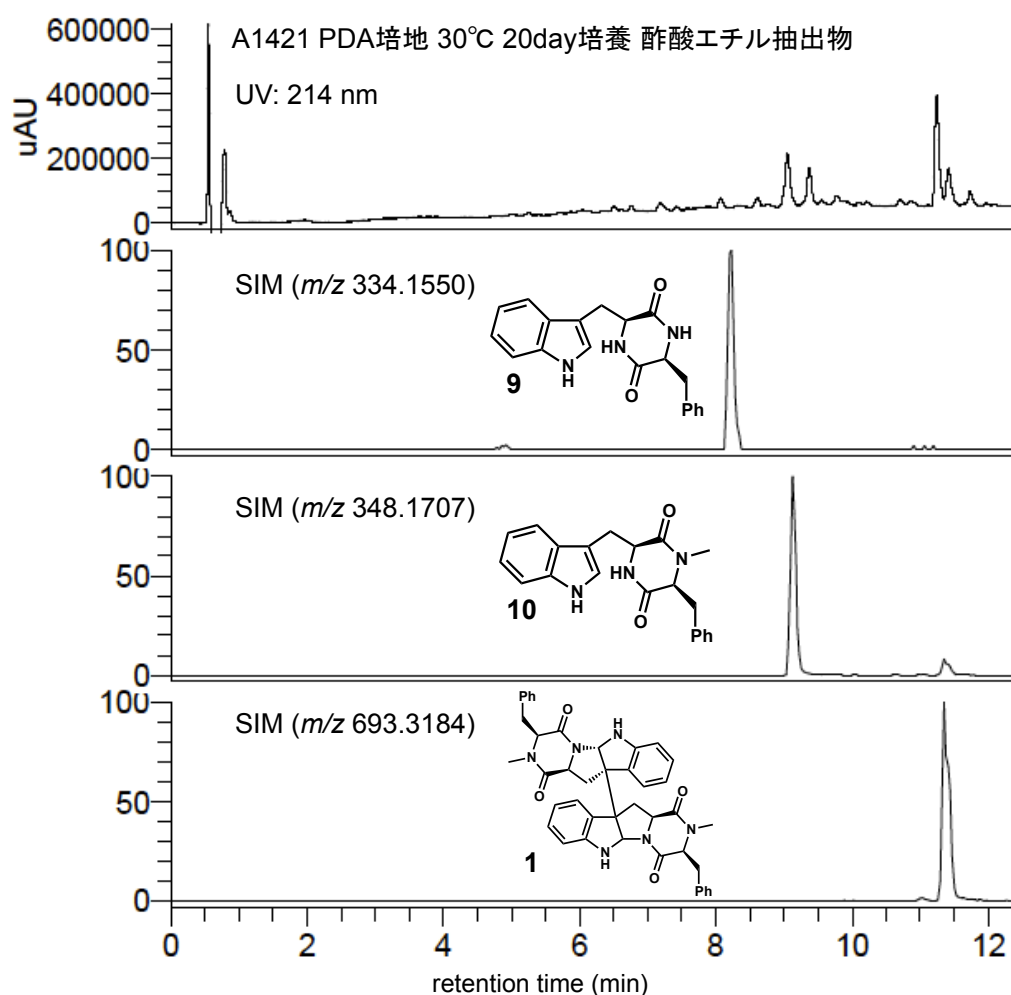


fig. 2-1 A1421 株 PDA 培地培養後抽出物の LC-MS による解析

上段から順に、UV = 214 nm、SIM (m/z 334.1550, cyclophenylalanyltryptophenyl **9**)、SIM (m/z 348.1707, *N*-methylatedcyclophenylalanyltryptophenyl **10**)、SIM (m/z 693.3184, **1**) のクロマトグラム

第3節 (-)-ditryptophenaline の単離・構造決定

前節において、高分解能質量電荷比の値から、PDA 培地において A1421 株により **1** が生産されていることが示唆された。そこで、1 L の potato dextrose agar 培地を用意し、A1421 株を播種後、30 °C で 12 日間培養し、**1** の単離を試みた。得られた菌体と培地をアセトンにて抽出後、酢酸エチルと水を用いて分配したところ、191.8 mg の酢酸エチル抽出物が得られた。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより粗精製を行ったところ、クロロホルム/メタノール = 100/2-100/10 の画分において、**1** だと考えられる化合物の存在を LC-MS により確認した。そこで、これらの画分を回収し、HPLC により精製を行った。以上の精製スキームを下に記した (fig. 2-2)。

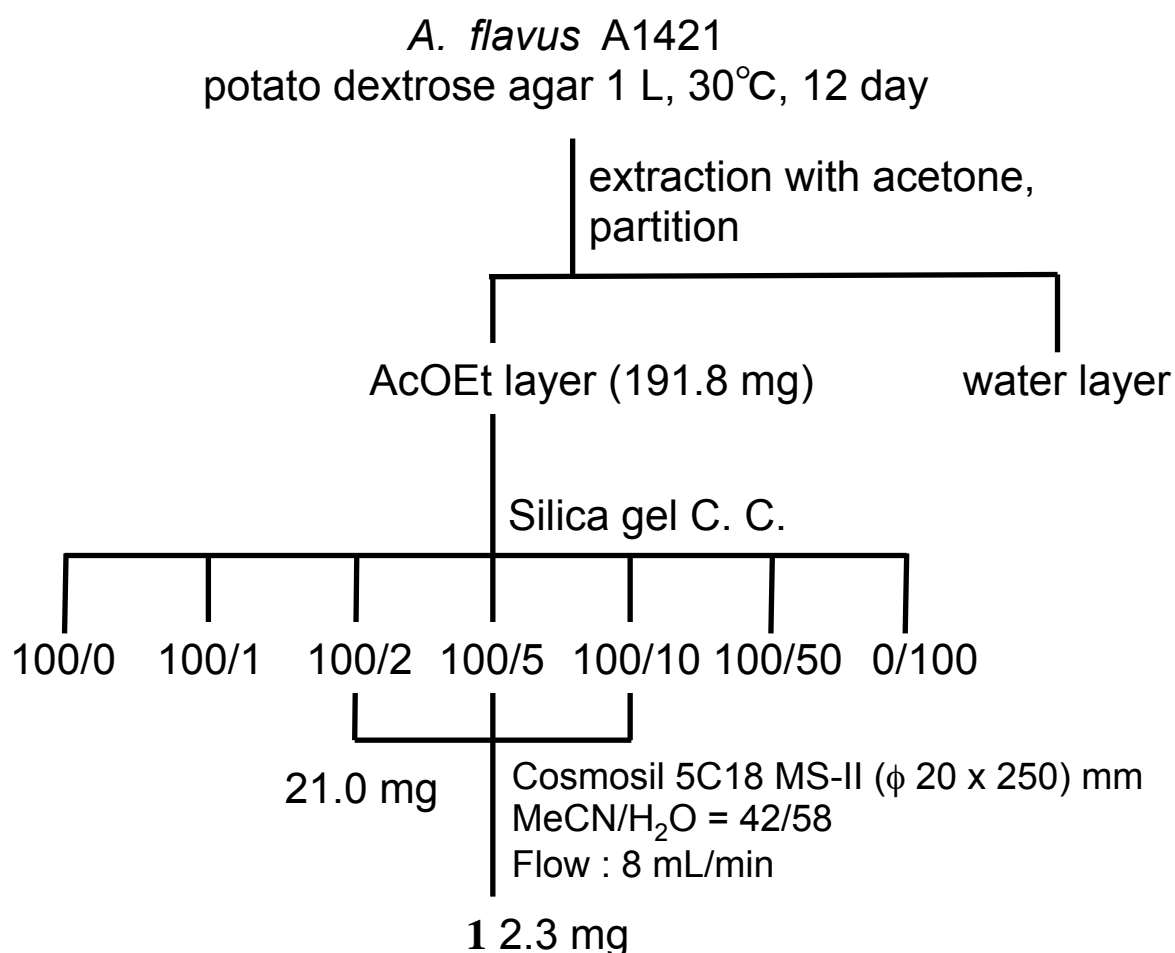


fig. 2-2 **1** の精製スキーム

1 L の potato dextrose agar 培地より、2.3 mg の目的物を単離した。そこで、¹H NMR、¹³C NMR、その他各種二次元 NMR を測定し解析することで、本化合物が **1** であると確認した。詳細なデータについては、第6節に記した。

第4節 考察

今後の実験を円滑に進めるため、**1**の生産能力を有し、かつ遺伝子相同組換え能力が高い *A. flavus* として、A1421株を見出すことに成功した。しかし、通常条件下での**1**の生産量は1 Lの potato dextrase agar 培地あたり 2.3 mg と比較的少量であった。目的化合物の生産量が少ないということは、今後遺伝子破壊を行った際に蓄積する中間体の量も少ないということである。そのため、中間体量が十分に得られない場合は、遺伝子異種発現や bioconversion 実験等も行う必要があると考えられる。

第5節 実験項

(1) 溶媒の留去と試料の乾燥

有機溶媒の留去はロータリーエバポレーターを用いてダイヤフラムポンプの減圧下、約 30 °C の水浴中で行った。試料の乾燥は、油圧式ポンプを接続した真空ライン上に、液体窒素にて冷却したコールドトラップ、乾燥剤（塩化カルシウムおよび水酸化カリウム）を詰めたガラス管をつなげ、高真空下に数時間保つことで行った。

(2) カラムクロマトグラフィー

シリカゲルは関東化学社製のシリカゲル、シリカゲル 60N（球状・中性）100-210 μm 、を用いた。カラムクロマトグラフィーで用いた溶媒（クロロホルム、メタノール）は、和光純薬社製 1 級試薬を用いた。

(3) TLC

TLC プレートはメルク社製 25 TLC plates Silica gel 60 F₂₅₄ を用いた。TLC プレート上の化合物は UV ランプの照射（254 nm, 365 nm）や、アニスアルデヒド溶液（*p*-アニスアルデヒド 13.7 mL、濃硫酸 18.4 mL、酢酸 5.6 mL、エタノール 500 mL より調製したもの）もしくはリンモリブデン酸溶液（リンモリブデン酸 35 g、エタノール 500 mL より調製したもの）にプレートを浸し、ホットプレート上で加熱発色させることで検出を行った。

(4) HPLC

HPLC による試料の分析および分取は日立ハイテクノロジーズ社製の高速液体クロマトグラフ LaChrom Elite を使用し、データ解析ソフトウェアとして EZChrom Elite を使用した。また、化合物の検出には主に PDA 検出器もしくは特定波長の吸光度を用いた。カラムはナカライテスク社製 Cosmosil 5C18-MS-II（4.6 x 250 mm, MeCN/H₂O = 42/58, 流速 1 mL/min）、（20x 250 mm, MeCN/H₂O = 42/58, 流速 8 mL/min）を用いた。

(5) NMR スペクトル

NMR スペクトルの測定には日本電子社製 JNM-ECA 500 MHz spectrometer を用いた。データの解析には日本電子社製のソフトウェア Delta NMR software v 5.0.1. を使用した。重溶媒は uriso-Top 社製重クロロホルムおよび Cambridge Isotope Laboratories 社製重メタノールを用いた。¹H NMR および ¹³C NMR の化学シフト値は ppm 表示し、内部標準としてその残留軽水素および炭素のシグナルを用いて、それぞれ δ_{H} 7.26 ppm、 δ_{C} 77.16 ppm（クロロホルム）、 δ_{H} 3.31 ppm、 δ_{C} 49.00 ppm（メタノール）と設定した。スピン多重度は s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, m = multiplet と略記し、幅広いシグナルは br = broad と略記した。スピン結合定数 (*J*) は Hz で表記した。

(6) 高分解能質量分析スペクトル

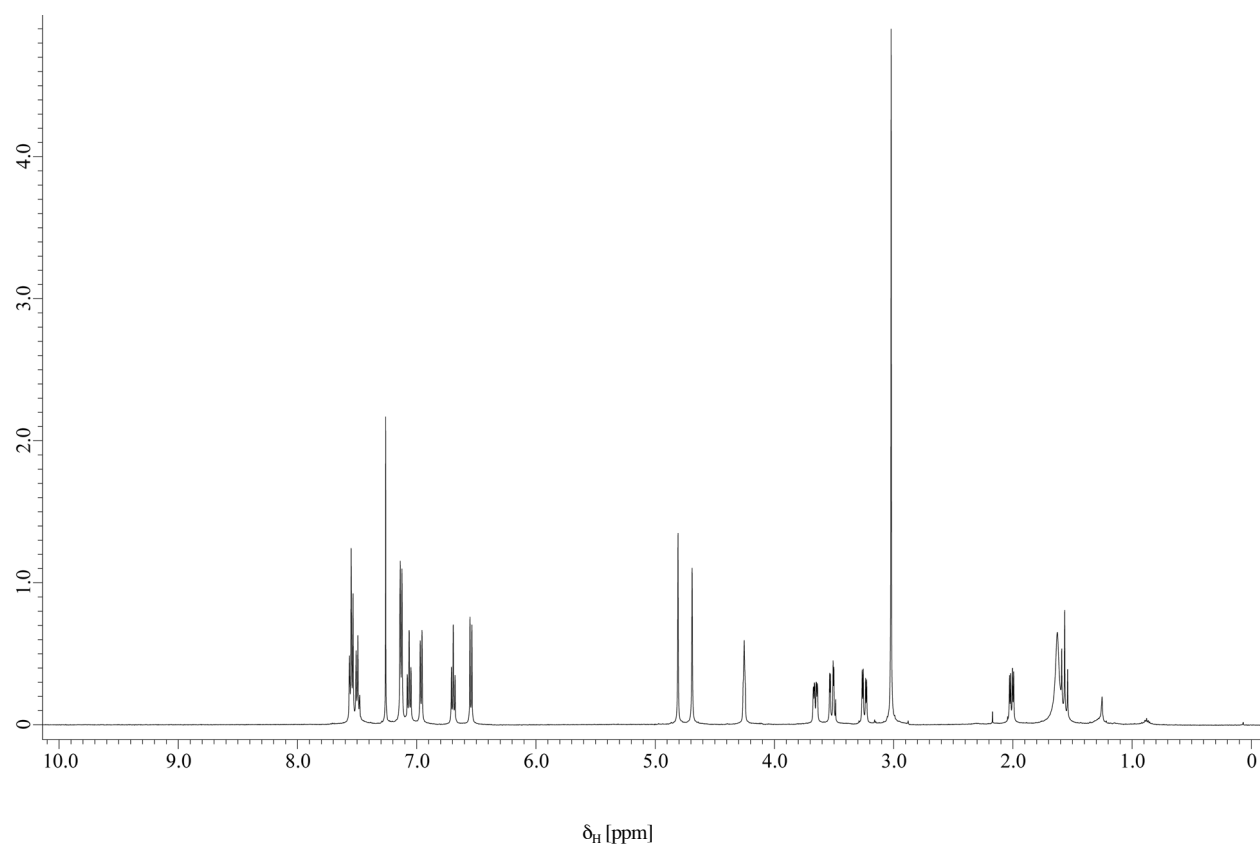
高分解能質量分析には ESI (Electrospray ionization) 法の測定法を用い、Thermo SCIENTIFIC 社製の Exactive liquid chromatography mass spectrometer を使用した。

(7) 比旋光度

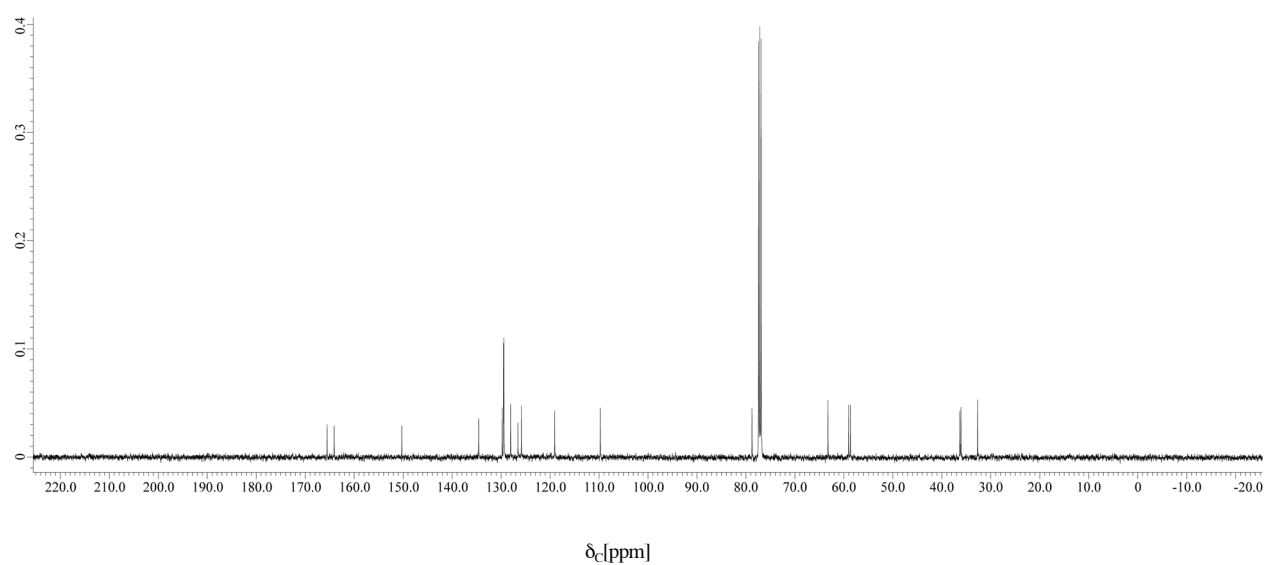
日本分光社製の DIP-1000 型デジタル旋光度を用いて測定を行い、以下の様式で記載した。 $[\alpha]_D^t$ 比旋光度 (c , 測定溶媒) ただし、 t : 測定温度 ($^{\circ}\text{C}$)、 c : 濃度 (g/dL) である。

第6節 NMR データ

^1H NMR spectrum of **1** in CDCl_3 (500 MHz).

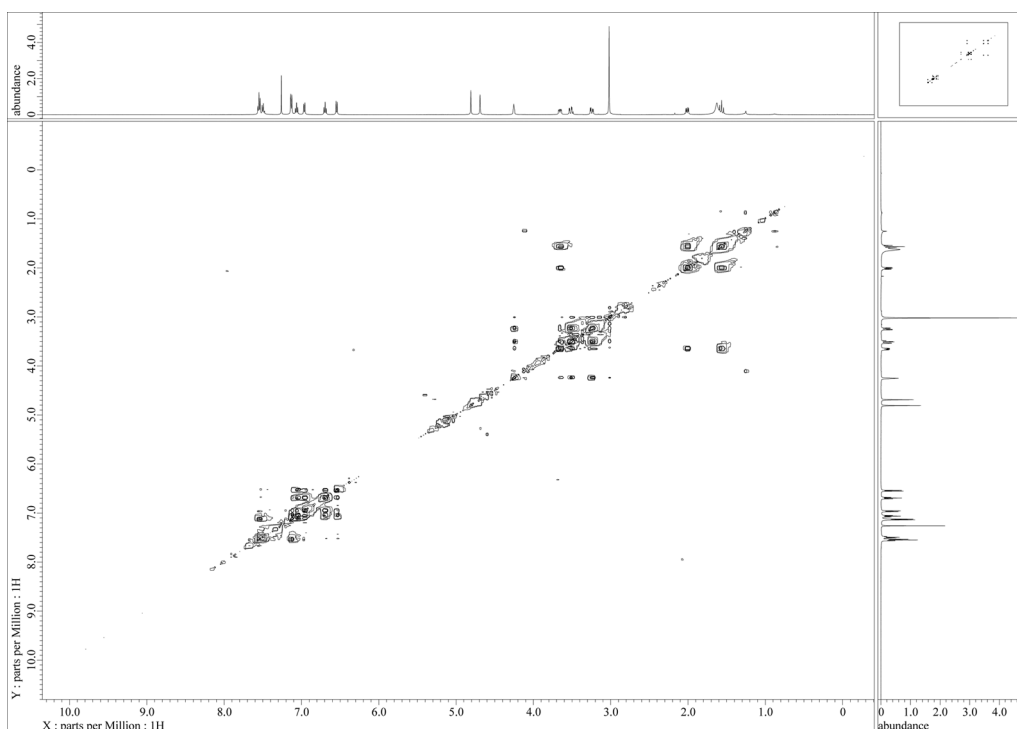


^{13}C NMR spectrum of **1** in CDCl_3 (125 MHz).



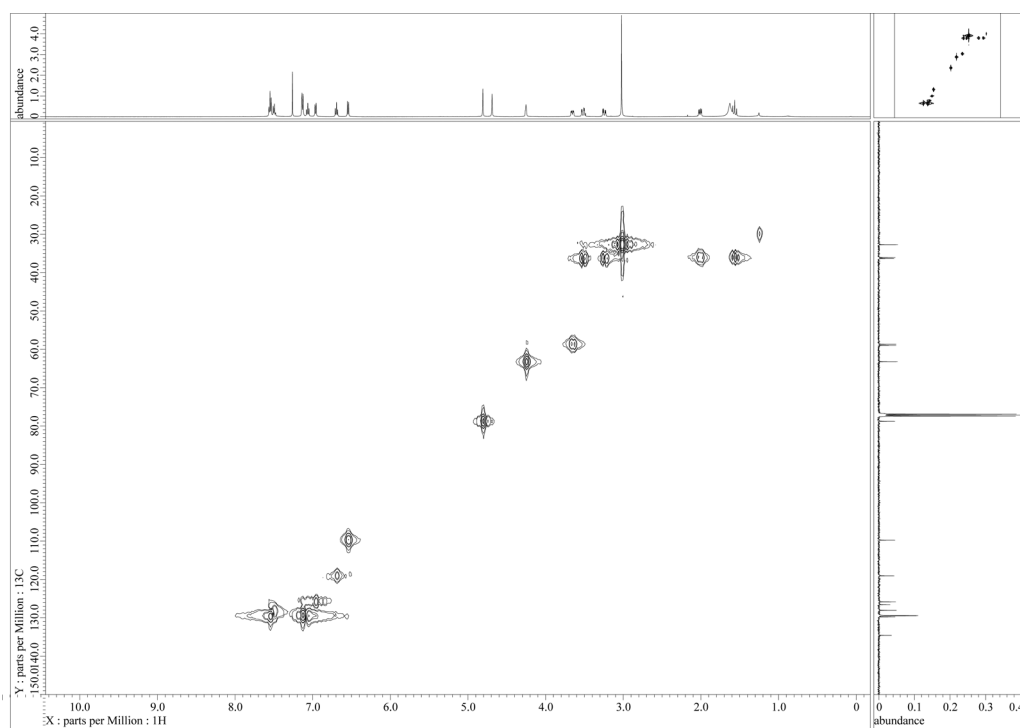
DQF-COSY spectrum of **1** in CDCl₃ (500 MHz).

DQF-COSY, double quantum filtered-correlated spectroscopy.



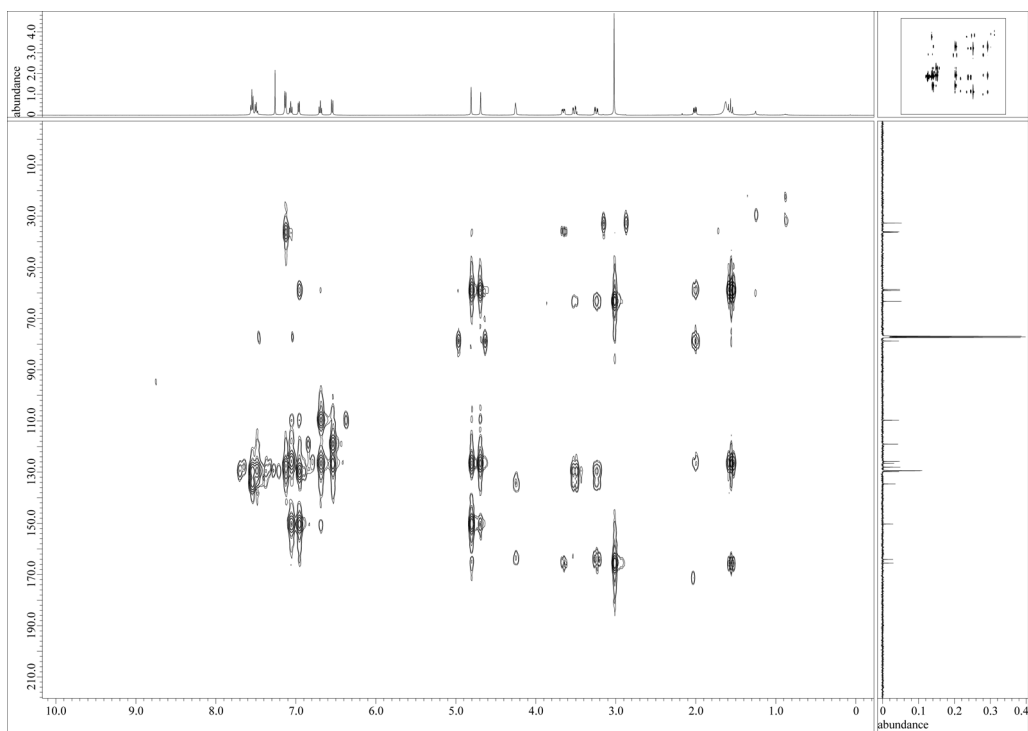
HMQC spectrum of **1** in CDCl₃ (500 MHz).

HMQC, heteronuclear multiple quantum coherence.

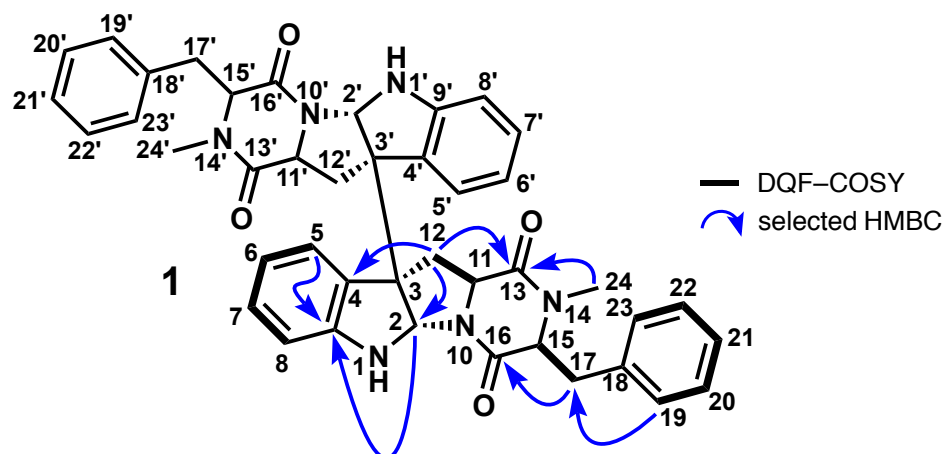


HMBC spectrum of **1** in CDCl₃ (500 MHz).

HMBC, heteronuclear multiple bond correlation.



NMR data of **1** in CDCl₃. The molecular formula of **1** was established by mass data [ESI-MS: m/z 394 (M+H)⁺; HRESIMS: m/z 693.3184 (M+H)⁺, calcd. for C₄₂H₄₁N₆O₄⁺, 693.3184, Δ = 0 mmu]; [α]_D²⁹: -250.74 (*c* 0.27, CHCl₃).



Position	δ_H^a	mult. (<i>J</i> in Hz)		HMBC ^a	δ_C^b
1 (NH)	4.70	s		3, 4	
2	4.81	2H s		3, 9	78.8
3					59.0
4					126.6
5	6.96	2H d (7.4)		3, 9	125.9
6	7.06	2H d (7.4)		4	129.8
7	6.69	2H t (6.8)			119.1
8	6.55	2H d (7.9)			109.8
9		2H			150.3
11	3.65	2H dd (11.9, 5.1)		13	58.7
12	1.56	2H dd (13.0, 11.9)		2, 4, 11, 13	36.1
	2.01	2H dd (13.0, 5.1)			
13					165.5
15	4.25	2H m		16	63.3
16					164.1
17	3.24	2H dd (14.7, 4.5)		15, 16, 18, 19	36.3
	3.52	2H dd (14.7, 2.8)		15, 16, 18, 19	
18					134.6
19	7.12	2H d (7.4)		17, 18	129.4
20	7.54	2H t (6.8)			129.5
21	7.49	2H t (7.3)			128.1
24	3.02	6H s		13, 15	32.7

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

第 7 節 参考文献

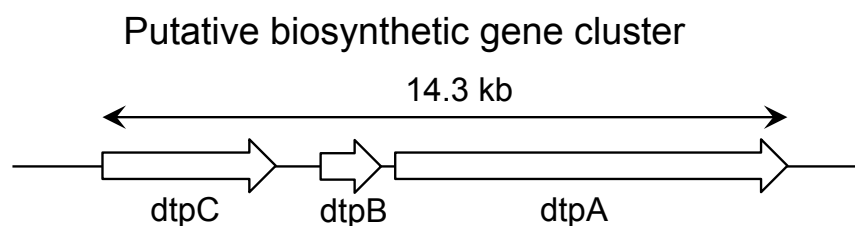
1. Chang, P. -K.; Scharfenstein, L. L.; Wei, Qijian.; Bhatnagar, D. Development and refinement of a high-efficiency gene-targeting system for *Aspergillus flavus*. *J. Microbiol. Methods* **2010**, *81*, 240-246.
2. Meyer, V. Arentshorst, M.; El-Ghezal, A.; Drews A.-C.; Kooistra, R.; Hondel, C. A.M.J.J.; Ram. A. F. J. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger* kusA mutant. *J. Biotechnol.* **2007**, *128*, 770-775.
3. Weidner, G.; d'Enfert, C.; Koch, A.; Mol, P. C.; Brakhage, A. A. Development of a homologous transformation system for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* based on the pyrG gene encoding orotidine 5''-monophosphate decarboxylase. *Curr. Genet.* **1998**, *33*, 378-385.
4. Chang, P.K.; Scharfenstein, L. L.; Ehrlich, K. C.; Wei, Q.; Bhatnagar, D.; Ingber, B. F. Effects of laeA deletion on *Aspergillus flavus* conidial development and hydrophobicity may contribute to loss of aflatoxin production. *Fung. Biol.* **2012**, *116*, 298-307.

第3章 (-)-ditryptophenaline 生合成遺伝子クラスターの推定および遺伝子破壊による同定

第1節 緒言

1 は二量体を形成していることもあり、一見すると複雑な構造を有しているようにも思われる。しかしながら順を追って考えてみると、実際にはジケトピペラジン系化合物が二量体を形成した比較的単純な構造であることが分かる。すなわち、生合成の初期段階において、まずトリプトファンとフェニルアラニンが縮合しジケトピペラジンによる基本骨格が構築されと考えられる。その後、詳細な順序については明らかではないが、完全なホモダイマーであることを考慮すると、アミド窒素上の *N*-メチル化、インドール環の酸化反応を介した閉環反応を経てモノマーが合成された後、二量体化反応が進行し、**1** が合成されると、その生合成経路を大まかに予想した。この予想反応機構と類似の生合成機構が提唱されている化合物として、gliotoxin¹⁾が知られている。**1** と gliotoxin の類似した点として、a. ジケトピペラジンを基本骨格とすること b. 一方のアミド窒素がメチル化されていること c. 芳香環とアミド窒素の間で閉環反応が進行することでピロリジン環が形成されていることの3点が挙げられる。gliotoxin の閉環反応については、その構造から反応機構が既に提唱されており、フェニルアラニン由来の芳香環が P450 により酸化され、形成されたエポキシ環がアミド窒素からの求核反応を受け開環することで、水酸基が生成すると同時にピロリジン環が形成されると予想されている（第1章第2節参照）。しかしながら、**1** においては、エポキシ環の手がかりとなる水酸基は存在せず、また、閉環反応のみが進行した単量体の存在も知られていない。これらの点から、最終的な閉環および二量体化のメカニズムは異なるものの、両化合物の生合成経路にはある程度の類似性が考えられた。

以上の点から、基本骨格の構築を触媒する NRPS、メチル基転移酵素、酸化酵素が集積する箇所を *A. flavus* ゲノム配列から探索したところ、AFLA_005440、AFLA_005450、AFLA_005460 がそれに相当することを見出し、これら遺伝子を **1** の予想生合成遺伝子クラスターとし、それぞれ dtpA, dtpB, dtpC とした (fig. 3-1)。本予想生合成遺伝子クラスターの妥当性を証明するため、各予想生合成遺伝子を破壊し **1** の生合成能力を検討することとした。



Gene name	Amino acid length	Protein homolog, GenBank accession number, Origin	Identity / Similarity (%)	Proposed function
dtpA AFLA_005440	2492	non-ribosomal peptide synthetase module (EIT77215.1), <i>A. oryzae</i>	97.7 / 98.0	NRPS (CATCATC)
dtpB AFLA_005450	191	<i>N</i> -methyltransferase (XP_001822636.2), <i>A. oryzae</i>	71.2 / 80.9	<i>methyltransferase</i>
dtpC AFLA_005460	525	hypothetical (XP_003190172.1), <i>A. oryzae</i>	50.9 / 52.8	cytochrome P450

fig. 3-1 1の予想生合成遺伝子クラスター

クラスターの模式図、各遺伝子がコードするタンパク質のホモログおよび予想機能を記した

遺伝子の破壊には、ウリジン合成酵素をコードする *pyrG* をマーカーに用いた。相同的な領域として、目的遺伝子上流および下流の 1000 bp を利用し、*dtpA*, *dtpB*, *dtpC* をそれぞれ *pyrG* にて置換した。遺伝子の破壊は PCR により確認した。これら破壊株の作成および確認について、詳細な内容は第3章第4節の実験項に記載した。

第2節 予想生成遺伝子破壊株生産化合物の解析

得られた *dtpA*, *dtpB*, *dtpC* の破壊株 ($\Delta dtpA/A.flavus$ A1421, $\Delta dtpB/A.flavus$ A1421 and $\Delta dtpC/A.flavus$ A1421)、および *A.flavus* 野生株 (*A.flavus* A1421) を potato-dextrose 寒天培地にて培養したところ、 $\Delta dtpA/A.flavus$ A1421, $\Delta dtpB/A.flavus$ A1421 and $\Delta dtpC/A.flavus$ A1421 の全てにおいて、**1** の生産能力が失われていることが確認できた (fig. 3-2)。

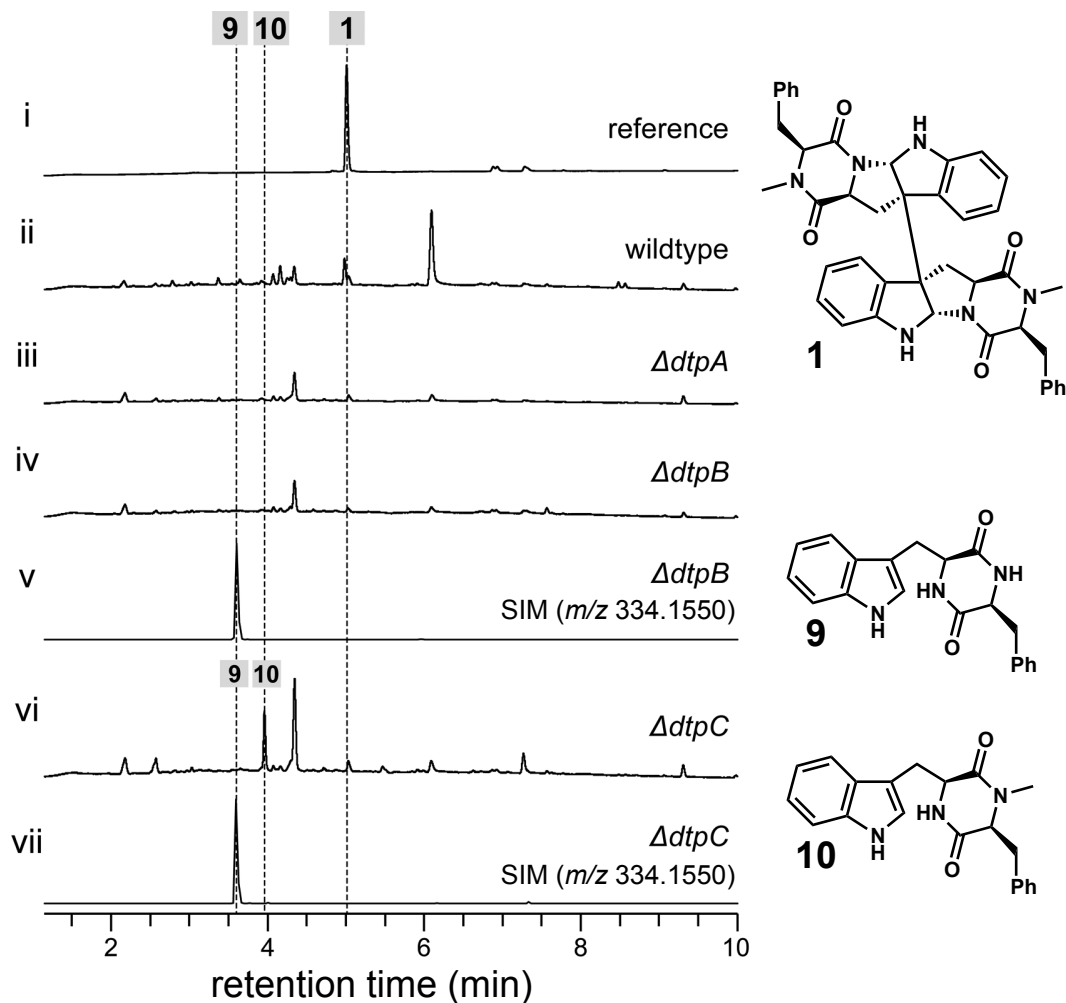


fig. 3-2 HPLC クロマトグラムによる野生株および遺伝子破壊株の生産化合物の比較

(i) **1** 標品, UV : 214 nm (ii) *A.flavus* A1421 野生株抽出物, UV : 214 nm (iii) $\Delta dtpA/A.flavus$ A1421 抽出物, UV : 214 nm (iv) $\Delta dtpB/A.flavus$ A1421 抽出物, UV : 214 nm (v) $\Delta dtpB/A.flavus$ A1421 抽出物, SIM (m/z 334.1550) (vi) $\Delta dtpC/A.flavus$ A1421 抽出物, UV : 214 nm (vii) $\Delta dtpC/A.flavus$ A1421 抽出物, SIM (m/z 334.1550)

さらに *dtpC* の破壊株においては、新たに化合物(**10**)の蓄積が確認された。本化合物について単離構造決定を進めると、一方のアミド窒素がメチル化された、トリプトファンとフェニルアラニンのジケトピペラジンであると、その構造を同定した。本結果から、*DtpA* および *DtpB* により **10** が生合

成されていることが推察された。dtpA は骨格の形成を担う NRPS をコードし、dtpB はメチル基転移酵素をコードしていることから、dtpB の破壊株においては、NRPS による骨格の形成のみが進行したトリプトファンとフェニルアラニンのジケトピペラジン **9** が蓄積することが期待された。しかし実際には本ジケトピペラジンは UV ではほぼ確認することができず、対応する質量電荷比を抽出することで、その存在が確認できる程度であった。

第3節 考察

本章では、**1**の生合成を担う遺伝子クラスターを、公開ゲノムデータベースの情報をもとに検索し、推定された遺伝子群の破壊株を作成することで、**1**の生産能にどのような変化が見られるかを解析した。その結果、dtpA 破壊株 ($\Delta dtpA/A. flavus$ A1421)、dtpB 破壊株 ($\Delta dtpB/A. flavus$ A1421)、dtpC 破壊株 ($\Delta dtpC/A. flavus$ A1421) の全てにおいて、最終産物である**1**の生産が見られなくなった。これは、dtpA-C が**1**の生合成に必須な遺伝子であり、当初予想した生合成遺伝子クラスターが間違いなく**1**の生合成に関与することを示した最初の結果となった。

また、P450 をコードする dtpC の破壊株では一方のアミド窒素がメチル化されたフェニルアラニンとトリプトファンのジケトピペラジンである**10**の蓄積が認められた。これは、dtpC が**10**を基質として利用し触媒することで、最終産物である**1**を生合成することを示唆している。加えて、dtpB の破壊株においては、フェニルアラニンとトリプトファンのジケトピペラジン**9**に相当する質量電荷比を与える化合物がわずかながら蓄積していた。**10**のようにUVにより確認できるだけの化合物量が蓄積されていなかった理由として**9**が比較的単純な構造であるため、容易に代謝されてしまうこと、他の二次代謝経路へと流出してしまうことが考えられた。また、今回の実験では固体培地から化合物の抽出を行っているため、経時的な化合物のサンプリングが困難であった。今後、液体培地での培養を行い、培養初期から経時的に生産化合物の解析を行うことで、**9**が蓄積するタイミングを見出すことも可能であると考えられる。

これらの点から、dtpA によるジケトピペラジンの形成、dtpB による *N*-メチル化、dtpC によるインドール環とジケトピペラジンの間の閉環反応の順に反応が進行し**1**が生合成されると予想することができた。しかし、**9**の単離構造決定が困難であったことから分かるように、遺伝子破壊実験ではより詳細な解析は困難であった。そこで次章ではこの結果をさらに確かなものとするため、各遺伝子を異種発現させ、その機能を確かめることとした。

第4節 実験項

一般操作と測定機器については第1章に記載した方法により実施した。

(1) 使用菌株

A. flavus A1421

DTP の生産宿主として使用した

A. flavus NBRC 4186

遺伝子破壊カセット作成の際に PCR の鋳型としてゲノムを使用した

S. cerevisiae BY4741

遺伝子破壊カセット作成時に、相同組換えに使用した

E. coli XL-1 Blue

プラスミドの増幅に使用した

(2) PCR 条件

PCR 反応液 (50 μ L) は、5 x PrimeSTAR GXL Buffer 10 μ L、2.5 mM dNTP Mixture 4 μ L、鋳型 DNA 50 ~100 ng、プライマー 0.3 μ M each、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase 2 μ L で調製した。

(3) 鋳型 DNA

相同組換え領域および耐性遺伝子となる pyrG 遺伝子は、*A. flavus* NBRC 4186 のゲノムを使用した。

(4) 遺伝子破壊カセットの作成

各種遺伝子破壊カセットは、選択マーカーを相同組換え領域で挟み込むことで作成した。相同組換え領域は、破壊する目的遺伝子の 5'末端の上流および 3'末端の下流それぞれ 1000 bp とした。選択マーカーについては、*A. flavus* NBRC 4186 由来 pyrG 遺伝子をプロモーター領域およびターミネーター領域を含めて用いた。dtpA の破壊に使用した pKW4077 (fig. 3-3) については、相同組換え領域の増幅に、pKW4077_rec1_F/pKW4077_rec1_R および pKW4077_rec2_F/pKW4077_rec2_R の組み合わせでプライマーを使用した。pyrG の増幅に pKW4077_pyrG_F/pKW4077_pyrG_R の組み合わせでプライマーを使用した。増幅された 3 種のフラグメントを、SalI にて消化した pRS426²⁾と同時に *S. cerevisiae* BY4741 株へと導入し、相同組換え³⁾を行った。相同組換えにより構築されたプラスミドを *E. coli* XL-1 Blue に導入し、コロニーPCR および制限酵素消化により、正しく構築されたプラスミドを選択し、塩基配列解析に供した。同様の手順により、dtpB および dtpC の破壊カセットとして、pKW4078 および pKW4079 を作成した。各破壊カセットの作成に使用した primer の組み合わせを以下に記す。

***ΔdtpA*:** pKW4077_rec1_F/pKW4077_rec1_R, pKW4077_rec2_F/pKW4077_rec2_R and pKW4077_pyrG_F/ pKW4077_pyrG_R.

***ΔdtpB*:** pKW4078_rec1_F/pKW4078_rec1_R, pKW4078_rec2_F/pKW4078_rec2_R and pKW4077_pyrG_F/ pKW4077_pyrG_R.

***ΔdtpC*:** pKW4079_rec1_F/pKW4079_rec1_R, pKW4079_rec2_F/pKW4079_rec2_R and pKW4077_pyrG_F/ pKW4077_pyrG_R.

Primer name	Sequence
pKW4077_rec1_F	5'- CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCACCCAATCGCAGTACCAAAG -3'
pKW4077_rec1_R	5'- CATTTTCTGGTATATTGTTCTGAGAAAAAGTGTGAACCCGGTCTG -3'
pKW4077_pyrG_F	5'- TCTCAGAACAATATACCAGAAAAATG -3'
pKW4077_pyrG_R	5'- GCCACCTGGTTTGAAATTG -3'
pKW4077_rec2_F	5'- CTTGCTCAATTTCAAACCAGGTGGCCCGAGCCATCTTCAAGCTAC -3'
pKW4077_rec2_R	5'- CGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGTCGTGAATGTCAACCATGC -3'
pKW4078_rec1_F	5'- CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCTTCGGGATGAGAACCAAATG -3'
pKW4078_rec1_R	5'- CATTTTCTGGTATATTGTTCTGAGAGTATTTGCCCAGCATCATCC -3'
pKW4078_rec2_F	5'- CTTGCTCAATTTCAAACCAGGTGGCACAAGTAGCGAAGGGCAGAG -3'
pKW4078_rec2_R	5'- CGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTCGTTAGGCTTGGAGGCTATG -3'
pKW4079_rec1_F	5'- CGACGGTATCGATAAGCTTGATATCGATGGCATATCGCTCCTCTG -3'
pKW4079_rec1_R	5'- CATTTTCTGGTATATTGTTCTGAGACTTTTCTACCAGCCCACCAC -3'
pKW4079_rec2_F	5'- CTTGCTCAATTTCAAACCAGGTGGCGATCCCCAGTGGAGAGAGTG -3'
pKW4079_rec2_R	5'- CGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTTTTGATCACGATCGGTATGG -3'

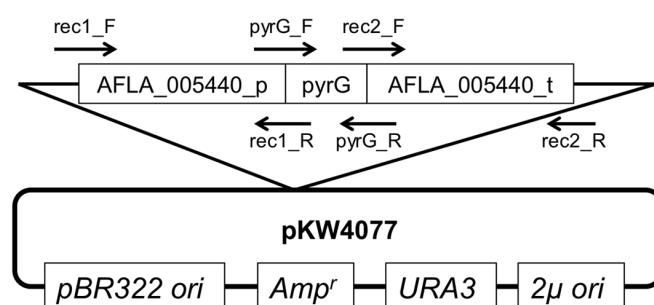


fig. 3-3 pKW4077 模式図

(5) 遺伝子破壊株の作成

遺伝子の破壊には、それぞれ pKW4077 (dtpA)、pKW4078 (dtpB)、pKW4079 (dtpC) より増幅した PCR 産物を用いた。各 PCR 産物をプロトプラスト-PEG 法にて導入し、CD³-NaCl 寒天培地にて形質転換体を選択した。30 °Cにて5日間培養した後、形成されたコロニーを新しいCD 寒天培地に移し、二次選択を行った。CD 寒天培地にて形成されたコロニーよりゲノム DNA を抽出し、PCR により目的遺伝子の破壊を確認した。得られた各種遺伝子破壊株を $\Delta dtpA/A. flavus$ A1421, $\Delta dtpB/A. flavus$ A1421, $\Delta dtpC/A. flavus$ A1421 とした。

(6) 遺伝子破壊の確認

各種遺伝子の破壊は、 $\Delta dtpA/A. flavus$ A1421, $\Delta dtpB/A. flavus$ A1421 および $\Delta dtpC/A. flavus$ A1421 より調製したゲノム DNA を鋳型とした PCR により確認した。アクチンをコードする AFLA_055230 の領域をポジティブコントロールとし、fig. 3-4 において A で示した領域を $\Delta dtpA/A. flavus$ A1421, $\Delta dtpB/A. flavus$ A1421 および $\Delta dtpC/A. flavus$ A1421 のプライマーで増幅した。各目的遺伝子の破壊領域については、fig. 3-4 において B で示した部分をそれぞれ pKW4077_integ_F/pKW4077_integ_R ($\Delta dtpA$)、pKW4078_integ_F/pKW4077_integ_R ($\Delta dtpB$)、pKW4079_integ_F/pKW4077_integ_R ($\Delta dtpC$)の組み合わせのプライマーにより増幅した。各フラグメントと電気泳動のレーン番号を以下に記す (fig. 3-4)。

lane 1, 5 and 9: *A. flavus* A1421 野生株; lane 2: $\Delta dtpA::pyrG/A. flavus$ A1421; lane 6: $\Delta dtpB/A. flavus$ A1421; lane 10: $\Delta dtpC/A. flavus$ A1421; lane 3, 7 and 11: *A. flavus* A1421 野生株; lane 4: $\Delta dtpA::pyrG/A. flavus$ A1421; lane 8: $\Delta dtpB/A. flavus$ A1421; lane 12: $\Delta dtpC/A. flavus$ A1421

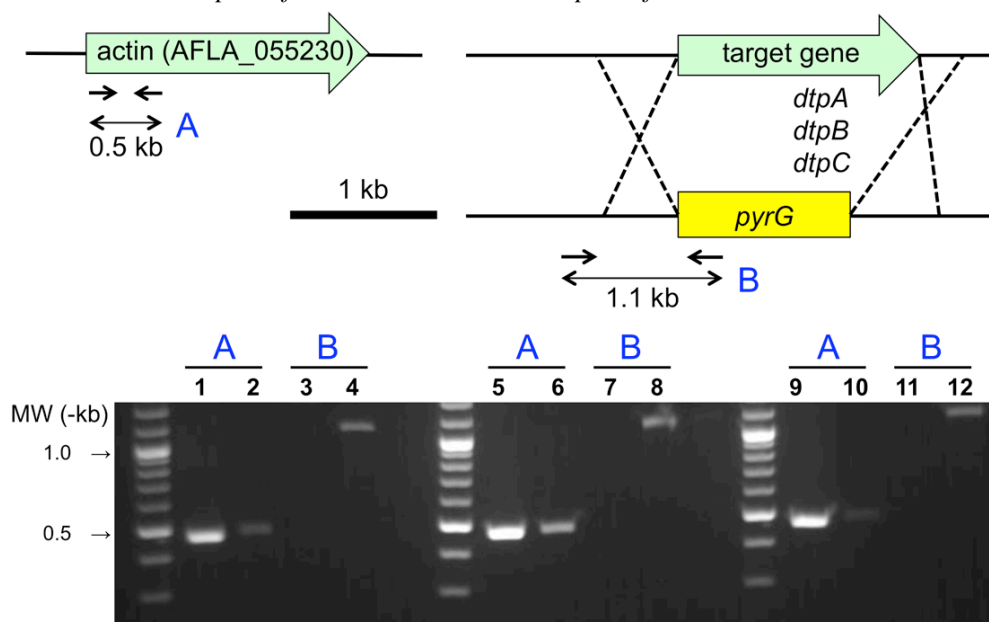


fig. 3-4 各遺伝子の破壊に用いたカセットの模式図および電気泳動による遺伝子破壊確認
電気泳動における各レーンの詳細については第3章第4節(6)に記した

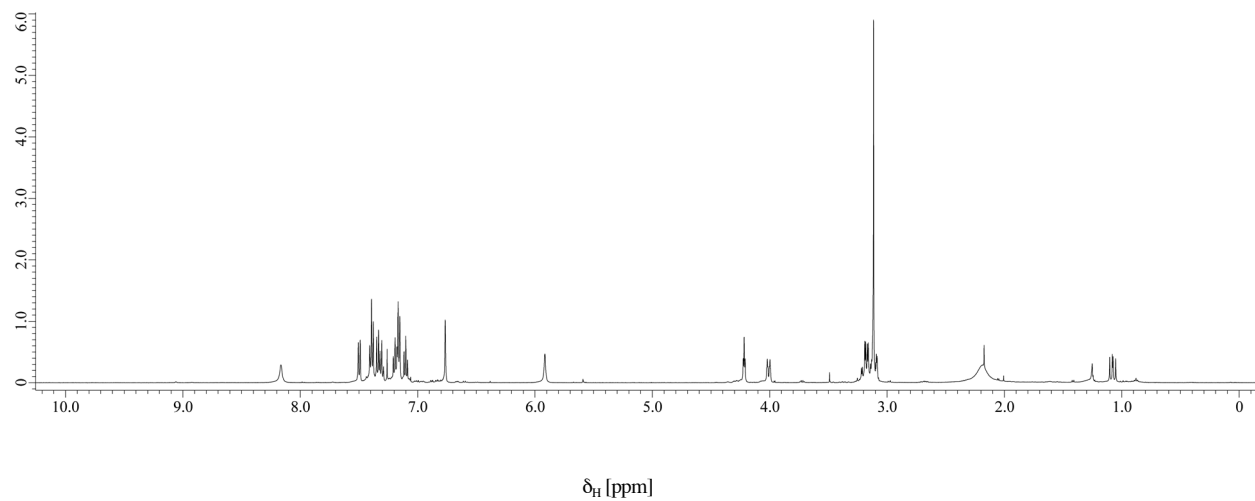
Primer name	Sequence
A_flavus_act_coreF	5'- CACAAACTGGGATGACATGG -3'
A_flavus_act_coreR	5'- GAAGCGGTCTGAATCTCCTG -3'
pKW4077_integ_F	5'- AGATTACCGCCAATGTCTGG -3'
pKW4077_integ_R	5'- AAGCACTTACCTTCGCATTTTC -3'
pKW4078_integ_F	5'- TCCCAATTTCAATGGCTAGAAC -3'
pKW4079_integ_F	5'- TGTCTTGGGGTGGAATACATC -3'

(7) 生合成産物の抽出および解析

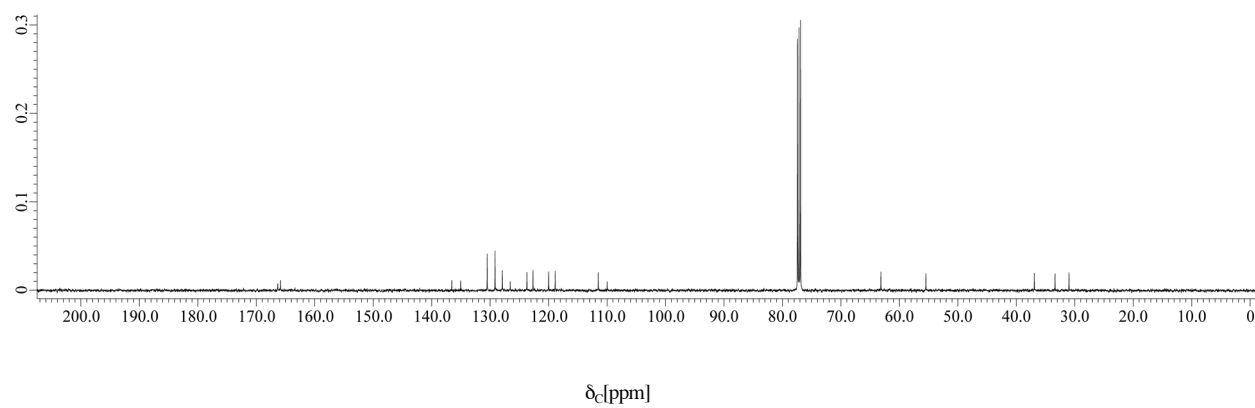
A. flavus A1421 および $\Delta dtpA/A. flavus$ A1421, $\Delta dtpB/A. flavus$ A1421 and $\Delta dtpC/A. flavus$ A1421 を 30 °C、14 日間 potato-dextrose 寒天培地にて培養し、等量のアセトンにて抽出した。得られたアセトン画分を減圧下濃縮した後に、酢酸エチル/水にて分配した。酢酸エチル画分を減圧下濃縮し、得られた乾固物をメタノールに溶解させ、HPLC-MS にて解析した。

第6節 NMR データ

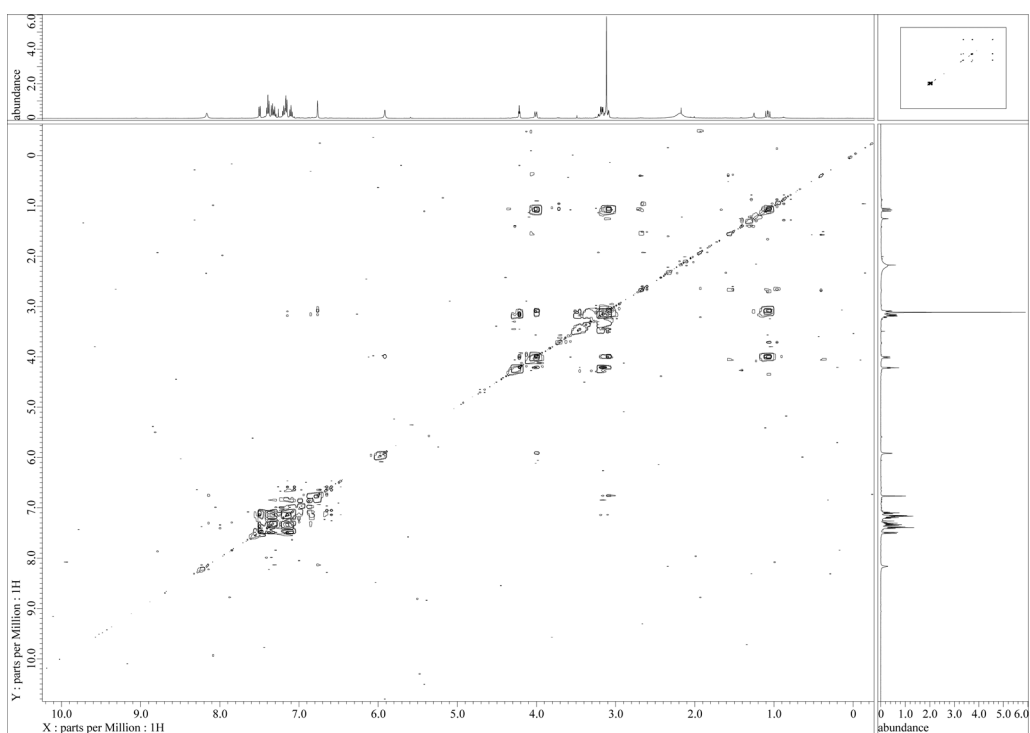
^1H NMR spectrum of **10** in CDCl_3 (500 MHz).



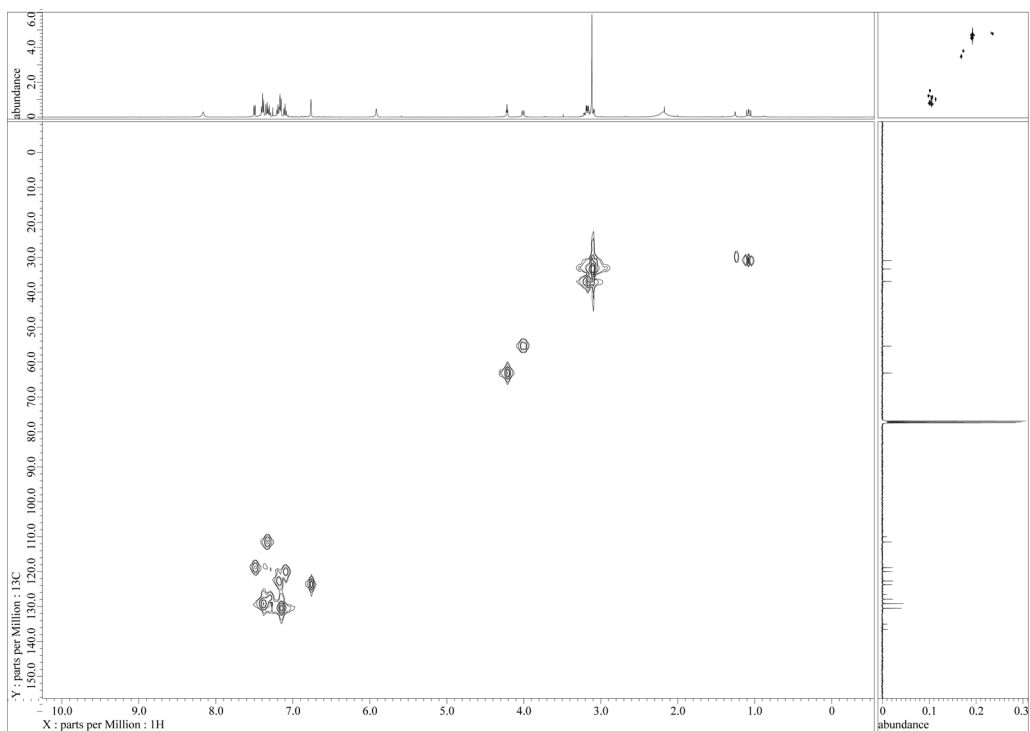
^{13}C NMR spectrum of **10** in CDCl_3 (125 MHz).



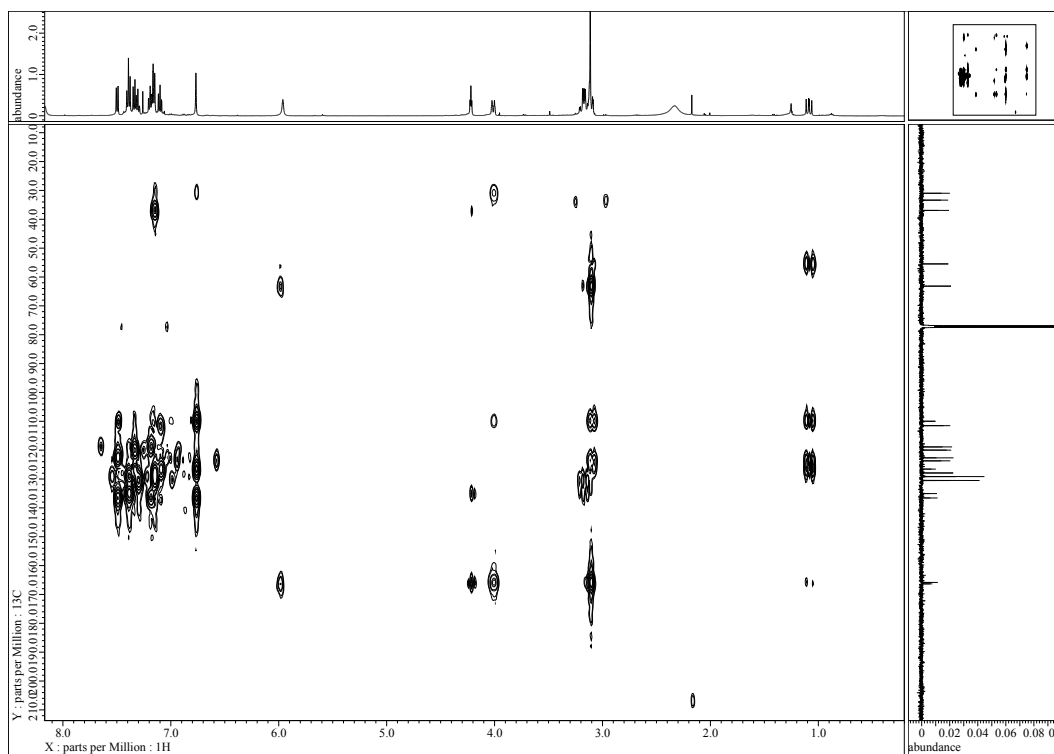
DQF-COSY spectrum of **10** in CDCl₃ (500 MHz).



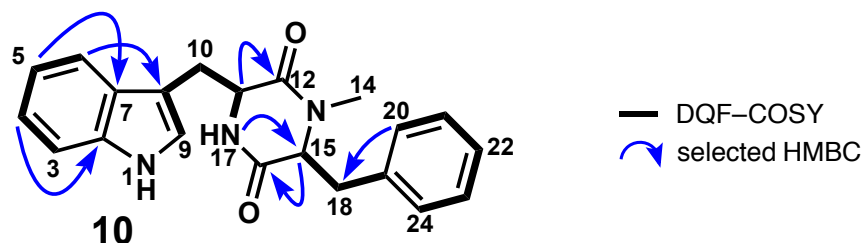
HMQC spectrum of **10** in CDCl₃ (500 MHz).



HMBC spectrum of **10** in CDCl_3 (500 MHz).



NMR data of **10** in CDCl₃. The molecular formula of **10** was established by mass data [ESI-MS: m/z 348 (M+H)⁺; HRESIMS: m/z 348.1707 (M+H)⁺, calcd. for C₂₁H₂₂N₃O₂⁺, 348.1797, Δ = 0 mmu]; [α]_D²⁹: -171.07 (*c* 2.30, CHCl₃).



Position	δ_H^a	mult. (<i>J</i> in Hz)	HMBC ^a	δ_C^b
1 (NH)	8.17	1H brs		
2				136.6
3	7.33	1H d (8.5)	5, 7	111.5
4	7.19	1H dd (8.5, 7.4)	2, 5	122.7
5	7.10	1H dd (7.4, 7.9)	3, 7	120.0
6	7.50	1H d (7.9)	2, 4, 5	118.9
7				126.6
8				110.0
9	6.77	1H s	2, 7, 8, 10	123.7
10	1.09	1H dd (13.6, 11.3)	8, 9, 11	31.0
	3.12	1H dd (13.6, 11.3)	8, 9, 11	
11	4.01	1H m	8, 10, 12	55.5
12				165.9
14	3.10	3H s	12, 15	33.4
15	4.22	1H dd (4.5, 4.0)	18	63.2
16				166.3
17 (NH)	5.96	brs	11	
18	3.14	1H dd (14.2, 4.5)	15	36.9
	3.17	1H dd (14.2, 4.0)		
19				135.0
20	7.15	1H d (7.4)	21	130.5
21	7.39	1H t (7.4)	20, 22	129.2
22	7.30	1H t (7.4)	21, 23	127.9
23	7.39	1H t (7.4)	22, 24	129.2
24	7.15	1H d (7.4)	23	130.5

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

第 7 節 参考文献

1. Christianson, T.W.; Sikorski, R. S.; Dante, M.; Shero, J. H.; Hieter, P. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* **1992**, *110*, 119-122.
2. Tsunematsu, Y.; Ishikawa, N.; Wakana, D.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Moriya, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. Spiro-carbon formation by different chemistry involving pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 818-825.
3. Gardiner, D. M.; Cozijnsen, A. J.; Wilson, L. M.; Soledade, M.; Pedras, C.; Howlett, B. J.; The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans* (pages 1307–1318) *Mol. Microbiol.* **2004**, *53*, 1307-1318.

第4章 dtpA および dtpB の異種発現による *in vivo* 実験

第1節 緒言

前章において、**1** の生合成遺伝子クラスターを同定することに成功した。本章では、各遺伝子を異種発現することで、より詳細な機能解析を行うこととする。異種発現の宿主としては、分子生物学的研究環境が比較的整備されている出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) および **1** の生産菌である *A. flavus* の近縁であり、プロモーター領域等の互換性が高く、かつ **1** の生合成能力を有さない *Aspergillus niger* を用いることとした。NRPS はアミノ酸を縮合する際に、その仲立ちとしてホスホパンテテニル基を必要とする。しかしながら単純に NRPS を異種発現させただけでは、NRPS がホスホパンテテニル基を持たないアポタンパクになってしまうため、十分な酵素活性が期待できない。当研究室では以前から、出芽酵母を宿主とした PKS や NRPS の異種発現システム構築に力を注いできた。そこで今回は、染色体上にホスホパンテテニル基転移酵素である *sfp*¹⁾ (fig. 4-1) をコードする遺伝子を導入した出芽酵母 SCKW-5²⁾ を発現宿主として選択した。本出芽酵母に対し dtpA を導入し、トリプトファンとフェニルアラニンのジケトピペラジンである **9** の再構築を試みる。

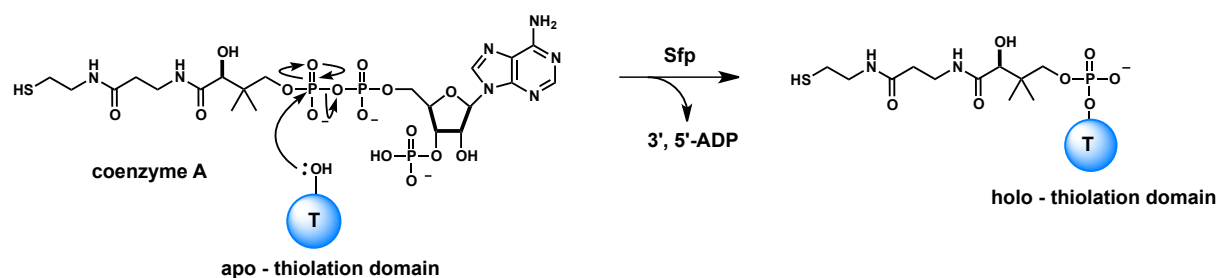


fig. 4-1 Sfp が触媒する thiolation ドメインのホロ化反応

第2節 出芽酵母 SCKW-5 における dtpA の異種発現

前章の結果より、**1** の生合成における最初の反応は、dtpA によるジケトピペラジンの形成であると予想することができた。そこで、dtpA の cDNA 配列をガラクトース誘導型プロモーターの下流に設置し (pKW4171) (fig. 4-2)、出芽酵母 SCKW-5 へと導入した。

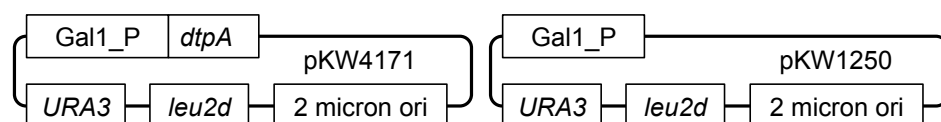


fig. 4-2 pKW4171 および pKW1250 の模式図

コントロールである空ベクター (pKW1250) を導入した株、dtpA を導入した株の両者の培養液を酢酸エチルにて分配し、有機層に含まれる化合物を LC-MS にて解析した。

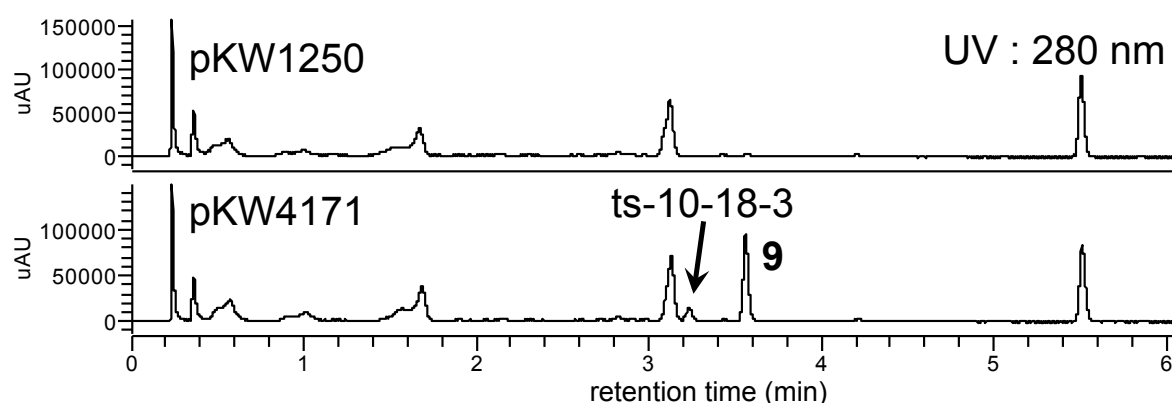


fig. 4-3 pKW1250 および pKW4171 を導入した A1179 生産化合物の比較

各株より抽出した化合物の UV = 280 nm におけるクロマトグラムを記した

dtpA がクローニングされた pKW4171 を導入した株では、前章において dtpB の破壊株において見られた **9** と同一の化合物が生産されると同時に、コントロールである空ベクター (pKW1250) を導入した株には見られない化合物 ts-10-18-3 の合成を確認した。これら2つの化合物について、以下のスキームにより単離精製した。すなわち、2 L の YPD 培地をろ過することで培養液上清のみを回収し、酢酸エチルにより分液操作を行った。得られた酢酸エチル層を濃縮することで、543.4 mg の酢酸エチル抽出物を得た。本抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し粗精製を行った後、HPLC による精製を行うことで、**9** と考えられる化合物を 6.6 mg、ts-10-18-3 を 1.9 mg 得た (fig. 4-4)。

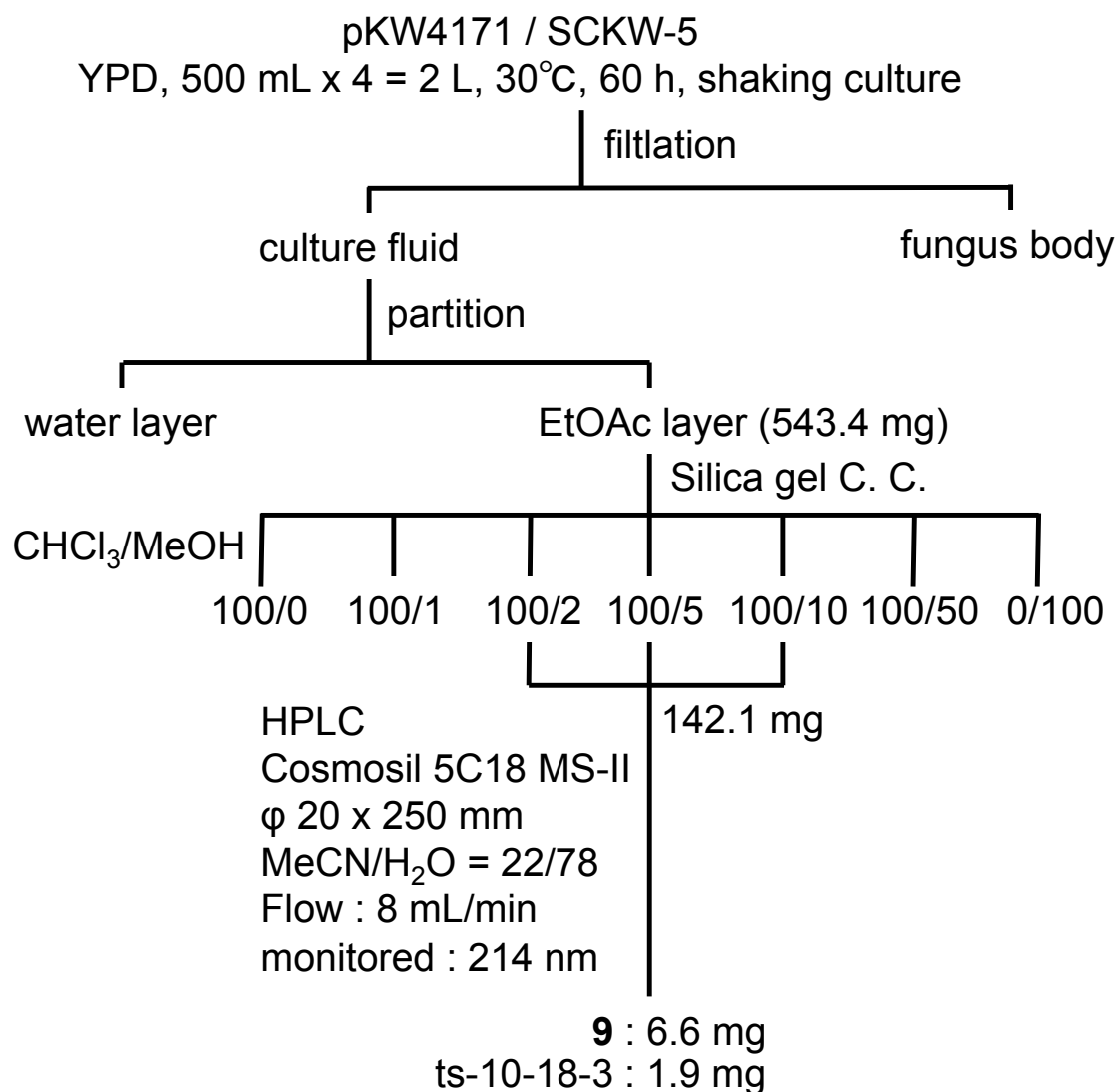


fig.4-4 **9** および ts-10-18-3 の精製スキーム

得られた化合物について各種 NMR スペクトルを解析することで、それぞれの構造を化合物 **9** およびトリプトファンとロイシンのジケトピペラジンであると同定した (fig.4-5)。

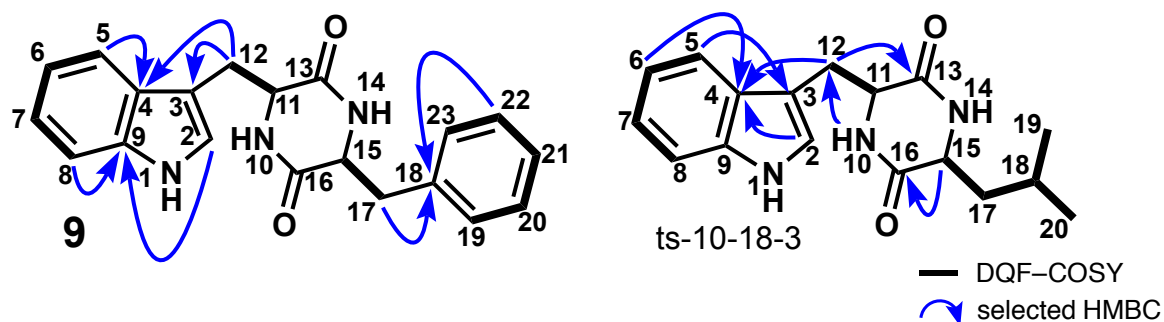


fig.4-5 化合物 **9** および ts-10-18-3 の化学構造

第3節 糸状菌 *Aspergillus niger* における dtpA および dtpB の異種発現

第2節において dtpA を出芽酵母にて異種発現させることで、dtpA の活性がトリプトファンとフェニルアラニンのジケトピペラジン **9** を合成するものであると同定した。本節では、dtpA に加えて dtpB を同時に異種発現させることで、dtpB の活性を明らかにすることを目的とした。第2節において使用した出芽酵母は、分子生物学的ツールが整っており、遺伝子の異種発現および物質生産を比較的容易に行うことができた。しかしながら、糸状菌由来遺伝子を発現し化合物を生産する際には、生産量の点において糸状菌 *Aspergillus niger* を用いる方が有利であることが、近年の当研究室における知見から明らかとなってきた。一例として、トリプトファンとプロリンのジケトピペラジンである brevianamide F (**11**)³⁾においては、出芽酵母 SCKW-5 を宿主とした際は、培養液 1 L あたり 22 mg の **11** が²⁾、糸状菌 *Aspergillus niger* を宿主とした際は、培養液 1 L あたり 40 mg の **11** が合成されることが分かっていた。dtpA および dtpB による反応は2つの酵素によるものであるため、dtpA のみの反応よりさらに効率が低下し、十分な化合物量が獲得できないことが懸念された。そこで本節では、宿主として *A. niger* を使用し、dtpA および dtpB を同時に異種発現させることとした。

dtpA および dtpB をそれぞれアミラーゼプロモーター⁴⁾の下流に配置し (pKW4108) (fig.4-6)、プロトプラスト-PEG 法により *A. niger* A1179 株に導入した。このときコントロールとして、空ベクターである pKW20088 を導入した株も用意した。

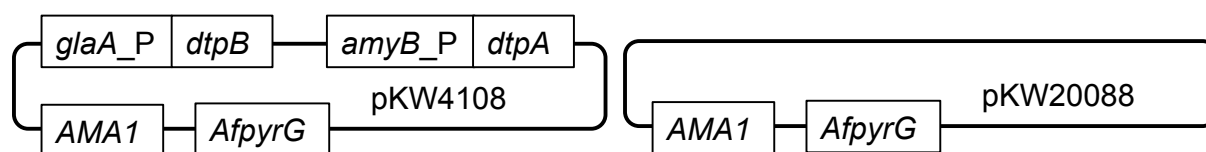


fig. 4-6 pKW4108 および pKW20088 の模式図

両プラスミドを導入した A1179 株の CD/starch 培養液を酢酸エチルにより抽出し、得られた抽出物を LC-MS により解析した。すると、*ntpA* および *ntpB* を発現する pKW4108 を導入した場合のみ、214 nm に強い吸収を持つ化合物が生産されたことを確認した (fig. 4-7)。LC-MS における保持時間、UV スペクトル、高分解能質量電荷比の比較により、本化合物は *ntpC* の破壊株より単離された **10** と同じ化合物であることが分かり、*ntpA* および *ntpB* が働くことで **10** が合成されることが分かった。

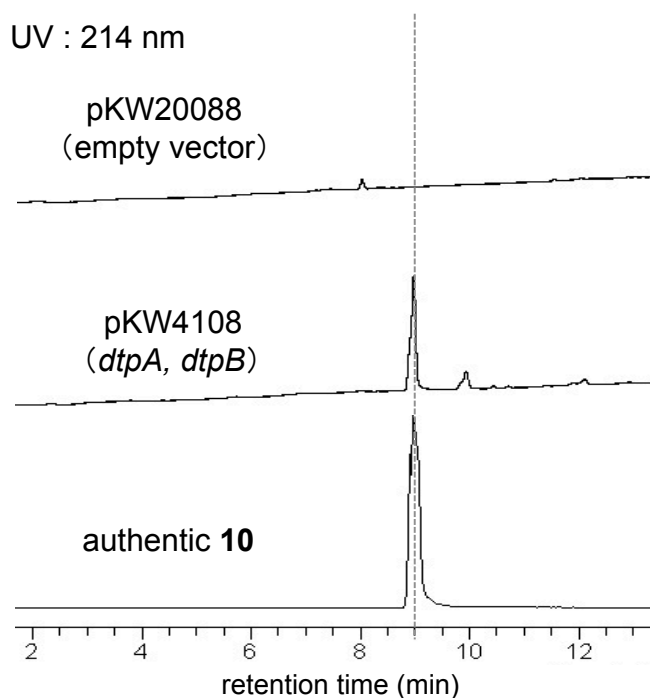


fig. 4-7 *ntpA* および *ntpB* により生産された化合物 **10** と標品の比較

上段から順に pKW20088/A1179 培養液抽出物、pKW4108/A1179 培養液抽出物、**10** 標準物質、それぞれ UV=214 nm におけるクロマトグラムを示した

第4節 考察

本章では dtpA および dtpB を異種発現することで、それらの機能を推定した。NRPS をコードする dtpA を *S. cerevisiae* にて異種発現させることで、トリプトファンとフェニルアラニンのジケトピペラジン **9** が主生成物として与えられ、同時に微量ではあるもののトリプトファンとロイシンのジケトピペラジン ts-10-18-3 が与えられた。これらの結果および前章までの結果を考え合わせると、dtpA は **1** の生合成において最も初期段階でトリプトファンとフェニルアラニンを縮合させることで **9** を合成していると考えられる。このことは、第3章において dtpB および dtpC の破壊株においても **9** に対応する質量電荷比を与える化合物が生産されていることに一致している。一方で ts-10-18-3 においては、dtpA がコードする NRPS において基質を選択するアデニル化ドメイン⁵⁾の基質許容性にゆとりがあることを示している。得られた化合物の量比から、フェニルアラニンに対する特異性が最も高いことは明らかであるが、基質の形やかさ高さにおいてフェニルアラニンとある程度共通性が見られるロイシンに対しても基質許容性を有しているために、**9** の生産と同時に、ts-10-18-3 が生産されたと考えられる。

dtpA に加え、メチル基転移酵素をコードする dtpB を同時に発現させることで一方のアミド窒素がメチル化された *N*-メチルジケトピペラジン **10** が合成された。この結果から、dtpA が **9** を合成し、さらに dtpB がメチル基を付加することで **10** が合成されたものと考えられる (fig. 4-8)。今回の実験のみでは、dtpB が先に働き、フェニルアラニンのアミノ基をメチル化した後に、dtpA が *N*-メチルフェニルアラニンおよびトリプトファンを縮合する可能性を否定することはできない。しかし、dtpA が **9** を合成することから、恐らく本来の基質はフェニルアラニンであると考えられる。dtpA および dtpB の触媒の順序に関しては、今後 *in vitro* 反応を行うことで、より詳細な知見が得られるものと思われる。いずれにしても、dtpA および dtpB を異種発現することで、**1** の中間体と考えられる2つの化合物を合成することに成功し、前章の遺伝子破壊実験の結果と併せ、本生合成遺伝子クラスターが **1** の生合成に関与することを証明することに成功した。

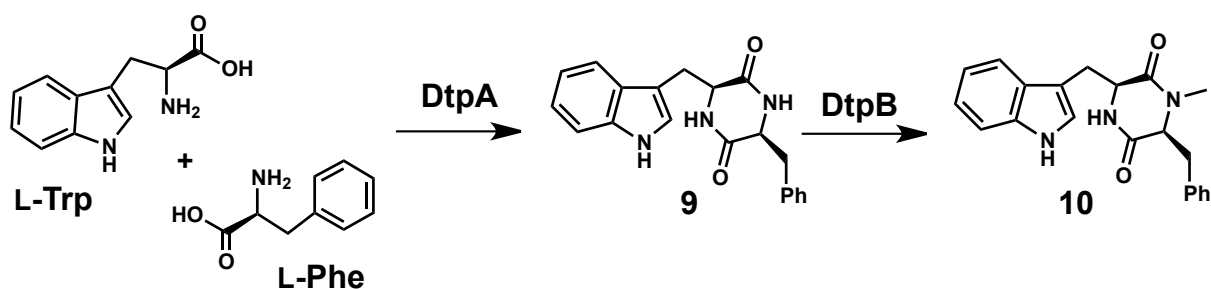


fig. 4-8 dtpA および dtpB が触媒する生合成反応

第5節 実験項

(1) 使用菌株

S. cerevisiae SCKW-5

dtpA 異種発現宿主として使用した

A. niger A1179

dtpA および dtpB の異種発現宿主として使用した

(2) PCR 条件

PrimeSTAR GXL DNA Polymerase を使用した。

詳細な条件については第3章第4節(2)に従った。

(3) 鋳型 DNA

SCKW-5 における発現カセットは、*A. flavus* A1421 由来 cDNA を使用し、A1179 における発現カセットは、*A. flavus* A1421 由来ゲノム DNA を鋳型として使用した。

(4) cDNA の調製

[total RNA 抽出]

total RNA 抽出には RNAqueous®Kit (ABI) を使用した。potato-dextrose 寒天培地上で 30°C, 5 days 培養した菌体より total RNA を抽出。

(1) 100 μ L の Elution buffer を 1.5 mL チューブに入れ 80 °C でインキュベート。

(2) 1 mL Lysis/Binding solution をバイオマッシャーII (nippi) に分注。

(3) 寒天培地上より単離した菌体を、液体窒素で冷却した乳棒・乳鉢を用い、液体窒素で冷却しながらすり潰した。

(4) 液体窒素が蒸発後、バイオマッシャーII へ菌体を添加し溶液に懸濁。

(5) 4 °C で 1 min 遠心後、上清の半量を 1.5 mL チューブへ移し、バイオマッシャーII 内の菌体をすり潰した。

(6) 1.5 mL チューブへ移した上清をバイオマッシャーII へ戻し、4 °C で 2 min 遠心。

(7) 新しい 1.5 mL チューブに上清 700 μ L と 64%エタノール溶液 700 μ L を加え混和し、氷上で 5 min 静置。

(8) 遠心後、スピncラムにエタノール混和溶液の半量を添加。

(9) 遠心しフロースルー液を除去後、残りの半量を添加。

(10) 遠心しフロースルー液を除去後、wash#1 溶液を 500 μ L 添加。

(11) 遠心しフロースルー液を除去後、wash#2#3 溶液を 700 μ L 添加。

(12) 遠心後フロースルー液を除去し、再び wash#2#3 溶液を 700 μ L 添加。

(13) 遠心後フロースルー液を除去し、受けのチューブを新しい 1.5 mL チューブに変え、80 °C で加温していた Elution buffer 90 μ L を添加。

(14) 遠心し、total RNA 溶液を獲得。

[ゲノム DNA の分解処理]

TURBO DNA-free™ Kit (ABI) を使用した。

- (1) RNA solution 75 μ L に対し、10 x TURBO DNase Buffer 8.5 μ L と DNase 1.5 μ L を混和し、37 °C で 30 min インキュベート。
- (2) 室温に戻した DNase Inactivation Reagent を 8.5 μ L 添加し混和。
- (3) タッピングしつつ室温で 5 min インキュベート。
- (4) 遠心後、上清を 1.5 mL チューブへ移し、DNase 処理済み total RNA solution とした。

[RT-PCR]

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (ABI)を利用。

- (1) PCR チューブ中で RNA solution 10 μ L (RNA 約 1 ng), 10 x RT buffer 2 μ L, 25 x dNTP Mix (100 mM) 0.8 μ L, 10 x RT Random Primers 2 μ L, MultiScribe™ Reverse Transcriptase 1 μ L, Nuclease-free H₂O 3.2 μ L, Nuclease-free H₂O 3.2 μ L を混和。
- (2) Thermal cycler を利用して 25 °C で 10 min, 37 °C で 2 h, 85 °C で 5 min インキュベートし、これを cDNA とした。

(5) 異種発現プラスミドの構築

[dtpA 発現用カセットの作成]

dtpA 発現カセットは、予想 ORF をガラクトース誘導型プロモーターの下流に配置することで作成した。インサートとなる dtpA 予想 ORF を pKW4166_5440_F / pKW4166_5440_R のプライマーを用いて PCR により増幅した。得られた PCR 断片を、SalI にて消化した pKW1250 とともに *S. cerevisiae* BY4741 株へと導入し、相同組換えを行った。相同組換えにより構築されたプラスミドを *E. coli* XL-1 Blue に導入し、コロニーPCR および制限酵素消化により、正しく構築されたプラスミドを選択し、塩基配列解析に供した。

Primer name	Sequence
pKW4166_5440_F	5'- TTAACGTCAAGGAGAAAAAACTATAATGAGCTGCGAGAATGAAGC -3'
pKW4166_5440_R	5'- TTCGCTTATTTAGAAGTGGCGCGCCCTAAGCCTCCCAGTCGATAG -3'

[dtpA, dtpB 共発現用カセットの作成]

まず dtpA を *Aspergillus* 属にて単独で発現させるために、dtpA を amy(taka)プロモーターの下流へとクローニングした。インサートとなる dtpA をコードするゲノム DNA 配列を、それぞれ pKW4075_F / pKW4075_R のプライマーを用い PCR により増幅した。得られた PCR 断片を、HindIII にて消化した pKW19023 とともに *S. cerevisiae* BY4741 株へと導入し、相同組換えを行った。相同組換えにより構築されたプラスミドを *E. coli* XL-1 Blue に導入し、コロニーPCR および制限酵素消化により、正しく構築されたプラスミドを選択し、塩基配列解析に供した。構

築されたプラスミドを pKW4075 とした。

続いて、*ntpA* および *ntpB* の共発現カセットを構築した。まず *ntpB* をコードするゲノム DNA 配列を、pKW4107_8_F/pKW4107_8_R のプライマーを用い PCR により増幅した。さらに amy (taka) プロモーター-*ntpA*-*trpC* ターミネーターのカセットを、pKW4108_F/pKW4108_R のプライマーを用い PCR により増幅した。得られた PCR 断片を、SphI にて消化した pKW20093 とともに *S. cerevisiae* BY4741 株へと導入し、相同組換えを行った。相同組換えにより構築されたプラスミドを *E. coli* XL-1 Blue に導入し、コロニー PCR および制限酵素消化により、正しく構築されたプラスミドを選択し、塩基配列解析に供した。構築されたプラスミドを pKW4108 とした (fig. 4.9)。

Primer name	Sequence
pKW4075_F	5'- ACCCCACAGAAGGCAATGAGCTGCGAGAATGAAG -3'
pKW4075_R	5'- GAAGCGGTCTGAATCTCCTG -3'
pKW4107_8_F	5'- TCCCCAGCATCATTACACCTCAGCAATGGTGAAGAACAATGCCG -3'
pKW4107_8_R	5'- TAAATGTCGGTGTGACGTTGCATCGGCATGCTGTACATGCTTTCC -3'
pKW4108_F	5'- CGATGCAACGTCACACCGACATTTAGGTACTAAGCGCCGAAATCAG -3'
pKW4108_R	5'- ACATACCCGTAATTTTCTGGGCATTACCGACAGCCAGCTTCTCC -3'

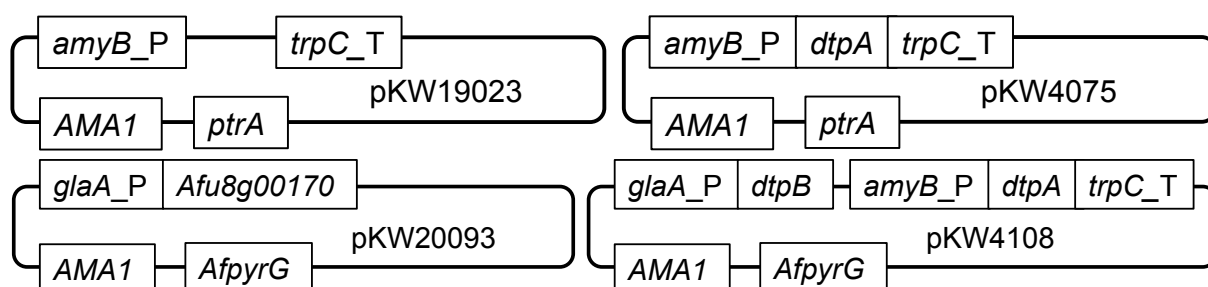


fig. 4.9 pKW19023, pKW20093, pKW4075, pKW4108 の模式図

(6) 出芽酵母 SCKW-5 による 9 の合成

[SCKW-5 形質転換方法]

SCKW-5 を YPD 培地にて 30 °C で 6 時間培養し、培養液 1 mL を集菌した。1 mL の 0.1 M LiOAc にて洗浄後、50%PEG #4000 240 μ L、1 M LiOAc 36 μ L、2 mg/mL sssDNA 25 μ L、pKW4171 2 μ L を順次加えた。室温下 30 分間静置後、42 °C 15 分間静置した。遠心分離後、上清を除去した。滅菌蒸留水 50 μ L を加え SC/Ura 寒天平板培地に植え、30 °C で 48 時間培養した。

[*ntpA* 発現誘導および物質生産]

形成されたコロニーを 3 mL の SC/Ura 培地にて回収し、30 °C で 12 時間培養した。培養液を 20 mL の SC/Ura 液体培地に移し 30 °C で 24 時間培養した。20 mL の SC/Leu 培地にて 48 時間培養しプラ

スミドコピー数を増加させた。その後、1 L の YPD 液体培地に継代した。30 °C で 12 時間培養した後に最終濃度 2% となるようにガラクトースを添加した。

[9 の抽出、単離・精製]

第 4 章第 2 節に記載した。

(7) *A. niger* A1179 による 10 の合成

[A1179 形質転換方法]

[形質転換]

- (1) CD / UU 寒天培地より A1179 の胞子を収集し、CD/UU 液体培地 100 mL 中で 30 °C, 15 h 程度振とう培養。
- (2) 菌体を濾過後、以下の反応液を滅菌フィルター (0.20 μ m, hydrophilic) を通して加え、30 °C, 50 rpm で振とう、3 h インキュベートすることでプロトプラスト化。
反応液組成: 20 mg/mL Yatalase
 20 mg/mL Lyzing enzyme
 10 μ L/mL β -glucuronidase in *Aspergillus* litic buffer
- (3) 0.8 M NaCl 溶液を加えて濾過後、20 °C, 2,500 rpm, で 5min 遠心。
- (4) 上清を捨て、0.8 M NaCl 溶液 6 mL を添加。
- (5) 10 μ L を取り、血球計算盤と顕微鏡により、プロトプラスト化及びその数を確認。
- (6) 以下の反応液を調整し、形質転換。

反応液組成:	STC buffer200 μ L
	50% PEG#4000*40 + 1000 μ L
	plasmid DNA solution20 μ L
	プロトプラスト1.0 \times 10 ⁷ 個

※ 組成中 50% PEG8000 が 40 μ L の状態で氷上 20 min 静置し
その後、50% PEG8000 を 1000 μ L 加え、さらに 5 min 静置。

- (7) 反応液全量を CD + 0.8 M NaCl 寒天培地 (2% agar) 上に重層。
- (8) CD + 0.8 M NaCl 軟寒天培地(0.5% agar)を約 50 °Cで重層。
- (9) 30 °Cで 5 day 培養。
- (10) 形成されたコロニーを再び CD 寒天培地に移し二次選択。

[dtpA および dtpB 発現誘導および物質生産]

- (1) 二次選択後の菌体に 0.1% tween 80 を加え、胞子懸濁液を作成。
- (2) 500 mL の CD/starch 液体培地に 1 mL の胞子懸濁液を添加。
- (3) 30 °C, 180 rpm, 7 days 培養。

[10 の抽出、単離・精製]

以下のスキームに従い行った。

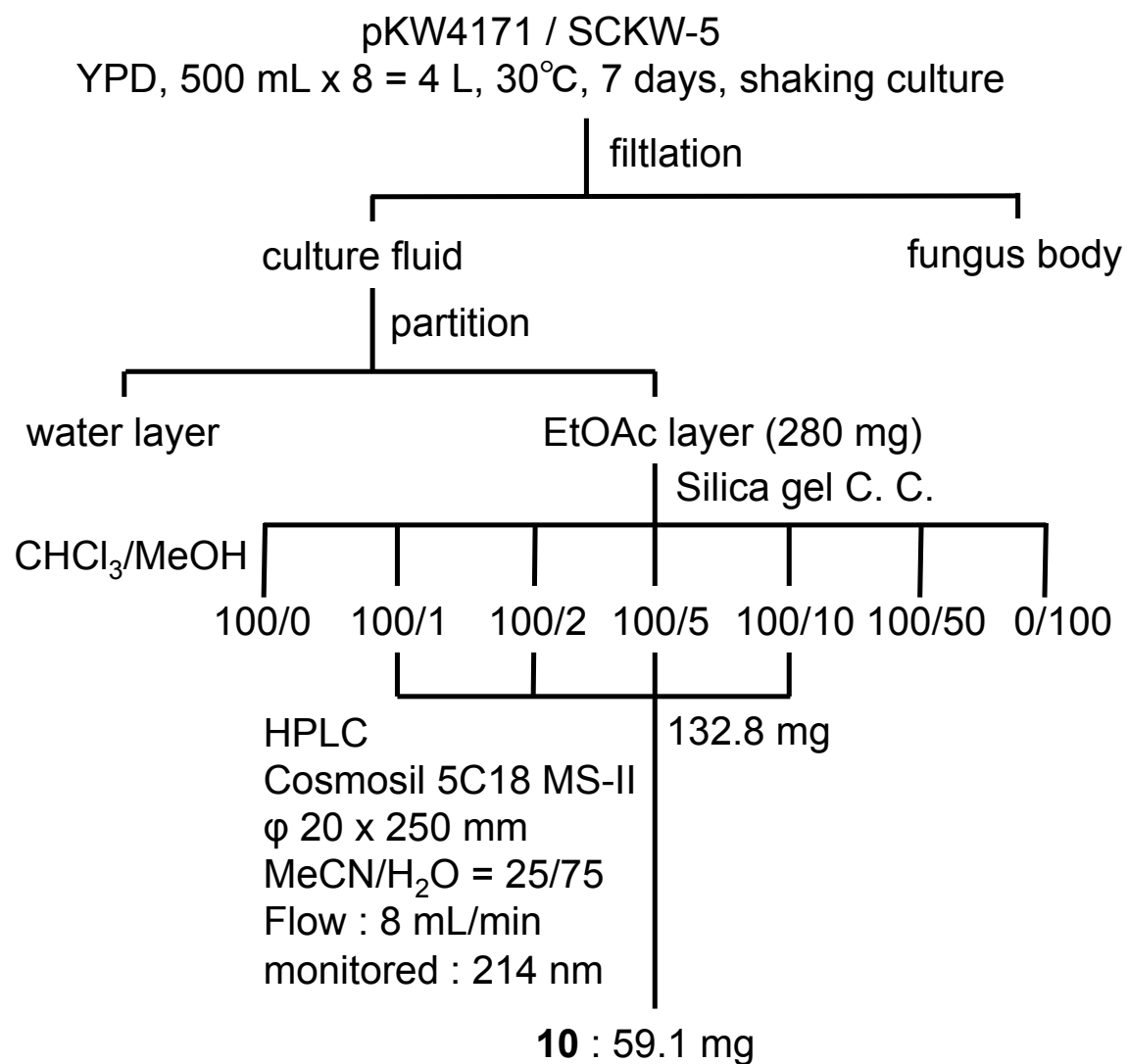
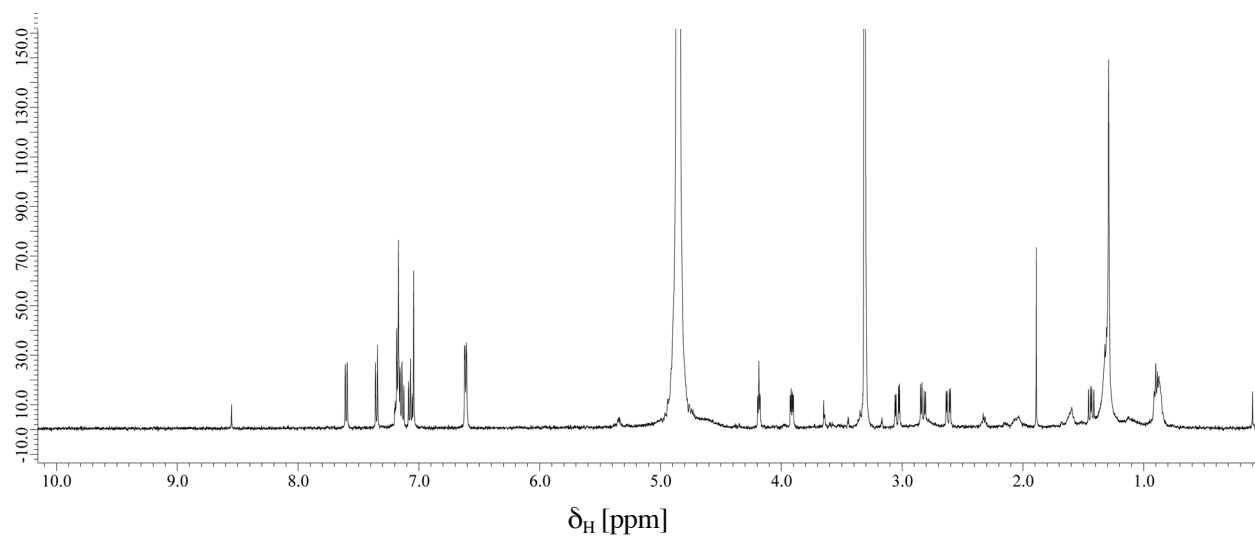


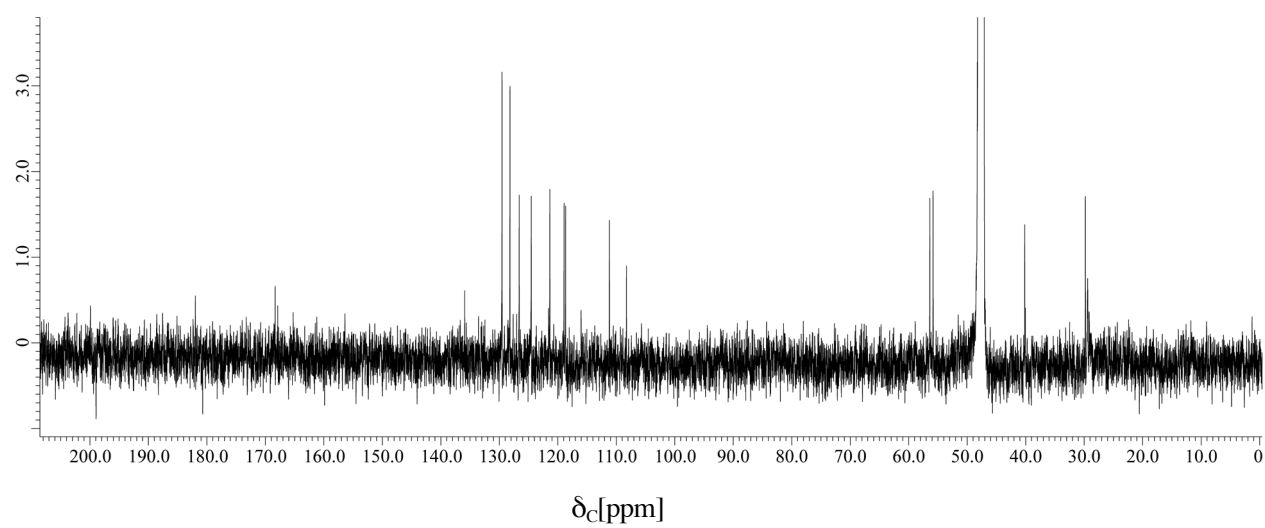
fig.4-10 **10** の精製スキーム

第6節 NMR データ

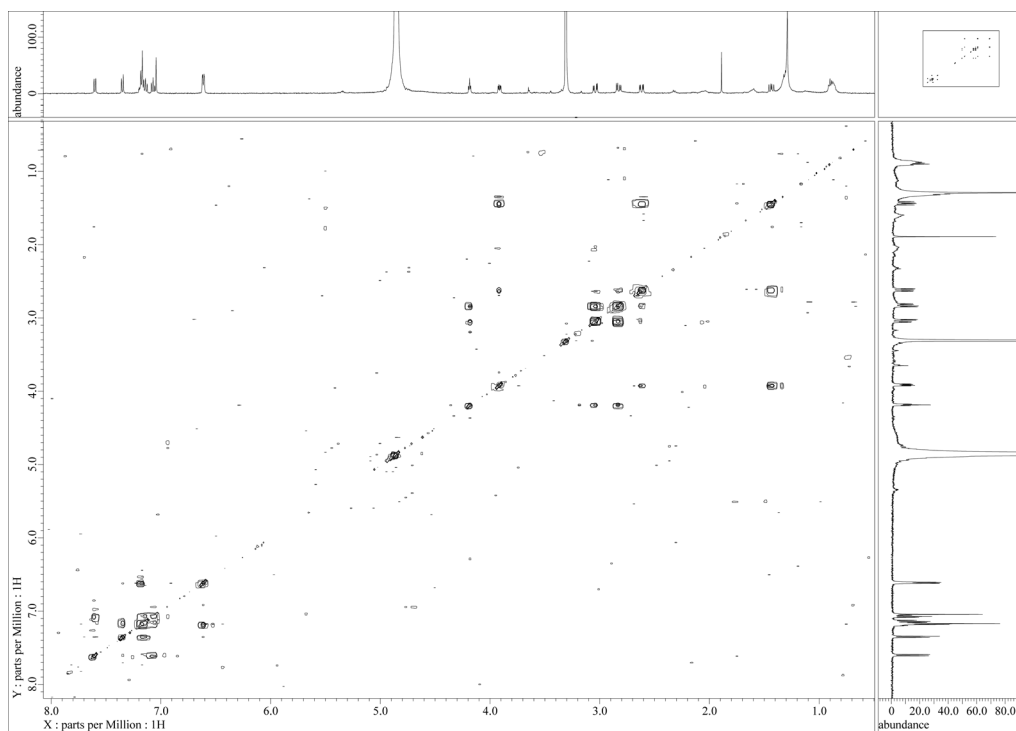
^1H NMR spectrum of **9** in CD_3OD (500 MHz).



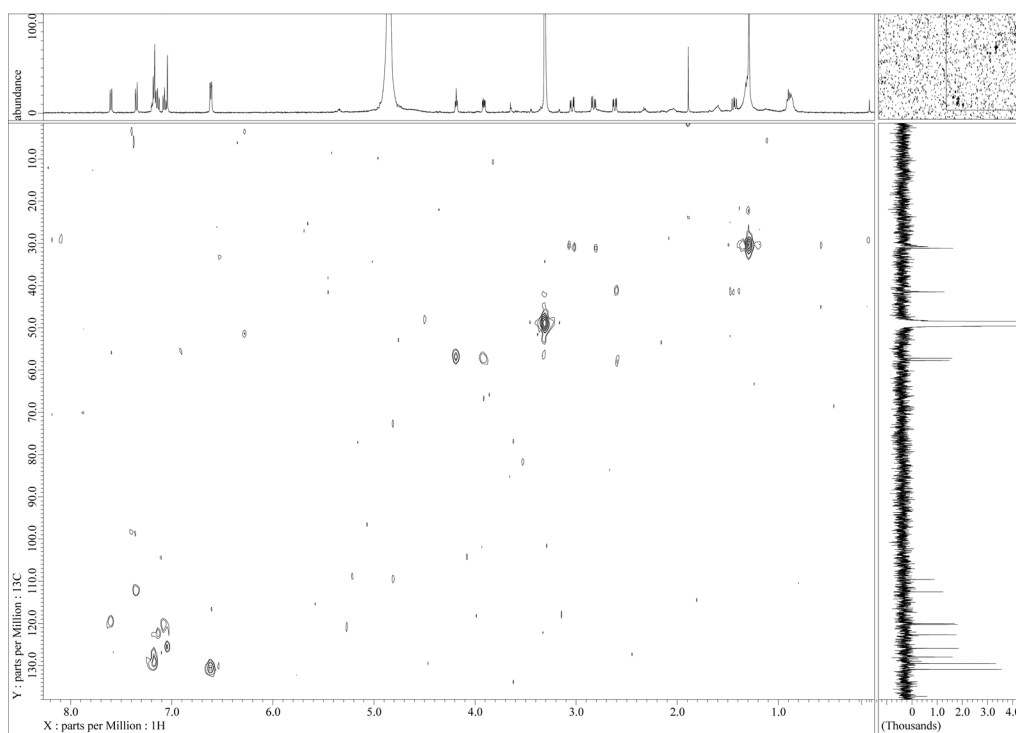
^{13}C NMR spectrum of **9** in CD_3OD (125 MHz).



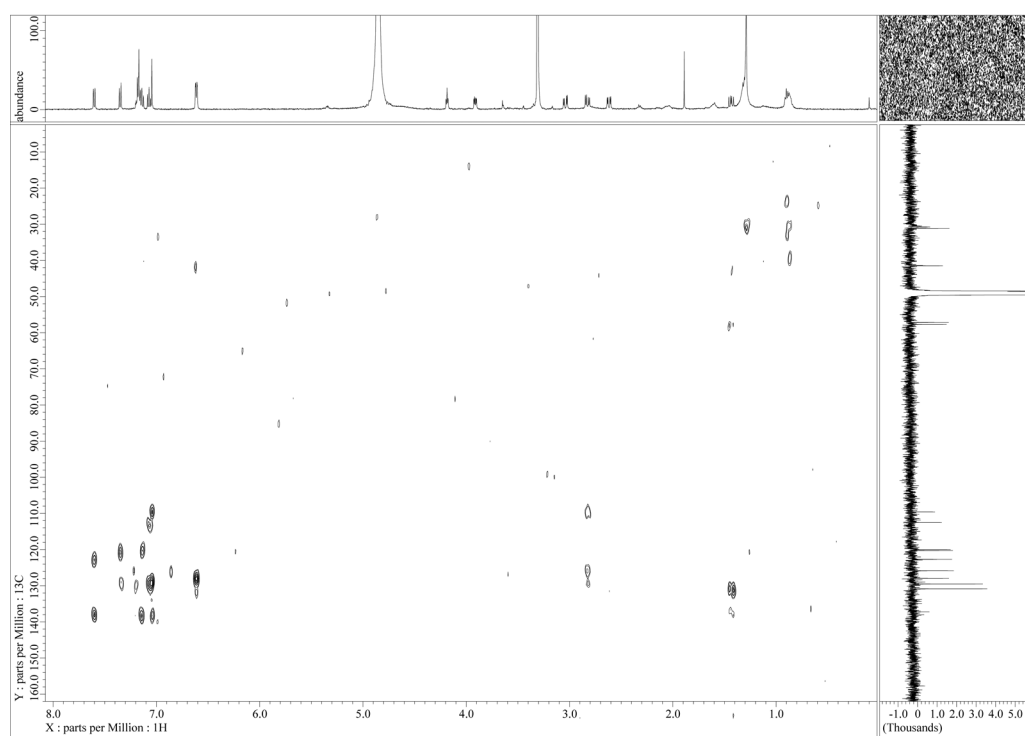
DQF-COSY spectrum of **9** in CD₃OD (500 MHz).



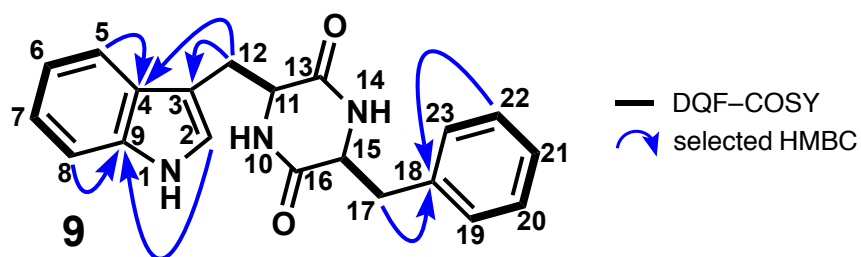
HMQC spectrum of **9** in CD₃OD (500 MHz).



HMBC spectrum of **9** in CD₃OD (500 MHz).



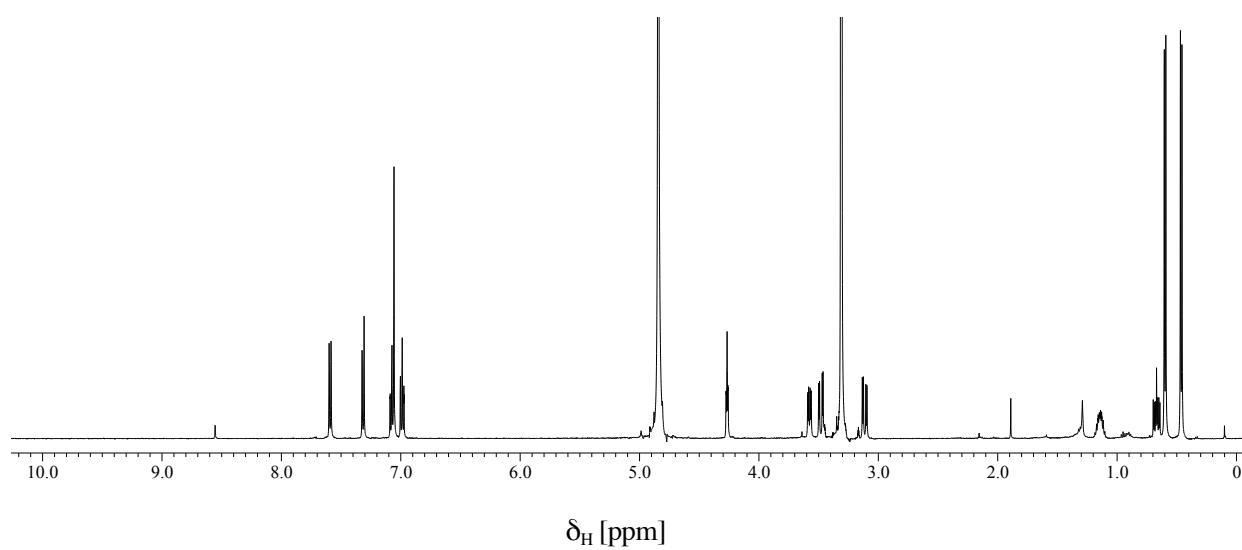
NMR data of **9** in CD₃OD. The molecular formula of **9** was established by mass data [ESI-MS: m/z 334 (M+H)⁺; HRESIMS: m/z 334.1550 (M+H)⁺, calcd. for C₂₀H₂₀N₃O₂⁺, 334.1550, Δ = 0 mmu]; [α]_D²⁷: -495.00 (*c* 0.01, CH₃OH).



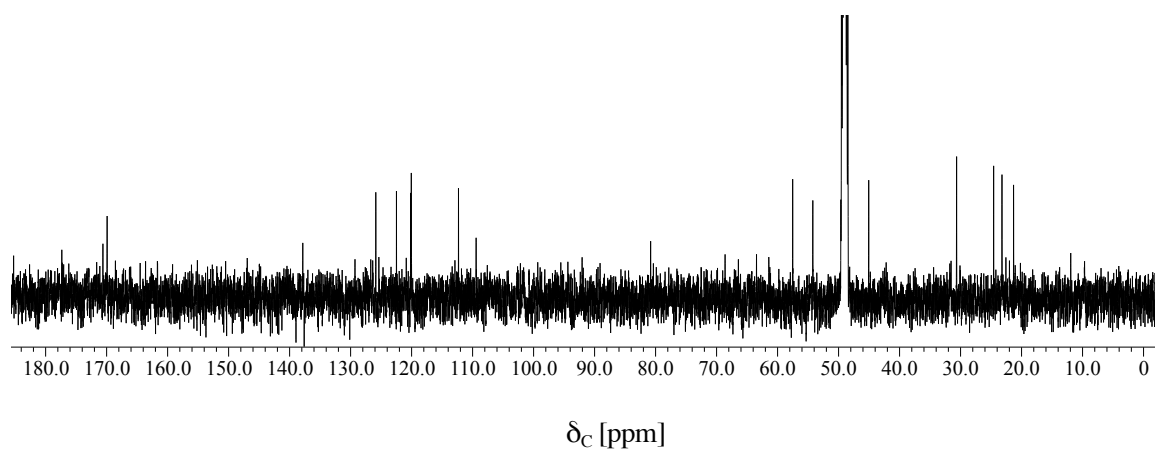
Position	δ_H^a	mult. (<i>J</i> in Hz)		HMBC ^{a)}	δ_C^b
1 (NH)		brs			
2	7.04	1H	s	3, 4, 9	125.9
3					109.6
4					129.5
5	7.35	1H	d (7.5)	4, 6	112.5
6	7.07	1H	ddd (7.5, 7.5, 1.2)	5	120.3
7	7.14	1H	ddd (7.5, 7.5, 1.2)	6, 9	122.7
8	7.60	1H	d (7.5)	7, 9	120.0
9					138.0
10 (NH)					
11	4.19	1H	dd (5.2, 4.0)		57.2
12	2.82	1H	dd (14.6, 5.2)	2, 3, 4	31.1
	3.04	1H	dd (14.9, 4.0)		
13					167.9
14 (NH)					
15	3.91	1H	ddd (8.9, 4.0, 1.2)		57.8
16					168.3
17	1.44	1H	dd (13.5, 9.2)	15, 18, 19	41.5
	2.62		dd (13.5, 4.0)		
18					137.3
19	6.61	1H	dd (7.5, 1.7)	21	130.9
20	7.17	1H	m		129.5
21	7.19	1H	m	20, 22	127.9
22	7.17	1H	m		129.5
23	6.61	1H	dd (7.5, 1.7)	21	130.9

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

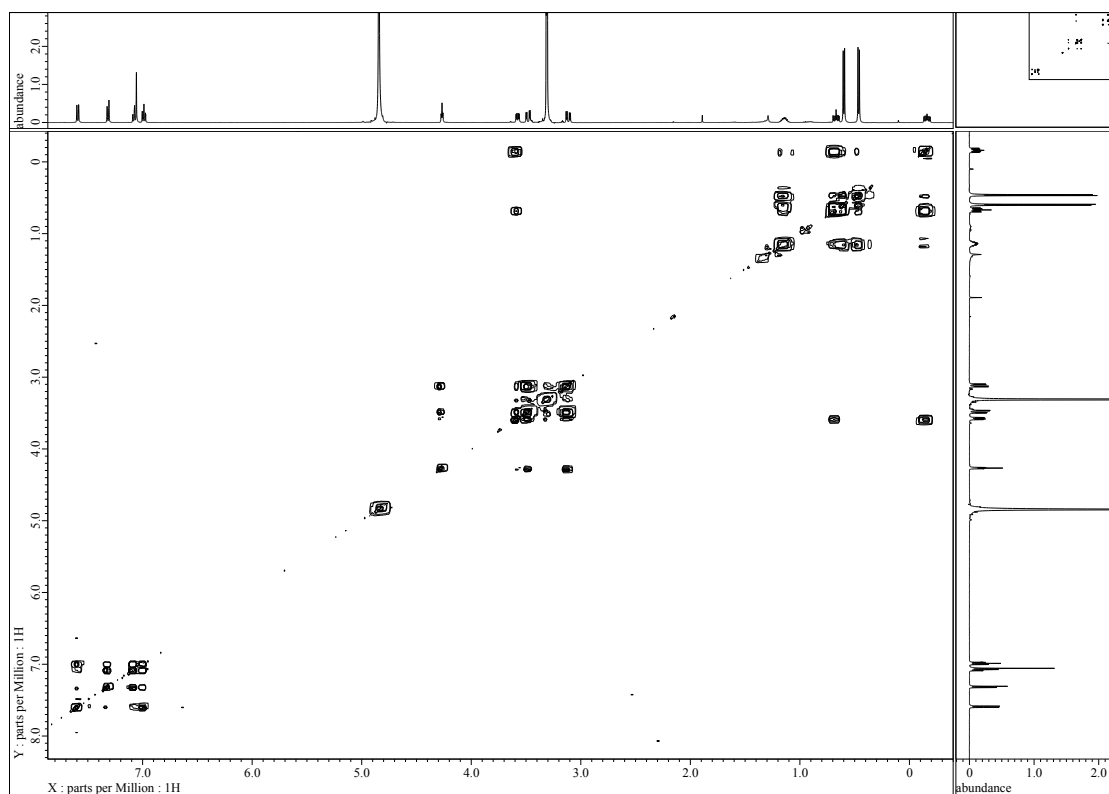
^1H NMR spectrum of ts-11-14-1 in CD_3OD (500 MHz).



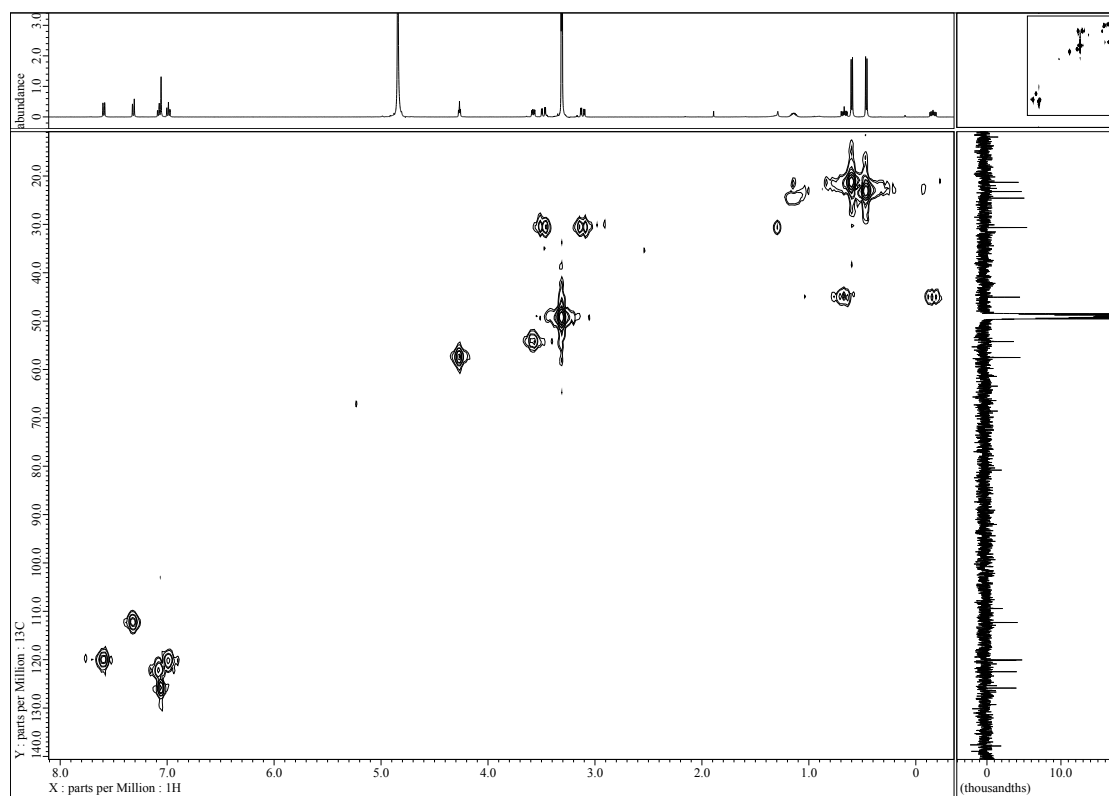
^{13}C NMR spectrum of ts-11-14-1 in CD_3OD (125 MHz).



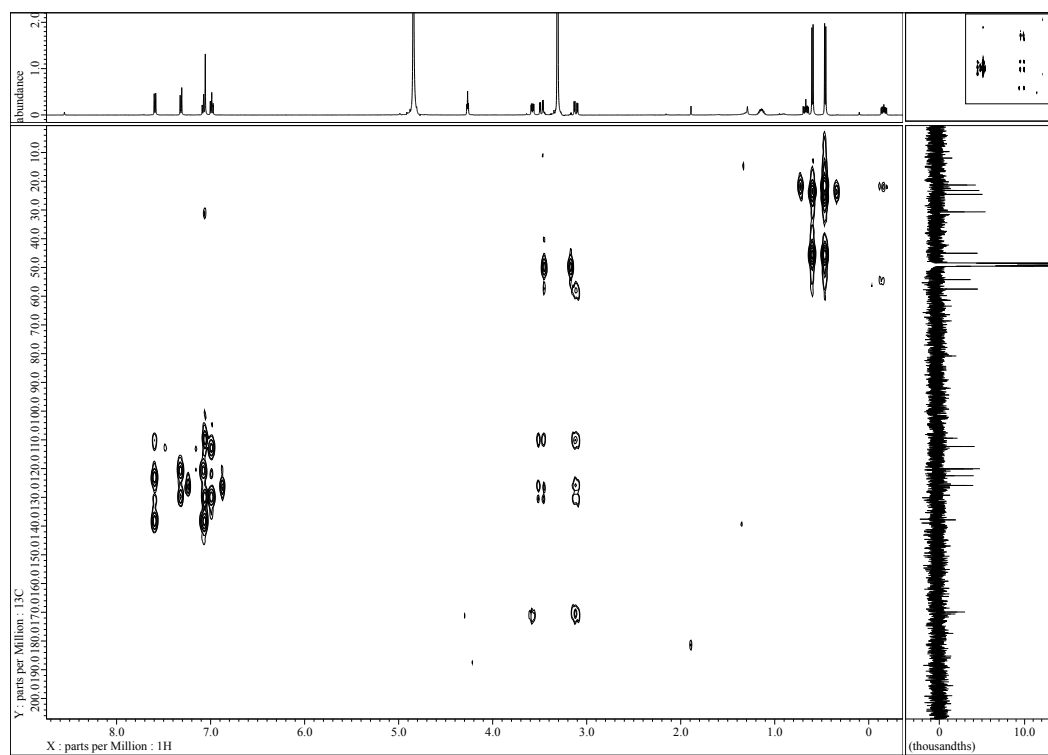
COSY spectrum of ts-11-14-1 in CD₃OD (500 MHz).



HMQC spectrum of ts-11-14-1 in CD₃OD (500 MHz).

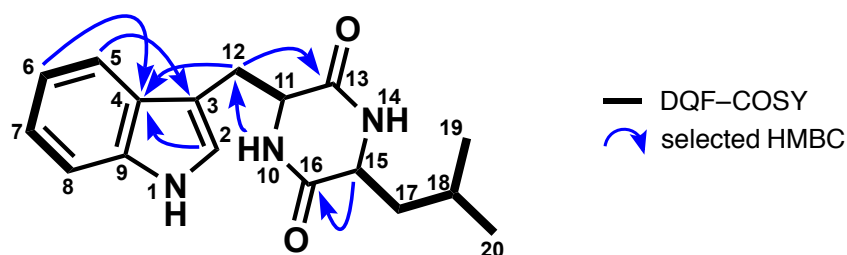


HMBC spectrum of ts-11-14-1 in CD₃OD (500 MHz).



NMR data of ts-11-14-1 in CD₃OD. The molecular formula of ts-11-14-1 was established by mass data

[ESI-MS: m/z 300 (M+H)⁺; HRESIMS: m/z 300.1707 (M+H)⁺, calcd. for C₁₇H₂₂N₃O₂⁺, 300.1707, Δ = 0 mmu]



Position	δ_H^a		mult. (J in Hz)	HMBC ^a	δ_C^b
2	7.05	1H	s	3, 4, 12	125.8
3					109.4
4					129.3
5	7.59	1H	d (7.94)	3	120.0
6	6.99	1H	dd (7.94, 7.37)	4	120.1
7	7.07	1H	dd (8.50, 7.37)		122.4
8	7.31	1H	d (8.50)	4	112.3
9					137.8
11	4.26	1H	dd (4.53, 3.97)		57.5
12	3.11	1H	dd (14.74, 4.53)	13	30.6
	3.48	1H	dd (14.74, 3.97)	2, 3, 4	
13					169.9
15	3.57	1H	dd (9.64, 4.53)	16	54.2
16					170.6
17	-0.16	1H	ddd(13.60, 9.92, 5.10)	15, 19	45.0
	0.67	1H	ddd(13.60, 9.92, 5.10)		
18	1.15	1H	m	15, 17, 19	24.5
19	0.59	3H	d (6.24)	17, 20	21.3
20	0.46	3H	d (6.24)		23.2

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

第 7 節 参考文献

1. Quadri, L. E. N.; Weinreb, P. H.; Lei, M.; Nakano, M. M.; Zuber, P.; Walsh C. T. Characterization of sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*. **1998**, 37, 1585-1595.
2. Tsunematsu, Y.; Ishikawa, N.; Wakana, D.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Moriya, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. Spiro-carbon formation by different chemistry involving pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 818-825.
3. Maiya, S.; Grundmann, A.; Li, S.-M.; Turner, G. The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem*. **2006**, 7, 1062-1069.
4. Blumhoff, M.; Steiger, M. G.; Marx, H.; Mattanovich, D.; Sauer, M. Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, 97, 259-267.
5. 第 1 章第 1 節を参照

第5章 *in vivo* 実験による dtpC の酵素機能解析

第1節 緒言

第3章および第4章の結果より、**1** の生合成遺伝子クラスターを同定することに成功し、さらに dtpA および dtpB により、*N*-メチルジケトピペラジン **10** が生合成されることを明らかにした。第3章における dtpC の破壊株において **10** が蓄積していたことから、dtpC は **10** を基質として続く反応を触媒することが考えられ、インドール環の酸化を介した閉環反応が進行することで、モノマー**12** が合成されるものと予想できた (fig. 5-1)。

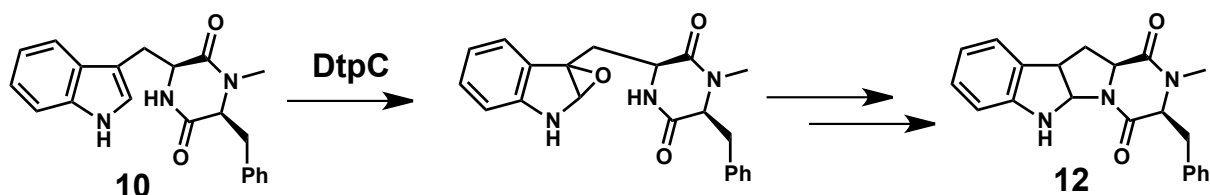


fig. 5-1 DtpC が触媒すると考えられる **10** の変換反応

P450 をコードする DtpC が **10** のインドール環の酸化によるエポキシド形成を触媒し、続くアミド窒素からの求核攻撃により閉環反応が進行し、化合物 **12** が合成されると考えた。

しかし、天然からモノマー**12** が単離された報告はなされておらず、本研究においても、これまでモノマー**12** の存在確認には至っていなかった。そこで、*N*-メチルジケトピペラジン **10** を dtpC に供することで、本反応のメカニズムについて解析を行うこととした。dtpC による **10** の変換反応を解析するには、精製酵素を用いる *in vitro* 反応や、dtpC を異種発現した宿主に対して dtpC を取り込ませる bioconversion 実験などの方法が考えられた。しかし、いずれの方法を用いる場合にも dtpC の正確な ORF をクローニングすることが必要となる。また、精製酵素を獲得するには、分子生物学的ツールが比較的充実している出芽酵母や大腸菌において dtpC を異種発現させることが望ましいが、*Aspergillus* と出芽酵母や大腸菌は種差が大きいため、活性を保った状態で dtpC が発現されるかどうか懸念された。そこでまず、dtpC の ORF を決定し、証拠能力は低いながらも比較的实验操作が簡便である bioconversion 実験により dtpC の活性を確認し、その後 *in vitro* 反応を行うことで、より詳細なメカニズムを検討することを目指した。

第2節 dtpC の ORF の決定

dtpC の ORF を決定すべく、まず NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) において予想されている dtpC の ORF 配列 (AFLA_005460 として登録されている配列) をもとに BLAST search を行い、アミノ酸配列相同性の高い他のタンパクと予想 ORF の配列を比較した (fig. 5-2)。すると、他のタンパク質に対し dtpC の ORF は N 末端側が極端に短く、アノテーションに誤りがあると予想できた。

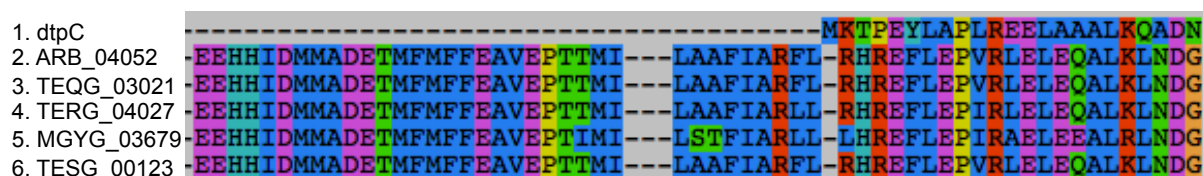


fig. 5-2 AFLA_005460 と他の P450 のアミノ酸配列の比較

最上段の AFLA_005460 の配列とその他の P450 の配列を比較すると、他の P450 はアミノ酸配列が非常に似通っているのに対し、AFLA_005460 は N 末端側の配列が途中で欠損し、配列相同性の高い部分が失われている様子が分かる。各アルファベットはアミノ酸 1 文字表記に対応している。各遺伝子配列の由来を以下に記す。1. dtpC (*A. flavus*), 2. ARB_04052 (*Arthroderma benhamiae*), 3. TEQG_03021 (*Trichophyton equinum*), 4. TERG_04027 (*Trichophyton rubrum*), 5. MGYG_03679 (*Arthroderma gypseum*), 6. TESSG_00123 (*Trichophyton tonsurans*)

そこで、実際に転写されている RNA 配列を元に、真の ORF を決定し直すこととした。*A. flavus* A1421 株より total RNA を抽出し、逆転写を行うことで、cDNA を調製した。続いて、AFLA_005460 の上流側のゲノム DNA 配列をもとに、真の開始コドンと予想される atg の直前に存在する non-coding region 部分に相同的な Fw-primer を複数本設計した (fig. 5-3)。本 primer を用いた PCR により、スプライシングを受けた cDNA の 5'末端部分を決定した。

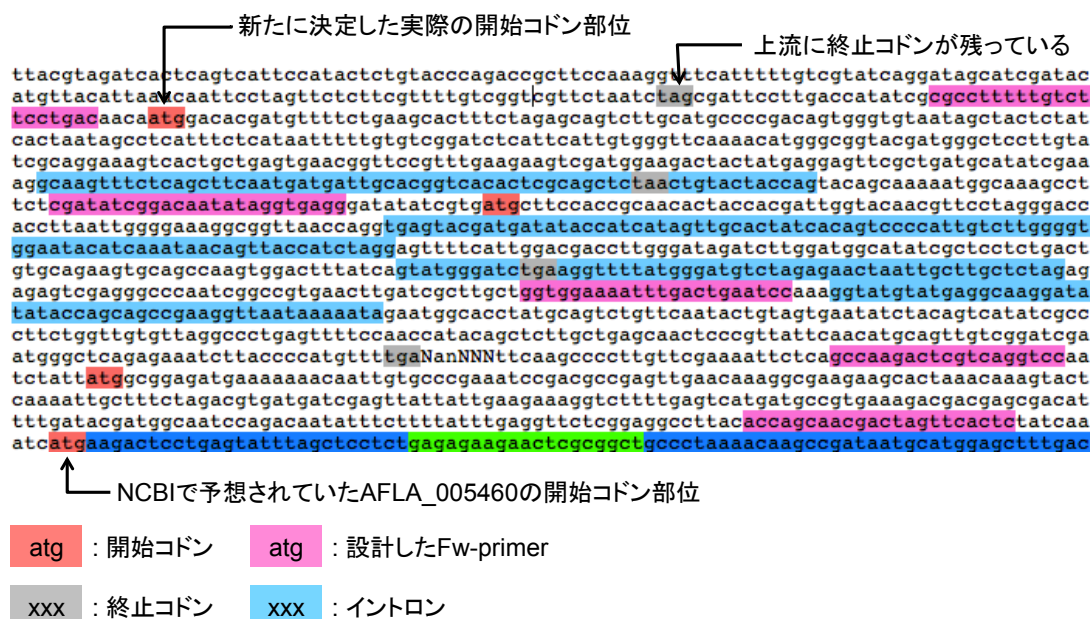


fig. 5-3 AFLA_005460 における開始コドンと新たに決定した dtpC の開始コドン

NCBI において予想されていた開始コドンの上流における複数の atg に対応するように Fw-primer を設計すると、少なくとも予想開始コドンの約 1300 bp 上流までは cDNA が続いていることが分かった。そこで、本 cDNA 配列を実際に解読したところ、ある開始コドンの部位を境に、その下流側では終止コドンがイントロンとして除去されており (fig. 5-3 中シアンで示した部分。実際に解読した cDNA 由来塩基配列では除去されている部分であり、グレーで示した終止コドンが同時に除去されていた。)、一方で上流側では終止コドンが残ったままになっている箇所を見出した。そこで、この開始コドンを実際の開始コドンとし、改めて他の P450 と配列相同性を解析してみると、AFLA_005460 では欠損していた配列相同性の高い部分が相補され、他の P450 とほぼ同等の長さとなることが分かった (fig. 5-4)。そこで、この新たに決定した開始コドン、以降の dtpC のクローニングに用いることとした。

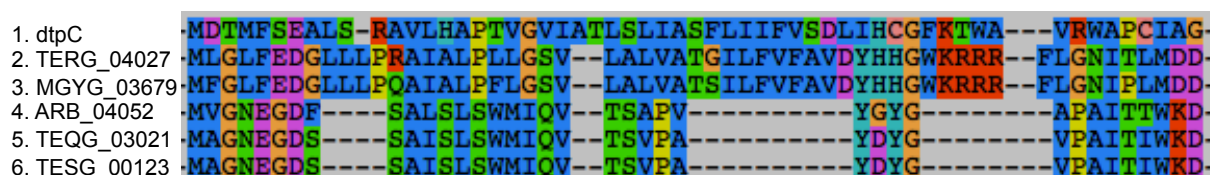


fig. 5-4 新たに決定した DtpC のアミノ酸配列と他の P450 の配列の比較

AFLA_005460 の配列では、N 末端側の配列が欠損しており、配列相同性も低かったが、新たに決定した開始コドンから始まる DtpC のアミノ酸配列では、全長が他の P450 とほぼ同等の長さとなり、配列相同性も見られることが見てとれる。1. dtpC (*A. flavus*), 2. TERG_04027 (*T. rubrum*), 3. MGYG_03679 (*A. gypseum*), 4. ARB_04052 (*A. benhamiae*), 5. TEQG_03021 (*T. equinum*), 6. TESS_00123 (*T. tonsurans*)

第3節 出芽酵母 SCKW-5 による 10 の bioconversion 実験

第1項 DtpC の物性予測および発現宿主の選択

遺伝子の異種発現を行う際には、その遺伝子により合成されるタンパク質の物性や機能により発現宿主を工夫する必要がある¹⁾。例えば、第4章で触れたように、PKS や NRPS を異種発現させる際には、酵素をホロ化させるために sfp などのホスホパンテテニルトランスフェラーゼを同時に発現させる必要があり、真核生物由来の膜結合型タンパク質を発現させる際には酵母や昆虫細胞などを用いる必要がある。前者については、ホスホパンテテニルトランスフェラーゼが発現していない環境では、PKS や NRPS はアポ型のままであり、活性を示すことができないためであり、後者については、例えば原核生物の大腸菌は脂質二重膜を有していないため、発現したタンパク質を安定に保持する環境が整わず、タンパク質の高次構造を保つことができなくなってしまうためである。そこでまず、第2節において決定した dtpC の ORF から得られる翻訳タンパク質の配列を解析し、DtpC の物性を検討することとした。膜タンパク質の二次構造を予測する WEB サイトである SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) を利用し、DtpC が膜タンパクであるか否かを確認した。その結果、dtpC は N 末端側に脂溶性の高い部分が存在する一回膜貫通型のタンパク質であると予測された (fig. 5-5)。

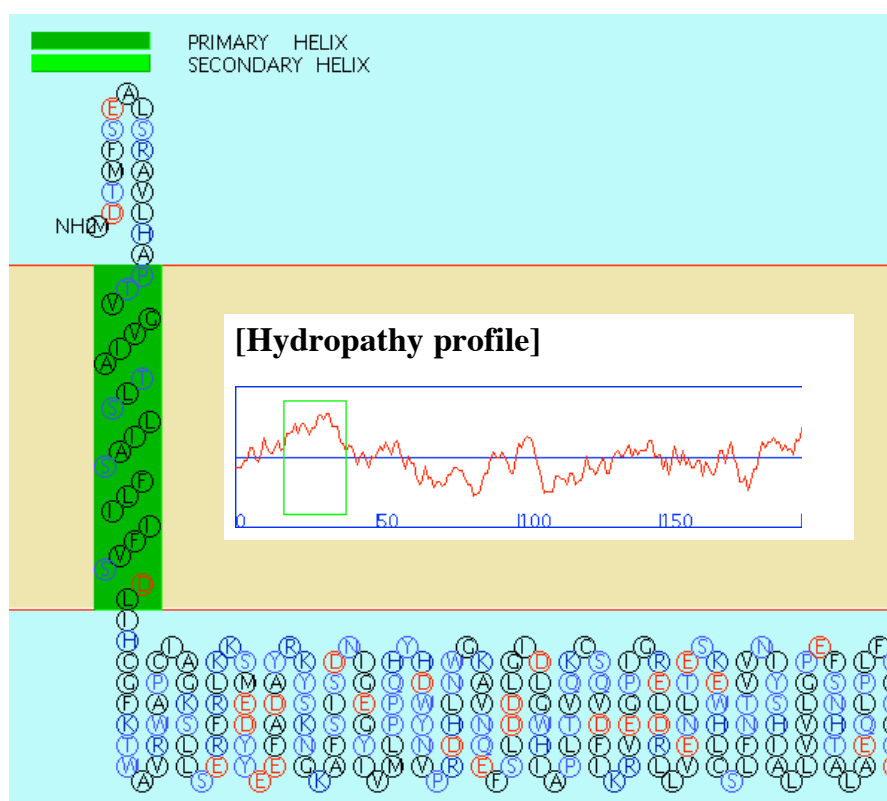


fig. 5-5 タンパク質高次構造予測サイト SOSUI にて計算した DtpC の高次構造模式図

N 末端側から約 40 アミノ酸程度の脂溶性が高く、脂質二重膜に貫通している
(上図ページの脂質膜に対し、緑のアミノ酸配列が貫通している) と予想された

この結果から、dtpC を大腸菌等の原核生物において異種発現させることは困難であると判断し、出芽酵母 *S. cerevisiae* にて異種発現を試みることにした。

第2項 異種発現ベクターの作成

DtpC はそのアミノ酸配列から cytochrome P450 であると機能が推定された。P450 は基質を酸化し自身が還元型となった後に、酸化型へと戻ることによりリサイクルされる。この反応を触媒する一連の酵素群が cytochrome P450 reductase と呼ばれており、P450 による代謝回転には必須とも言える存在である²⁾。当研究室では以前から出芽酵母を用いた P450 の異種発現に取り組んでおり、NCP1 と呼ばれる出芽酵母由来 cytochrome P450 reductase を利用し、P450 の触媒反応を円滑に進行させるシステムを有している。そこで、dtpC についても、NCP1 との共発現を試みることにした。当研究室で最も頻繁に使用される *S. cerevisiae* BY4741 株は、ロイシン、ウラシル、ヒスチジン、トリプトファンの栄養要求性を有するため、これら栄養素の合成遺伝子をマーカーとして遺伝子導入の際に使用することができる。NCP1 はヒスチジン合成遺伝子をマーカーとして有するプラスミドに既にクローニングされていた (pKW5070)。本プラスミドはヒスチジン合成遺伝子を選択マーカーとして有することに加え、ロイシン合成遺伝子を用い、プラスミドのコピー数 (1つの細胞が有するプラスミドの数) を増加させることが可能である³⁾。そこで、残るウラシルとトリプトファンのマーカーのうち、ウラシルを利用し、遺伝子を発現させることにした。マーカーとしてウラシルを有し、ロイシンによりコピー数を増加させることが可能である pKW1250 の Gal1 プロモーターの下流に dtpC をクローニングし、pKW4131 とした (fig. 5-6)。このとき、N 末端側にヒスチジントグを付加することで、dtpC タンパク質の合成をウェスタンブロッティングにより確認できるようにした。

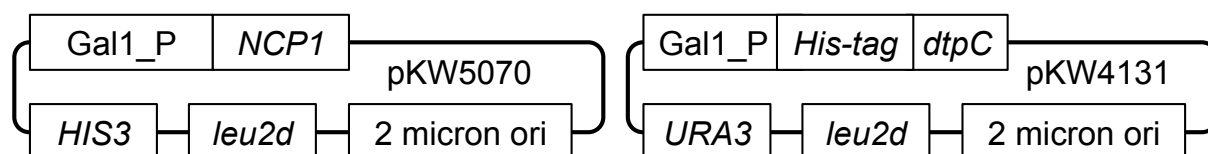


fig. 5-6 pKW5070 および pKW4131 の模式図

第3項 ウェスタンブロッティングによる dtpC の発現確認

酢酸リチウム法により pKW5070 および pKW4131 の両者を導入した出芽酵母 BY4741 (pKW5070/pKW4131/BY4741) の培養液に対し終濃度 2% となるようにガラクトースを添加し、発現誘導を行った。菌体を培養液より遠心分離した後にタンパク質を抽出し、抗 His 抗体を用い、ウェスタンブロッティングを行った。

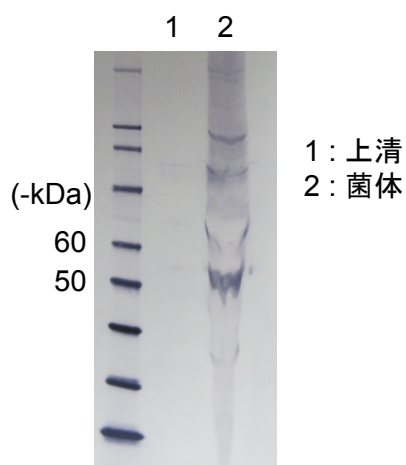


fig. 5-7 ウェスタンブロッティングによる DtpC の確認

レーン 1 に pKW5070/pKW4131/BY4741 の全細胞抽出液上清、
レーン 2 に全細胞抽出液の結果を示した。
マーカーにはウエスタンスタンダードを用いた

DtpC の予想分子量は 61 kDa であるが、予想分子量より少し小さい位置にバンドが現れた。また、全体的にバンドがスミアになっていることから、目的タンパク質が糖鎖修飾を受けており、実際の分子量が反映されていない可能性が考えられた。また、DtpC は膜貫通ドメインを有していることから、脂溶性の高い膜貫通領域が疎水性相互作用により折り畳まれ、見た目の分子量が小さくなっていることも考えられた。詳細な原因については明らかではないものの、目的タンパク質が合成されていると考えられたため、dtpC を発現している酵母培養液に対し **10** を添加することで、*in vivo* にて化合物の変換反応を行う bioconversion 実験を行うこととした。

第4項 DtpC による **10** の bioconversion 実験

前項で触れたように、ウェスタンブロッティングにより dtpC の発現を確認した出芽酵母 BY4741 の培養液に **10** を添加し、その変換の様子を解析した。

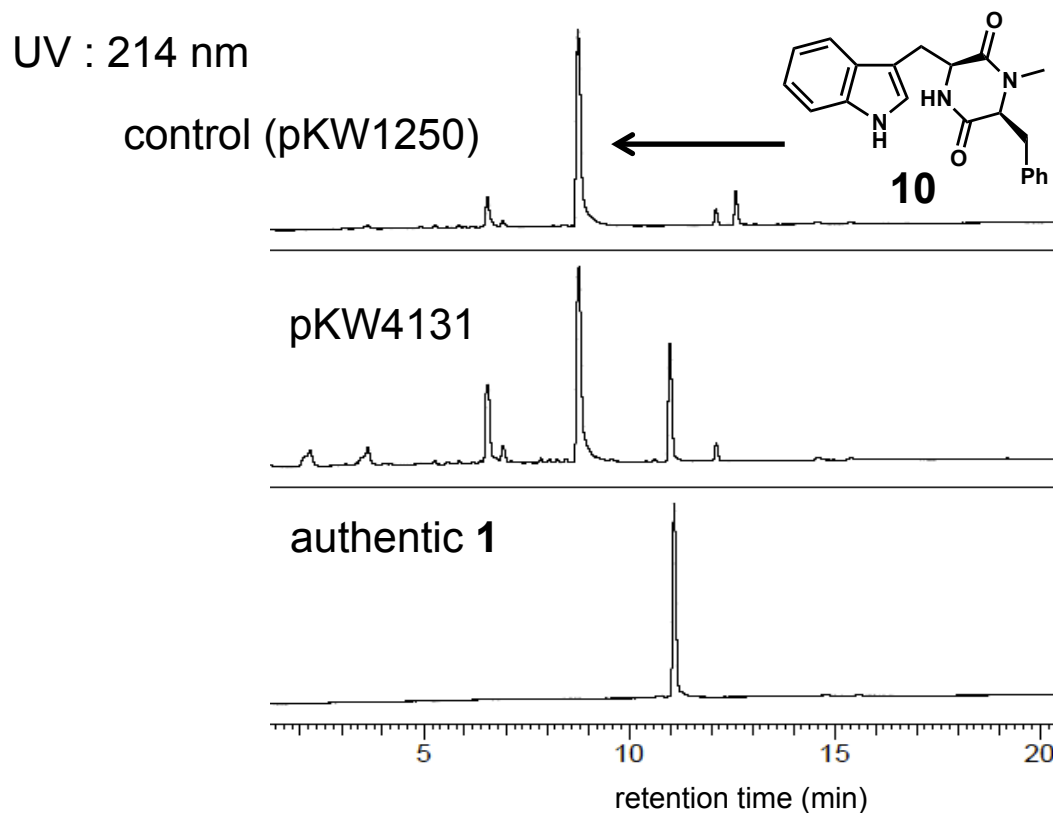


fig. 5-8 DtpC による **10** の bioconversion 実験 (UV = 214 nm におけるクロマトグラム)

上段から順に、コントロールである pKW1250/BY4741 に **10** を与えたもの、DtpC を発現した pKW4131/BY4741 に **10** を与えたもの、DTP の標準品の UV = 214 nm におけるクロマトグラムを記した

dtpC の発現ベクター (pKW4131) に対し、dtpC が入っていない空ベクターである pKW1250 をコントロールとして導入した。両者を比較すると、dtpC を発現させた時のみ RT にして約 11 min 付近に新たなピークの存在を確認することができた (fig. 5-8)。本化合物は、先に単離・精製した **1** と同一の保持時間、質量電荷比を与えたことから、最終的な目的化合物である DTP であると同定した。この結果から、dtpC は **10** を基質に **1** へと変換する反応を触媒することが示唆された。

第4節 考察

本章では、*dtcC* について、その ORF の決定および酵素機能の解析を行った。P450 としてアノテーションされていた *dtcC* のアミノ酸配列を解析したところ、予想 ORF の転写産物は、アミノ酸配列相同性の高い他の P450 と比較して、N 末端側が極端に短いことが分かった。そこで、真の N 末端を RT-PCR により決定してみると、実際の開始コドンは予想されていた推定開始コドンより 1300 bp 程上流であることが分かった。このゲノム配列に由来するアミノ酸は約 344 アミノ酸に相当し、*dtcC* 全 ORF より転写される 525 アミノ酸の 65% を占めることが分かった。つまり、NCBI のアノテーション通りの ORF を発現させてしまうと、完全な配列の 35% 程度しかアミノ酸が合成されず、DtpC が本来の活性を示すことは極めて難しいと考えられる。このように、近年バイオインフォマティクスの技術が進んできたものの、改良すべき点は多く残されており、その情報を利用する際には改めて自身で解析し直すことが重要であることが分かった。改めて得られた真の ORF につき転写産物を解析すると、*dtcC* の N 末端側のアミノ酸は、膜貫通領域であることが予想された。そこで、膜タンパク質の発現に適しているとされる出芽酵母を宿主として利用し、異種発現を試みた。その結果、目的の *dtcC* は発現したものの、可溶性画分にはほとんど存在しておらず、大半が不溶性であった。これは、*dtcC* の膜貫通ドメインが出芽酵母の脂質二重膜に結合するアンカーの役割をしており、DtpC が破碎された菌体の脂質二重膜と複合体を形成し、不溶性画分へ移行したものと考えられる。これらの点から、本酵素を精製酵素として獲得し *in vitro* 反応を行うには種々の条件検討が必要であると考えられたため、まず *in vivo* にて変換反応を確認した。

当初の反応の予想としては、P450 である DtpC によりトリプトファンのインドール環に含まれるピロール環が酸化されてエポキシドが形成される、もしくはさらにアミド窒素からの求核反応が進行し、水酸基が生成しながら新たな環構造が形成されるのではないかと考えた (fig.5-9)。

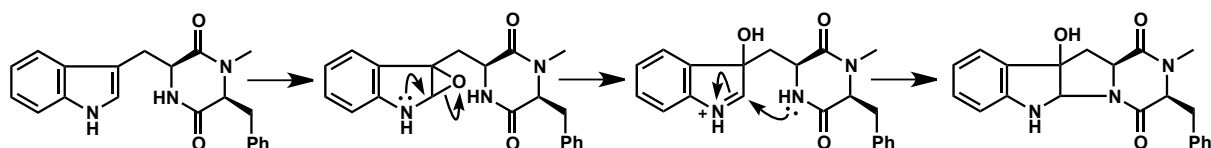


fig.5-9 予想された DtpC の反応機構

しかし実際には閉環反応のみが進行した単量体の存在は確認できず、閉環反応と二量体化が同時に進行した最終産物である **1** が新たに合成されたのみであった。上記エポキシドを介した閉環反応は、同様のジケトピペラジン構造を有する gliotoxin⁴⁾ の生合成について予想されている反応機構であるが、*dtcC* の反応ではエポキシド体も水酸基を有する閉環後の化合物も確認することができなかったことから、全く新しい閉環および二量体化反応が進行したものと考えられる。そこで、より詳細な解析を行うため、次章において DtpC による *in vitro* 反応を試みることにした。

第5節 実験項

(1) 使用菌株

S. cerevisiae SCKW-5

dtcC 異種発現宿主として使用した

(2) ORF の比較

まず、DtcC と相同性の高いアミノ酸配列を検索するため、NCBI の BLAST search (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用した。既存の配列について 5'末端の妥当性を精査するため、AFLA_005460 (accession number : XM_002382705) の配列を query とし BLAST search を行った。続いて、得られた複数の配列を COBALT (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>) により処理し、Multiple Alignment のデータを得た。得られたデータを解析ソフト Seaview にて開くことで、AFLA_005460 と、その他の配列の比較を行った (fig. 5-2)。また、同様の方法により、新たに得られた開始コドンを起点とする dtcC の ORF についても、解析を行った (fig. 5-4)。

(3) 異種発現プラスミドの構築

[dtcC 発現用カセットの作成]

dtcC 発現カセットは、第2節にて新たに決定した ORF をガラクトース誘導型プロモーターの下流に配置することで作成した。インサートとなる dtcC の ORF を pKW4128_F / pKW4128_R のプライマーおよび pKW4131_F / pKW4128_R を用いて PCR により増幅した。得られた PCR 断片を、Sall にて消化した pKW1250 とともに *S. cerevisiae* BY4741 株へと導入し、相同組換えを行った。相同組換えにより構築されたプラスミドを *E. coli* XL-1 Blue に導入し、コロニーPCR および制限酵素消化により、正しく構築されたプラスミドを選択し、塩基配列解析に供した。

Primer name	Sequence
pKW4128_F	5'- GTCAAGGAGAAAAAACTATAATGGACACGATGTTTTCTGAAG -3'
pKW4128_R	5'- TTATTTAGAAAGTGGCGCGCCTTAGATACTTGCGCTCTTCACATAC -3'
pKW4131_F	5'- TATAATGCACCATCACCATCACCATGACACGATGTTTTCTGAAGCAC -3'

(4) 遺伝子発現誘導、およびタンパク質抽出方法

目的遺伝子を導入した BY4741 株を 20 mL の YPD 培地にて 30 °C で 12 時間培養した。最終濃度 2% となるようにガラクトースを添加し遺伝子発現誘導を行った。30 °C で 12 時間培養後、培養液 1 mL を遠心分離し、菌体を回収した。0.1 M NaOH を 100 μ L 添加し室温で 5 分間静置した。全体の溶液を全細胞抽出液、さらに遠心分離した上清を全細胞抽出液上清として、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングのサンプルとして用いた。

(5) ウェスタンブロッティングで用いた試薬

invitrogen 社製 NuPAGE Tris- Acetate transfer buffer

NuPAGE MOPS SDS buffer

NuPAGE Bis-Tris 4-12% gel

WesternBreeze ブロッティング溶液／抗体希釈液 (抗マウス抗体)

SIGMA 社製 抗マウス抗ポリヒスチジン抗体

(6) 出芽酵母 SCKW-5 による **10** の bioconversion 実験

[SCKW-5 形質転換方法]

SCKW-5 を YPD 培地にて 30 °C で 6 時間培養し、培養液 1 mL を集菌した。1 mL の 0.1 M LiOAc にて洗浄後、50%PEG #4000 240 μ L、1 M LiOAc 36 μ L、2 mg/mL sssDNA 25 μ L、pKW4131 2 μ L、pKW5070 2 μ L を順次加えた。室温下 30 分間静置後、42 °C 15 分間静置した。遠心分離後、上清を除去した。滅菌蒸留水 50 μ L を加え SC/Ura, His 寒天平板培地に植え、30 °C で 48 時間培養した。

[dtpC 発現誘導および bioconversion]

形成されたコロニーを 3 mL の SC/Ura, His 培地にて回収し、30 °C で 12 時間培養した。培養液を 20 mL の SC/Ura, His 液体培地に移し 30 °C で 24 時間培養した。20 mL の SC/Leu, Ura, His 培地にて 48 時間培養しプラスミドコピー数を増加させた。その後、1 L の YPD 液体培地に継代した。30 °C で 12 時間培養した後に最終濃度 2%となるようにガラクトースを添加した。さらに 30 °C で 12 時間培養した後、最終濃度 1 mM となるように **10** を添加した。

第6節 参考文献

1. 改訂タンパク質実験ノート 上 抽出と分離精製 (羊土社)
2. P450 の分子生物学 (講談社)
3. Tsunematsu, Y.; Ishikawa, N.; Wakana, D.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Moriya, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. Spiro-carbon formation by different chemistry involving pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, 9, 818-825.
4. Gardiner, D. M.; Waring, P.; Howlett, B. J. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class offungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* **2005**, 151, 1021-1032.

第6章 *in vitro* 実験による DtpC の酵素機能解析

第1節 緒言

前章において、dtpC を異種発現させた出芽酵母に **10** を取り込ませ **1** へと変換させることに成功した。この実験により、dtpC が **10** を **1** へと変換させている1つの根拠を得たが、*in vivo* 反応では、コントロールとの比較は行っているものの、dtpC 以外の要因を排除することが困難であった。さらに恐らくは基質である **10** の菌体内への取り込み効率が悪いために、開始基質となる **10** が系中に残存してしまっていた。これらの問題を解決するために *in vitro* 反応を行う必要があった。すなわち、*in vitro* 反応であれば、反応基質および dtpC 以外の要因を系中から排除することが可能であり、さらに酵素に対して基質を直接与えることが可能となるため、反応効率が改善されると期待した。より高い反応性が確認できれば、**10** のアナログを DtpC に供することで、より詳細な反応メカニズムを解析することができると考えられる。以上の点から、DtpC の *in vitro* 反応を試みることにした。しかし、これまでの章で述べてきたように、DtpC は膜貫通ドメインを有する酵素であるため、一般的な精製酵素の獲得法である大腸菌での異種発現および酵素精製は適さないと考えられた。さらに、出芽酵母での異種発現においても、通常の操作では膜結合タンパク質である DtpC を可溶性画分に回収することが困難であることも前章のウェスタンブロットティングの結果から予想できた。そこで本章では、出芽酵母に異種発現させた dtpC を、ミクロソーム画分として回収し、*in vitro* 反応を試みることにした。ミクロソーム画分は細胞小器官としては小胞体に相当する画分であり、超遠心により得られたミクロソーム画分を可溶化させることで DtpC を高濃度で獲得し、*in vitro* 反応に用いることを考えた。

出芽酵母を用いた P450 を始めとする膜結合型タンパク質の異種発現およびミクロソーム画分の回収は比較的古くから行われており、本研究でも常法¹⁾に従うことにした。すなわち、菌体を破碎後、通常の遠心操作により未破碎の細胞、核、細胞骨格、細胞膜等を取り除いた後、上清を超遠心にかけることでミクロソーム画分を沈殿物として回収した。得られたミクロソーム画分をグリセロール含有バッファーにて可溶化させ、*in vitro* 反応に用いることにした。可溶化の際、界面活性化剤を適量添加することで可溶化効率が上昇することが知られているため、本研究でも、界面活性化剤 Nonidet-P40 および Tween 20 を用い、各界面活性化剤が DtpC の活性に与える影響についても検討することとした。

第2節 ミクロソーム画分による DtpC の *in vitro* 酵素反応実験

第1項 DtpC による **10** の変換反応

前節の方法に従い調製したミクロソーム画分を用い、DtpC の *in vitro* 酵素反応を行った。**10** を終濃度 $50\ \mu\text{M}$ となるように dtpC に与えると、*in vivo* 反応では残存していた開始基質となる **10** が消失し、新たに **1** が合成されたことが UV のトレースにて確認できた (fig. 6-1)。さらに界面活性化剤を加える必要は無く、むしろ界面活性化剤により酵素の反応効率が低下している様子が確認できた。

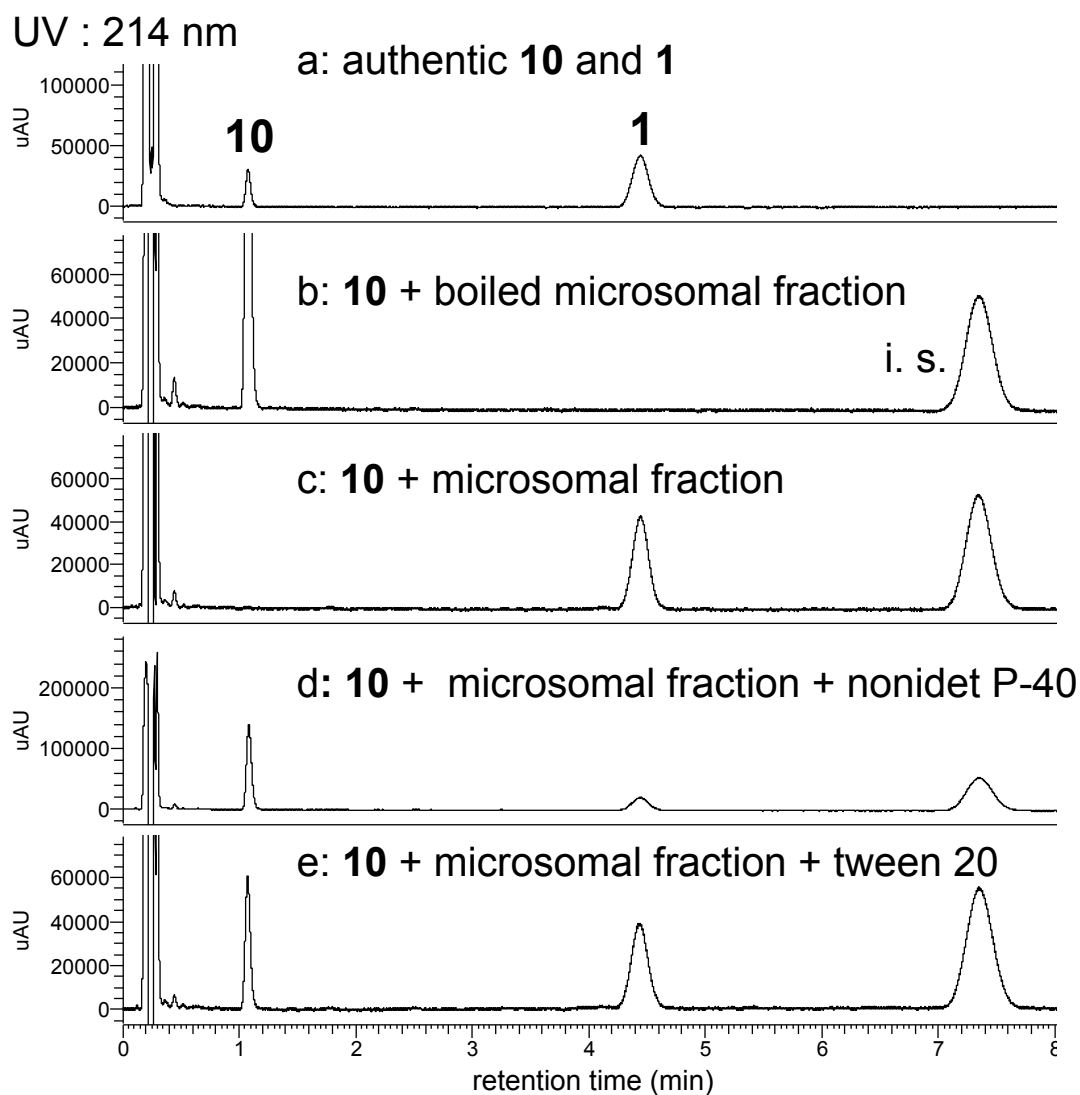


fig. 6-1 DtpC を含むミクロソーム画分による化合物 **10** の変換反応

上から順に、a: **1** および **10** の標準品, b: ボイルし失活させたミクロソーム画分に **10** を加えたもの, c: ミクロソーム画分に **10** を加えたもの, d: 界面活性化剤 nonidet P-40 を加えたミクロソーム画分に **10** を加えたもの, e: 界面活性化剤 tween 20 を加えたミクロソーム画分に **10** を加えたもの、それぞれの UV = 214 nm におけるクロマトグラムを記した

第2項 10 アナログ (brevianamide F) を用いた DtpC の *in vitro* 酵素反応

in vitro 酵素反応により **10** を **1** へと導くことに成功したため、続いて **10** のアナログを dtpC に供し、その生成物を解析することにした。これにより、DtpC の酵素機能やその反応メカニズムを知ることができると考えたためである。**10** はトリプトファンとフェニルアラニンのジケトピペラジンからなる基本骨格を有し、その一方のアミド窒素がメチル化された構造を有している。トリプトファンのユニットは他の二量体化ジケトピペラジン化合物²⁾に共通しているため、閉環反応時に必須であると考えた。そこで、他の部位において構造の異なるアナログを用意することとした。まず考えられたものは、フェニルアラニン以外のアミノ酸とトリプトファンのジケトピペラジン構造である。なかでも、より反応性が高いと予想できる骨格として、トリプトファンとプロリンの組み合わせを考えた。DtpC の本来の基質である **10** は、ジケトピペラジン構造を有すると同時に、一方のアミド窒素がメチル化されている。そのため、一方のアミノ酸にプロリンを選択することで、メチル化されたアミド窒素と近い構造として酵素に認識されることを期待した。トリプトファンとプロリンのジケトピペラジンは天然化合物として単離報告がなされており、brevianamide F (**11**) として知られている。そこで、**11** を化合物 **10** と同様に dtpC に供することとした。

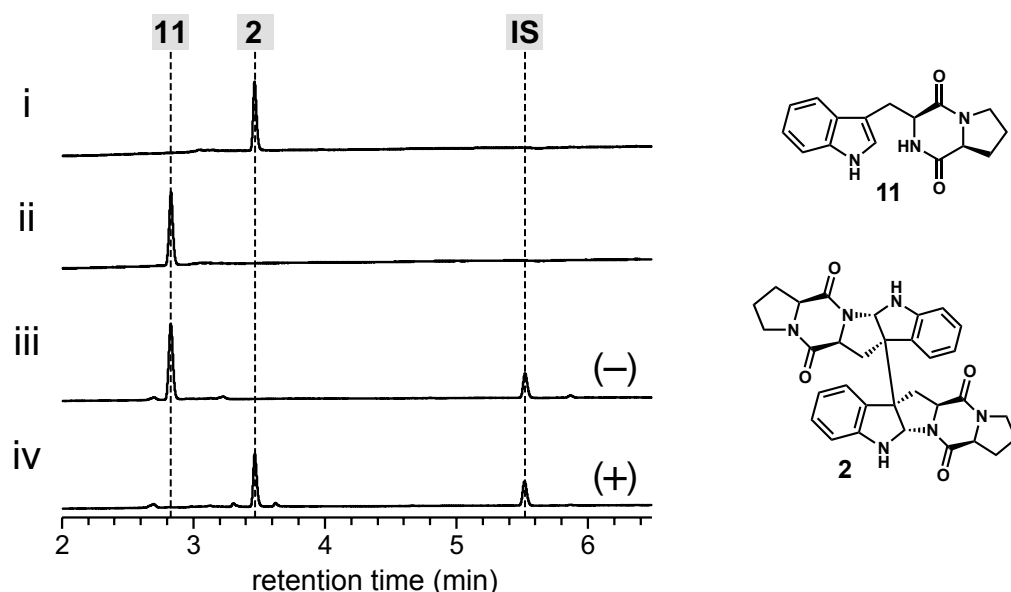


fig. 6-2 DtpC を含むミクロソーム画分による **11** の変換反応

i: (-)-dibrevianamide F (**2**) 標準品, ii: **11** 標準品, iii: DtpC 含有ミクロソーム画分に **11** を加えたもの, iv: 失活させた DtpC 含有ミクロソーム画分に **11** を加えたもの

その結果、**11**はDtpCにより新たなピークである化合物**2**へと完全に変換されたことが分かった (fig. 6-2)。本化合物の高分解能質量電荷比は m/z 565.2558 ($M+H$)⁺を示し、基質である **11** の質量電荷比 m/z 284.1394 ($M+H$)⁺のおよそ2倍であった。この結果から、新たに合成された**2**は、恐らく **11** が基質として DtpC に認識され、**10** と同様の変換反応を受け、閉環・二量体化した化合物であると期待できた。そこで、本化合物について単離精製し構造決定を行うと、予想した通り **11** が **1** と同様の閉環二量体化した新規な構造を有する化合物であることが分かり、2分子の **11** からなる化合物であるので、(-)-dibrevianamide F (**2**) と命名した。本化合物は結晶性が高く、クロロホルム-メタノール系において単結晶を得ることに成功したため、共同研究者である千葉大学大学院工学研究科の三野孝准教授に X 線結晶構造解析を依頼した。その結果、**2** が有する立体中心は全て *S* であり、**1** と同様の閉環・二量体化様式、さらに同様の立体を有する化合物であると決定した。

ここで次に興味を持たれたのは、**10** や **11** をそれぞれ単独で供した際には完全なホモダイマーが生成物として与えられるが、系中に基質となる化合物が複数種類あった場合、ヘテロダイマーが合成されるのかという点である。すなわち、DtpC に対し、**10** および **11** を同時に与えると、それぞれが1分子ずつ閉環・二量体化した化合物が合成されるのではないかと期待した。そこで、実際にこれら2つの単量体を同時に DtpC に供した。

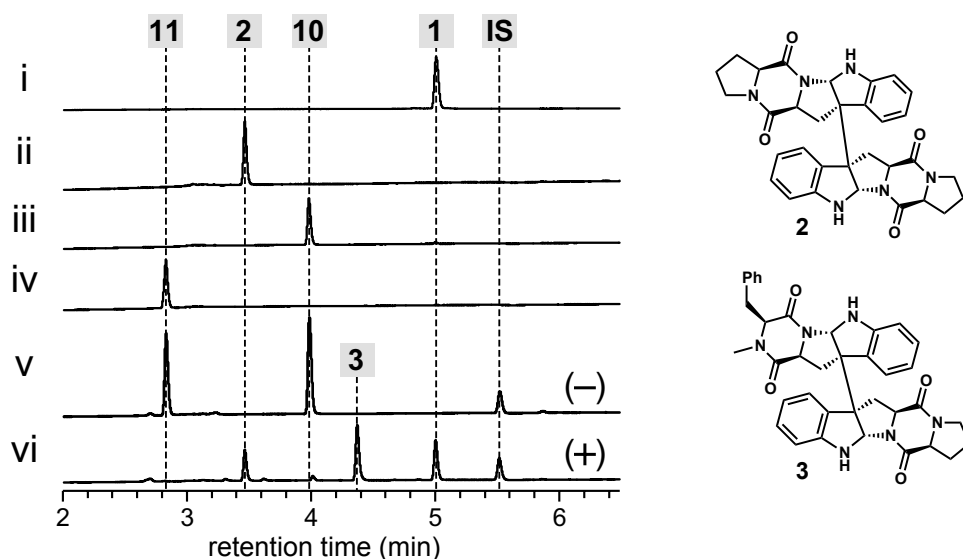


fig. 6-3 DtpC を含むマイクロソーム画分による化合物 **10** および **11** の変換反応

i: **1** 標準品, ii: **2** 標準品, iii: **10** 標準品, iv: **11** 標準品, v: ボイルし失活させた DtpC 含有マイクロソーム画分に **10** および **11** を加えたもの, vi: DtpC 含有マイクロソーム画分に **10** および **11** を加えたもの

すると、各々の二量体である化合物 **1** および **2** に加え、新たに **3** が合成されていることが明らかとなった (fig. 6-3)。本化合物についても、同様に単離精製し、各種 NMR 解析および X 線結晶構造解析に供することで、予想していた通り、化合物 **10** と **11** が閉環・ヘテロ二量化した新規構造を有す

る化合物であると決定し、(-)-triprophenaline (**3**) と命名した。以上の結果より、DtpC はある程度の基質許容性を有しており、トリプトファンのユニットを有していれば、他のジケトピペラジン系化合物についても **1** と同様の閉環および二量体化反応を触媒することができることが示唆された。

続いて確認したいと考えた点は、*N*-メチル化の必要性についてである。**10** および **11** は、一方のアミド窒素がメチル基やメチレン基により修飾されており、求核反応が起こりにくくなっている。一方で天然には、アミド窒素が修飾されないまま閉環・二量体化した化合物も知られており、DtpC の基質許容性において、*N*-メチル化が必要か否かについて興味を持たれた。そこで、**10** の直前の基質であり、*N*-メチル基が導入されていない **9** についても、DtpC に供することとした。他の基質と同様の反応条件にて **9** を与えたところ、若干の基質の残存は認められるものの、ほぼ完全に新たな化合物 **14** へと変換された様子が確認できた (fig. 6-4)。本化合物については、SCKW-5 において dtpA および dtpC を異種発現させることで大量に化合物を獲得し、各種 NMR スペクトルを解析することで、その構造が **1** の desmethyl 体であると同定し、desmethyl ditryptophenaline (**14**) と命名した。

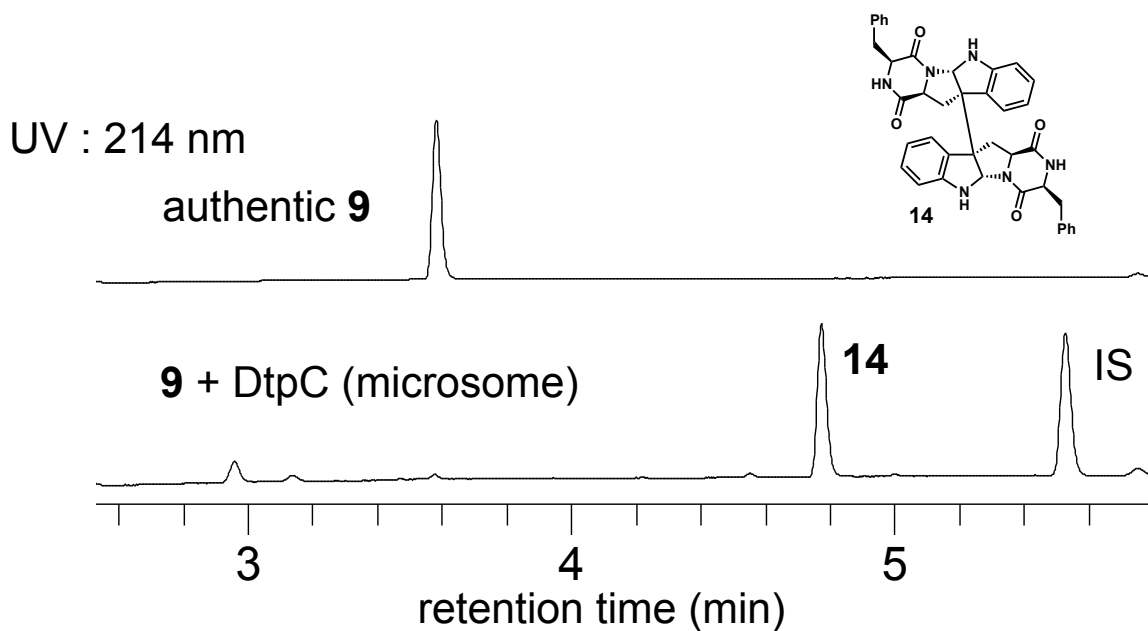


fig. 6-4 DtpC を含むミクロソーム画分による化合物 **9** の変換反応

i: **9** 標準品, ii: DtpC 含有ミクロソーム画分に **9** を加えたもの

第3節 考察

本章では、ミクロソーム画分を用いた *in vitro* 酵素反応を行うことで、DtpC のより詳細な反応メカニズムの解析を行うことを目的とした。*in vitro* 酵素反応の結果としてまず着目すべき点は、DtpC の有する寛容な基質特異性である。DtpC は、一方のアミノ酸としてトリプトファンを有していれば、もう一方のユニットはフェニルアラニンでなくともよいことが **11** を用いた *in vitro* 反応により示された。さらに、反応の選択性に重要であると考えられた *N*-メチル化についても、**9** を基質として **14** を与えたことから、基質特異性および反応機構において *N*-メチル基が必要不可欠ではないことが示された。

続いて着目した点は、反応機構についてである。DtpC による bioconversion 実験においても、閉環反応のみが進行した単量体やその他の中間体の合成が確認できなかったことから、閉環反応と二量体化反応は協奏的に進行していると期待された。そこで、結果をより明確なものとするため、本章ではミクロソーム画分を用いた *in vitro* 酵素反応を行ったが、結果は同様であり、やはり中間体は確認できなかった。以上の点から、DtpC による反応機構を次の様に考えた (fig. 6-5)。まず、DtpC がアミド窒素上の水素を引き抜くことで、窒素ラジカルを発生させる。続いてインドール環の π 結合がホモリシス開裂することで、アミド窒素との閉環反応が進行すると同時に、ベンジルラジカルが発生する。最終的にこの2分子のベンジルラジカルが互いにラジカルを供与しあう形で二量体化が進行すると考えた。

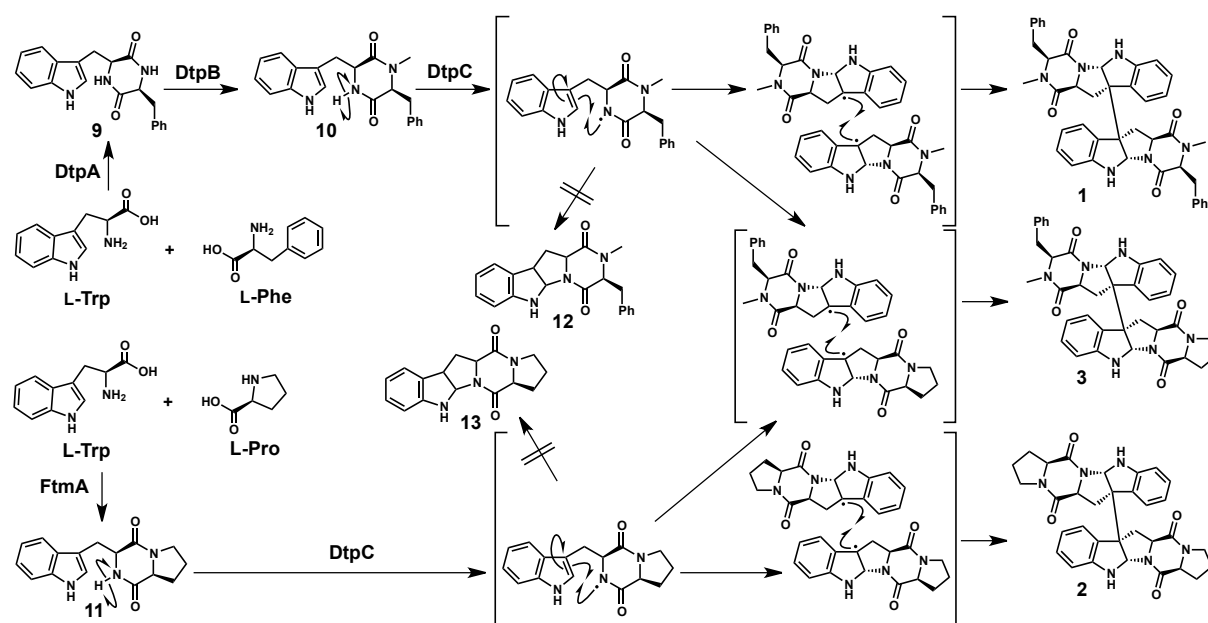


fig. 6-5 DtpA, DtpB, DtpC が触媒する DTP 予想合成機構

in vivo および *in vitro* における実験結果において、閉環反応のみが進行したモノマー (**12**, **13**) が得られなかったこと、および部位特異的な閉環反応が進行したヘテロダイマー **3** が合成されたことから、その反応様式がラジカルを介した協奏的な反応であり、ラジカル中間体が DtpC のアクティブサイト内に保持されていると予想した

本反応機構であれば、閉環反応のみが進行した単量体や、酸化反応が進行したエポキシド体などの中間体の存在が確認できない点や、**3** が合成される理由が説明できる。すなわち、**9** に由来する中間体および **11** に由来する中間体が DtpC のアクティブサイトにプールされており、水分子を始めとする他の分子から隔離され安定に保持されていること、さらにそれらが同時に反応することで **3** に変換されることを推定した。ここで、DtpC による反応機構の着目すべき点の1つとして、厳密な立体制御が挙げられる。2013年に熊本大学の石川先生らのグループは、トリプトファンのエチルエステル体を酸性条件下、酸化剤で処理することで異なる立体化学や結合部位を有する一連の ditryptophenaline 類縁化合物を one pot で合成することに成功した³⁾。このように、有機化学的合成においてもジケトピペラジンの二量体化合物はラジカル反応を介して合成した例が知られているが、その際には立体および結合様式の制御が問題となる。これに対し DtpC による触媒反応では単一の立体および結合様式を有する化合物 **1**, **2**, **3** が与えられることから、DtpC がラジカルの発生のみならず、アクティブサイトの構造を利用し、その後の立体制御も行っていると考えることができた。すなわち、酵素内においてモノマーの配置される位置が厳密に制御されており、発生したラジカルが3位の炭素上に来た時のみ、互いにラジカルを供与し合えるようなコンフォメーションを取っていると予想した。しかし、ベンジルラジカルは複数の共鳴構造を描くことができるため、異なる部位で閉環した化合物が偶発的に合成されたとしても不思議ではない。実際、より詳細に酵素反応生成物を解析してみると、DtpC 本来の基質では無い **11** を DtpC に供した際には、極微量ながらも **3** と同一の質量電荷比を与え、比較的 RT の近い化合物 ts-11-34-1 および ts-11-7-3 が合成されていることが分かった (fig. 6-6, 図中矢印)。これら化合物の構造が DtpC の反応機構を解明する糸口になると期待し、単離精製及び構造解析について次章にて触れることとする。

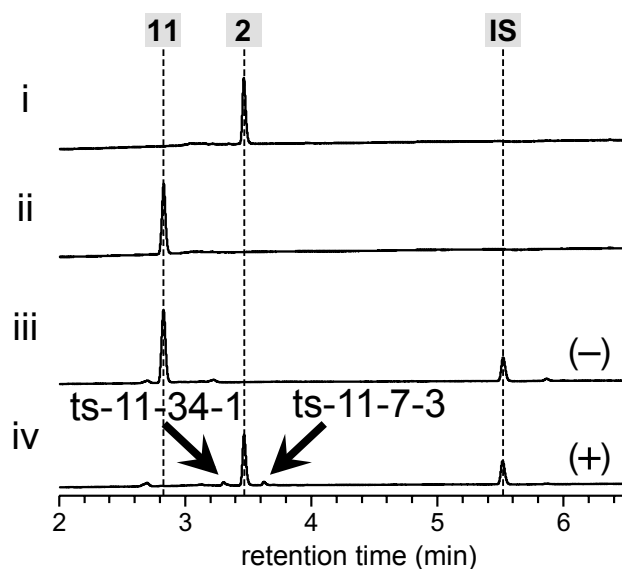


fig. 6-6 DtpC により合成された **2** アナログと考えられる化合物

i: **2** 標準品, ii: **11** 標準品, iii: ボイルし失活させた DtpC 含有ミクロソーム画分に **11** を加えたもの, iv: DtpC 含有ミクロソーム画分に **11** を加えたもの (**3** と同じ質量電荷比を与えるピークを矢印で示した) (UV = 214 nm)

第4節 実験項

(1) 使用菌株

S. cerevisiae SCKW-5

dtpC 異種発現宿主として使用した

(2) ミクロソーム画分の調製

[プラスミドの導入]

第4章第5節(6)と同様の方法により行った

[dtpC 発現誘導]

第4章第5節(6)と同様の方法により行った

[ミクロソーム画分の獲得]

1. dtpC 発現誘導後の培養液を、7000 rpm, 5 min 遠心し、菌体を回収した
2. 菌体を TEK buffer に懸濁し洗浄、7000 rpm, 5 min 遠心し、上清を除去した
3. 約 30 mL の TES B buffer に懸濁し、全量を約 40 mL 程度にした
4. 大岳製作所社製電動式フレンチプレス (5502-M) を約 1500 kg/cm² に設定し、3.の懸濁液を 3 回通過させ、菌体を破碎した。
5. 得られた菌体破碎液を、10000 x g, 20 min 遠心
6. 上清を回収し、さらに 100000 x g, 60 min 遠心
7. 得られた沈殿を TEG buffer に懸濁し、懸濁液をミクロソーム画分として使用した

(3) *in vitro* 酵素反応条件

各種 *in vitro* 酵素反応は以下の条件に従い行った

- | | | |
|--------------------------------|-----------------|---------------|
| ・酵素反応基質 | 50 μ M | |
| ・NADPH | 2 mM | |
| ・ミクロソーム画分 | 25 μ L | |
| ・100 mM Tris-HCl buffer pH 7.4 | up to 250 μ | 30 °C, 2 h 反応 |

3.3 μ g/mL の内部標準物質 (*N*-Boc-L-tryptophan methyl ester) を含む 250 μ L の酢酸エチルを加え反応を停止。有機層を回収し、減圧流去後、LC-MS により解析した。

(4) LC-MS 解析条件

LC : FINNIGAN SURVEYOR (Thermo Scientific 社製)

MS : LCQ FLEET (Thermo scientific 社製)

Column : GRACE VYDAC 社製 C18 ϕ 2.1 mm x 100 mm

Flow rate : 125 μ L/min

Solvent A : 95/5 = H₂O/CH₃CN with 0.05% Formic acid

Solvent B : 5/95 = H₂O/ CH₃CN with 0.05% Formic acid

Gradient :

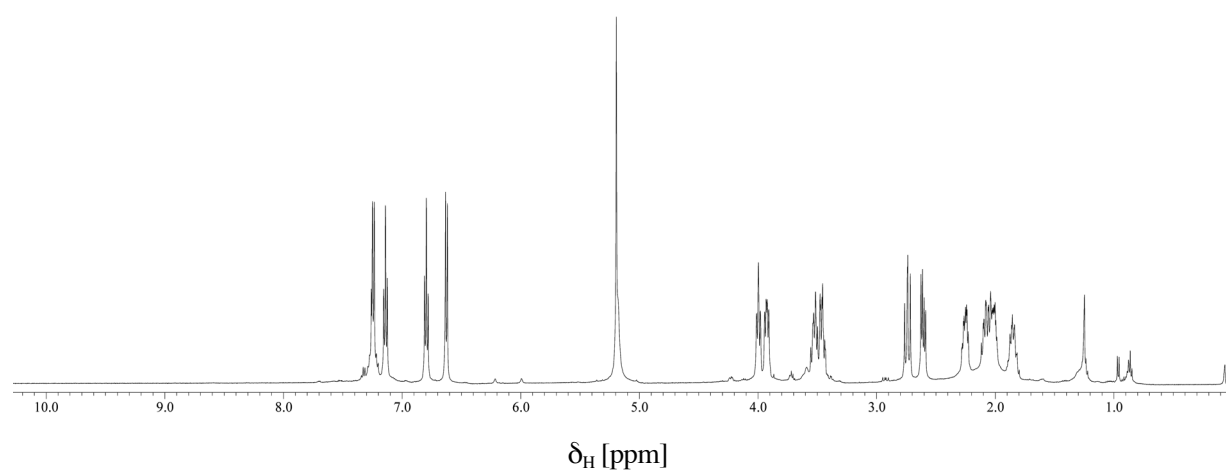
time (min)	0	10	13	13-15
%A	100	0	0	100
%B	0	100	100	0

(5) 酵素反応生成物精製条件

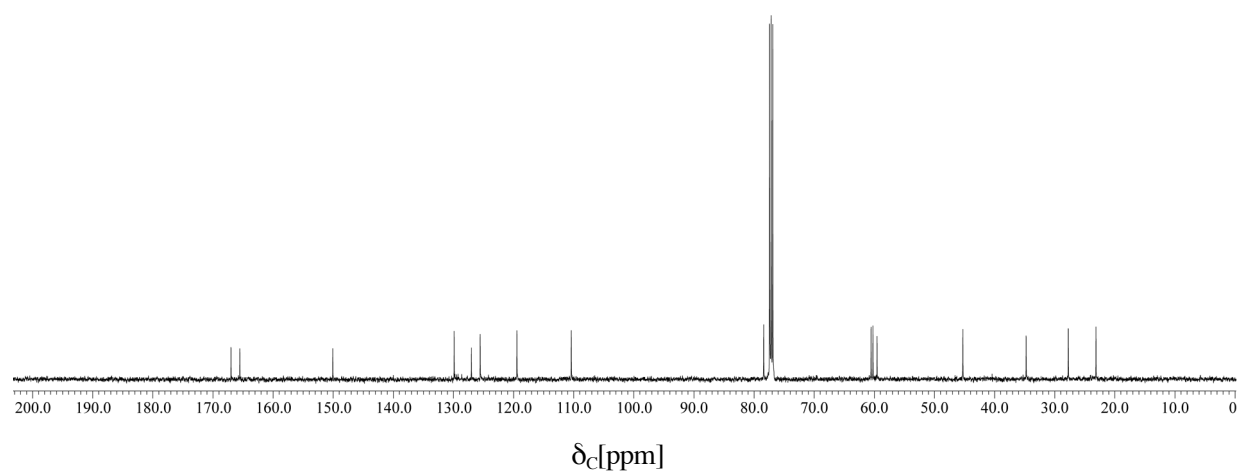
構造決定時は、第6章第4節(3) *in vitro* 酵素反応条件の反応系を 100 mL にスケールアップし、反応を行った。酵素酵素反応物を 100 mL の酢酸エチルで2回抽出し、硫酸ナトリウムにて乾燥させた有機層を減圧濃縮した。シリカゲルカラムにて粗精製後、ナカライテスク社製 Cosmosil 5C18-MS-II (20x 250 mm,流速 8 mL/min) により、DTP (MeCN/H₂O = 42/58)、DBF (MeCN/H₂O = 22/78)、(-)-tryprophenaline (MeCN/H₂O = 28/72) をそれぞれ単離した。

第5節 NMR・X線結晶構造解析データ

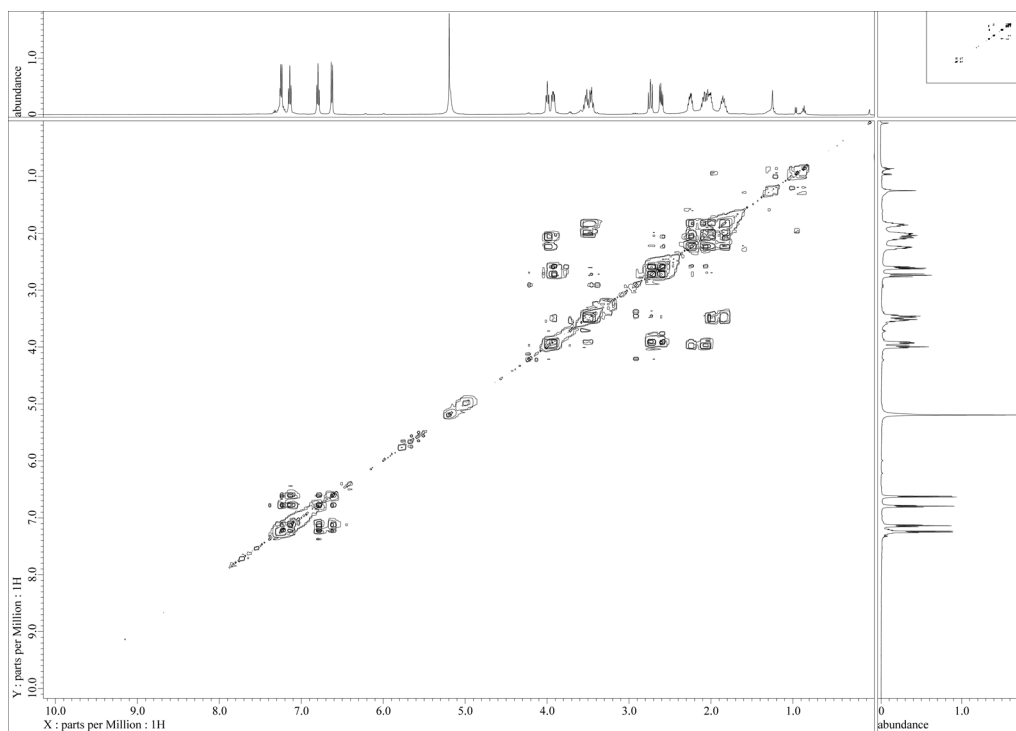
^1H NMR spectrum of **2** in CDCl_3 (500 MHz).



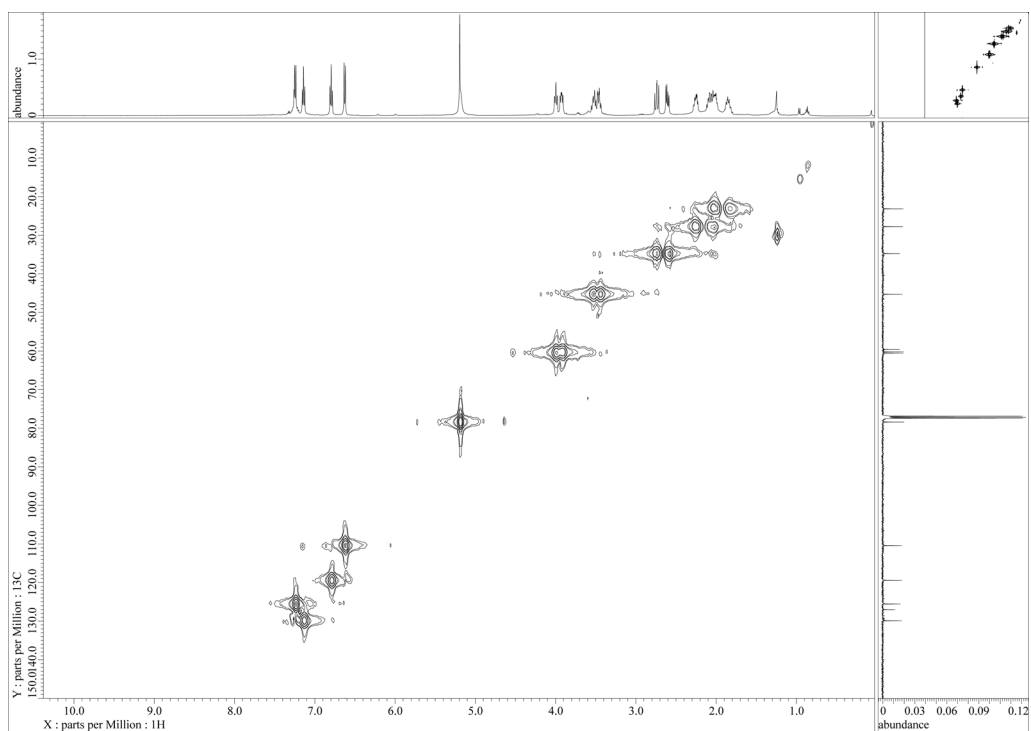
^{13}C NMR spectrum of **2** in CDCl_3 (125 MHz).



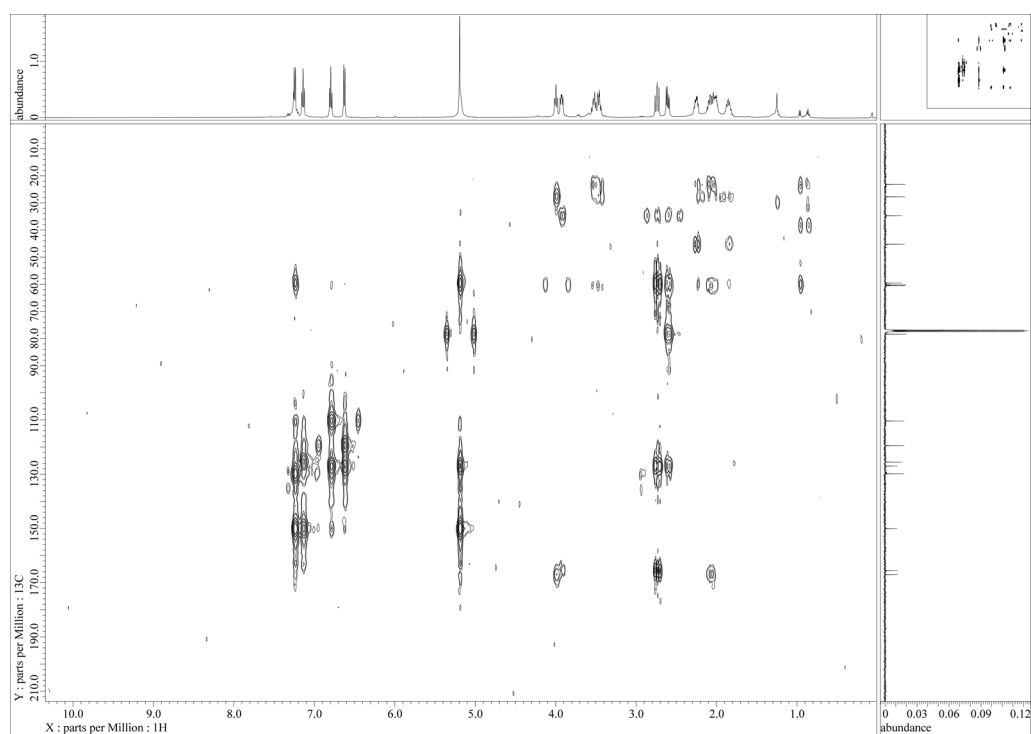
DQF-COSY spectrum of **2** in CDCl₃ (500 MHz).



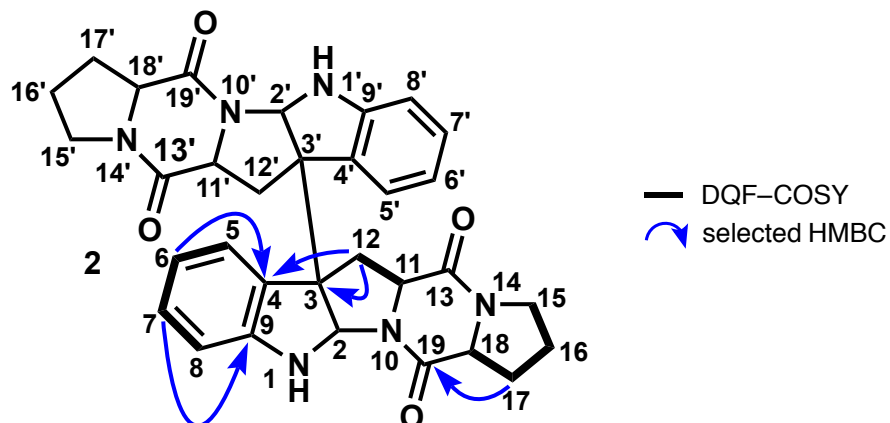
HMQC spectrum of **2** in CDCl₃ (500 MHz).



HMBC spectrum of **2** in CDCl_3 (500 MHz).



Colorless plates obtained from CH₂Cl₂/CH₃OH, mp 296–297 °C; NMR data of **2** in CDCl₃. The molecular formula of **2** was established by mass data [ESI-MS: *m/z* 565 (M+H)⁺; HRESIMS: *m/z* 565.2558 (M+H)⁺, calcd. for C₃₂H₃₃N₆O₄⁺, 565.2558, Δ = 0 mmu]; [α]_D²⁹: –483.91 (c 0.32, CHCl₃).

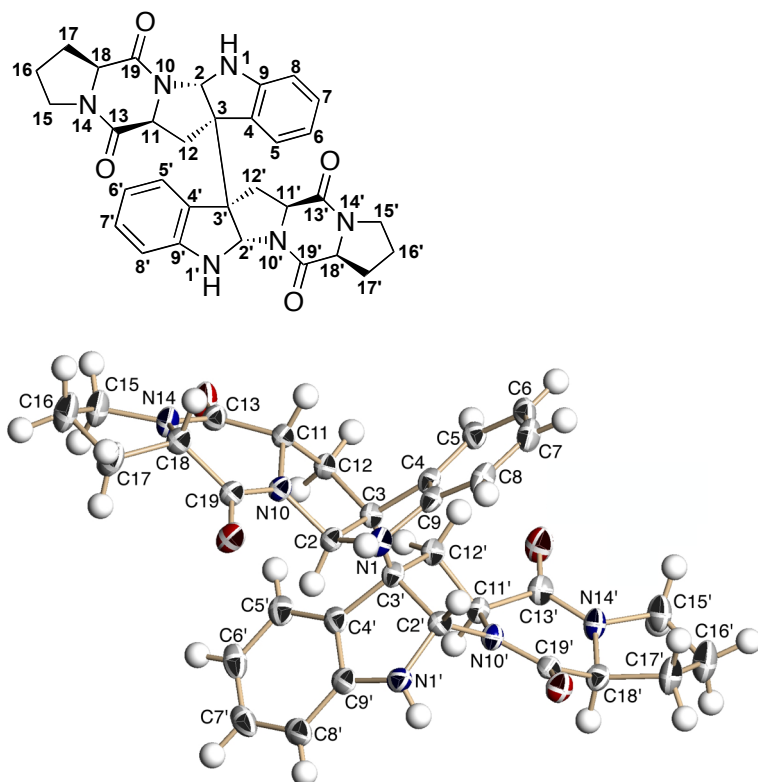


Position	δ _H ^{a)}		mult. (<i>J</i> in Hz)	HMBC ^{a)}	δ _C ^{b)}
1 (NH)	5.18	1H	brs		
2	5.19	1H	s	13, 14, 19	78.4
3					59.6
4					127.0
5	6.63	1H	d (7.9)	4, 6	110.4
6	6.80	1H	dd (7.9, 7.7)	4, 5, 9	119.5
7	7.14	1H	d (7.4)	6, 8, 9	129.9
8	7.24	1H	d (7.4)	5, 7, 9	125.6
9					150.1
11	3.93	1H	d (6.2)	12, 13	60.2
12	2.61	1H	dd (13.0, 6.2)	2, 3, 4	34.8
	2.74	1H	dd (13.0, 11.3)	3, 4, 13	
13					165.5
15	3.47	1H	m	16	45.3
	3.53	1H	m	16	
16	1.85	1H	m	15	23.1
	2.01	1H	m		
17	2.07	1H	m	16, 18, 19	27.7
	2.25	1H	m	15	
18	4.00	1H	dd (6.2, 6.2)	17, 19	60.5
19					167.0

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

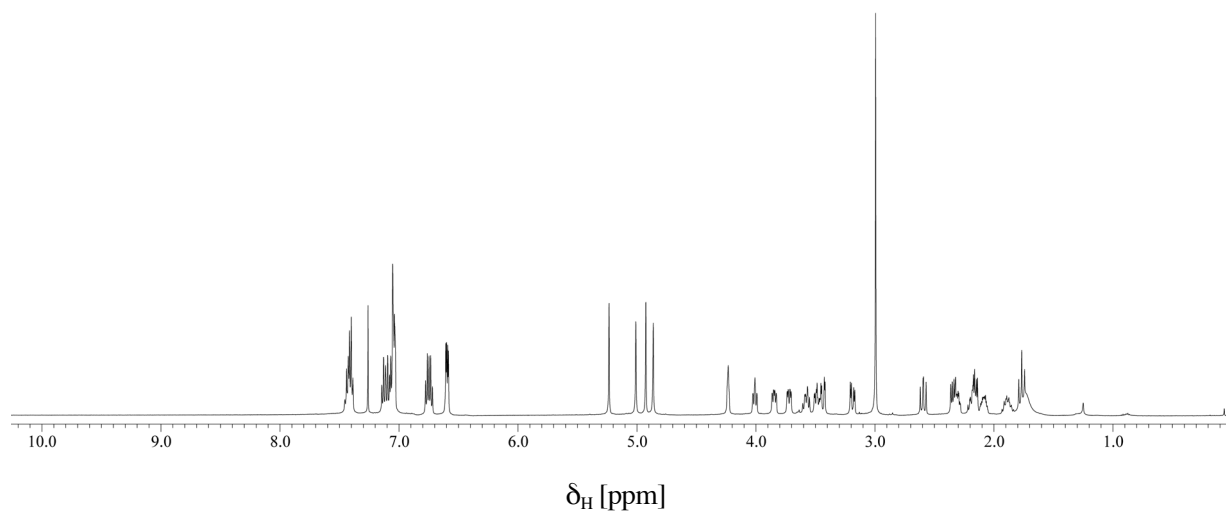
X-ray single crystal analysis of **2**

Crystal data of **2**: Monoclinic space group $P2_1$, $a = 11.8690(2)$ Å, $b = 9.1034(2)$ Å, $c = 14.1718(3)$ Å, $\beta = 91.4550(10)^\circ$, $V = 1530.74(5)$ Å³, $Z = 2$, $r = 1.364$ mg m⁻³, in the final least-squares refinement cycles on F^2 , the model converged at $R_1 = 0.0320$, $wR_2 = 0.0785$, and GOF = 1.021 for 21740 reflections. The absolute configuration was determined as 2*S*, 3*S*, 11*S*, 14*S*, 2'*S*, 3'*S*, 11'*S*, 14'*S* with the Flack x parameter value of -0.0741 with the estimated standard deviation of 0.1607. Crystallographic data for **2** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center (deposition number CCDC 957251).

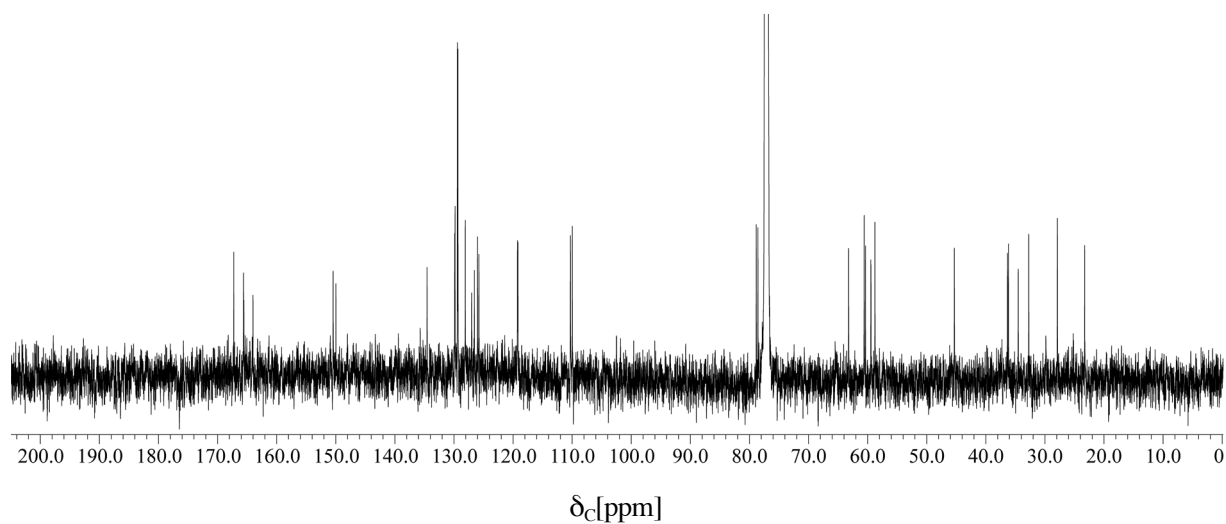


ORTEP representation of the crystal structure of **2**.

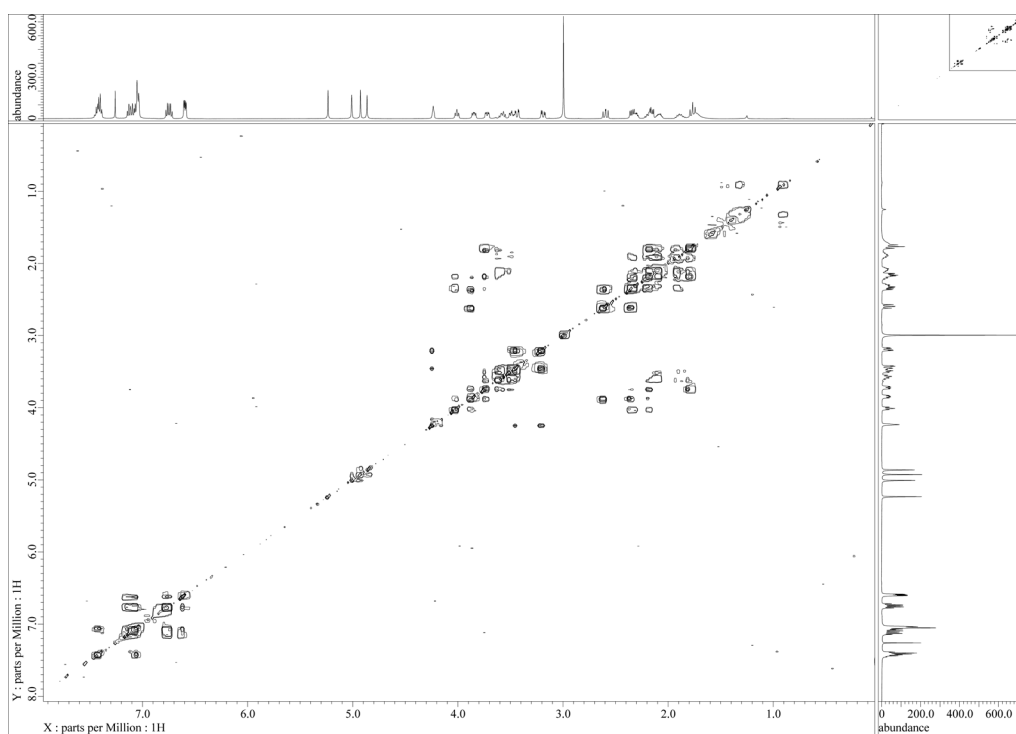
^1H NMR spectrum of **3** in CDCl_3 (500 MHz).



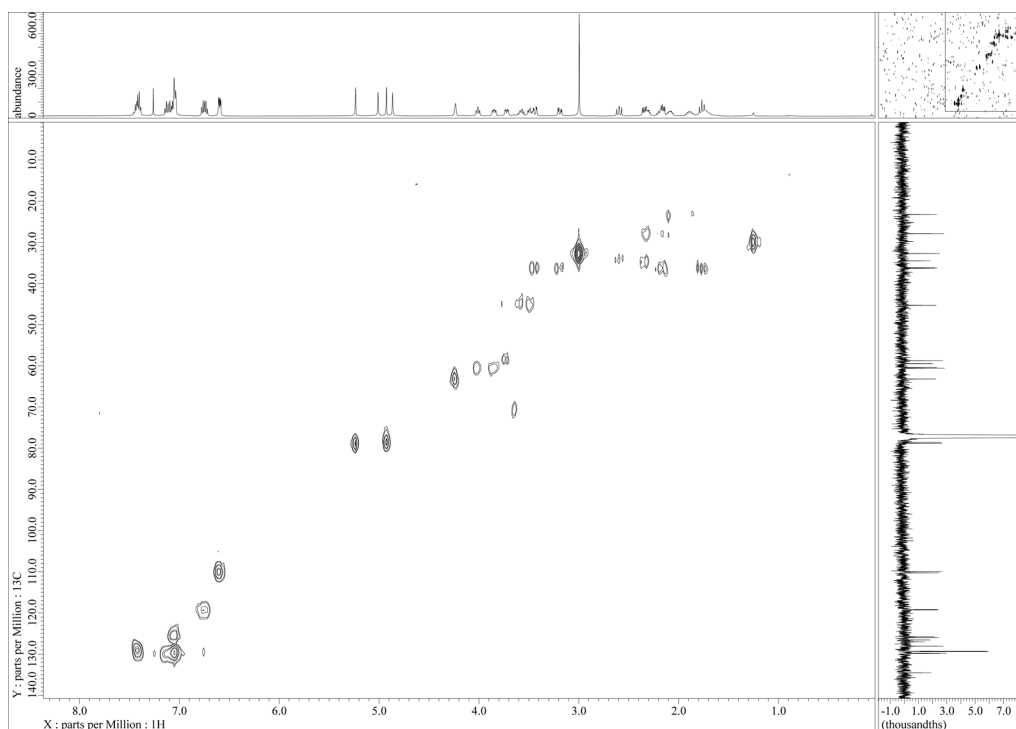
^{13}C NMR spectrum of **3** in CDCl_3 (125 MHz).



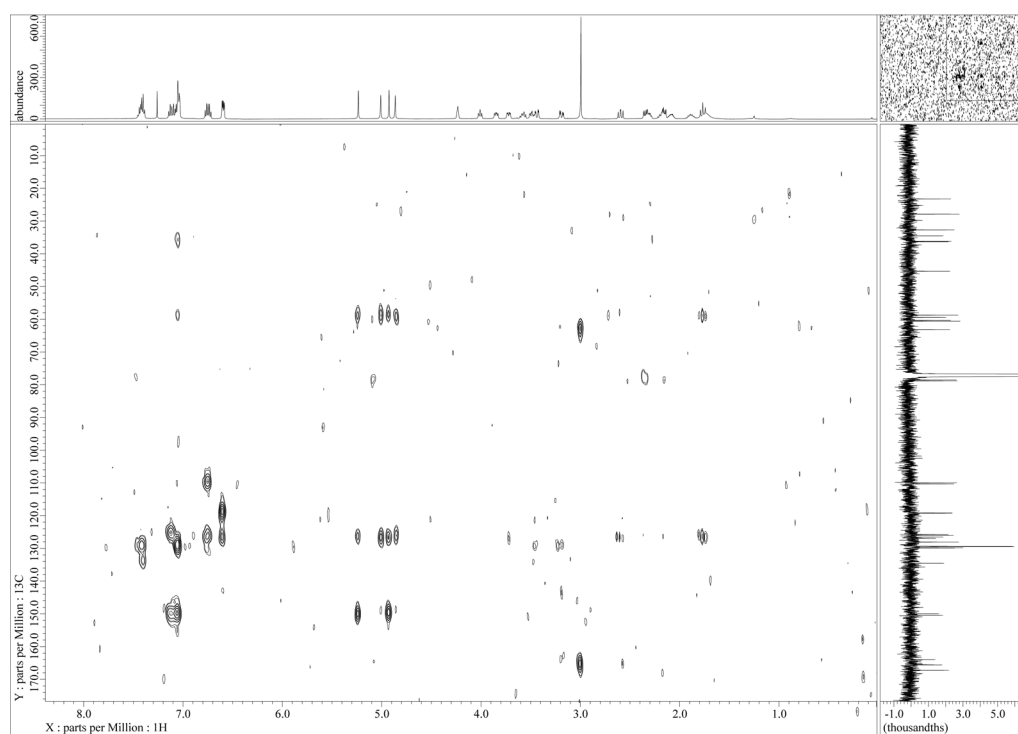
DQF-COSY spectrum of **3** in CDCl₃ (500 MHz).



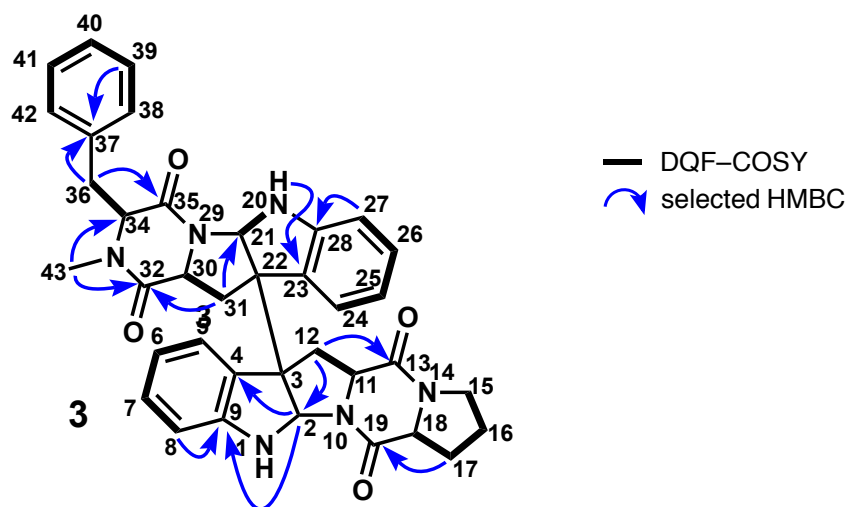
HMQC spectrum of **3** in CDCl₃ (500 MHz).



HMBC spectrum of **3** in CDCl_3 (500 MHz).



Colorless prismatic crystals obtained from $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, mp 252–253 °C; NMR data of **3** in CDCl_3 . The molecular formula of **3** was established by mass data [ESI-MS: m/z 629 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$; HRESIMS: m/z 629.2871 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_6\text{O}_4^+$, 629.2871, $\Delta = 0$ mmu]; $[\alpha]_{\text{D}}^{27}$: -378.95 (c 0.43, CHCl_3).



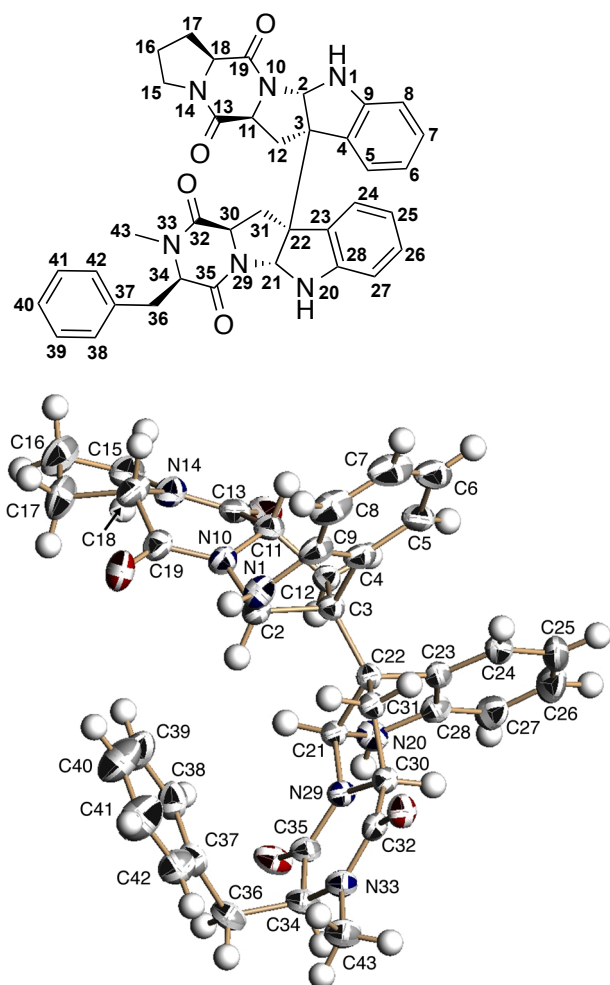
Position	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$		mult. (J in Hz)	HMBC ^{a)}	$\delta_{\text{C}}^{\text{b)}$
1 (NH)	4.85	1H	s	3, 4	
2	5.24	1H	s	3, 4,	78.7
3					59.4
4					126.5
5	7.06-7.13	1H	m		125.8
6	6.74	1H	dd (7.5, 7.5)	4	119.3
7	7.06-7.13	1H	m		129.9
8	6.60	1H	dd (7.5, 3.5)	4, 6	129.8
9					150.4
11	3.85	1H	dd (10.6, 5.7)	12	60.6
12	2.35	1H	dd (12.3, 6.3)	2, 4	34.5
	2.60	1H	dd (12.3, 10.9)	4, 13	
13					165.5
15	3.46-3.52	1H	m		45.3
	3.55-3.62	1H	m		
16	1.83-1.94	1H	m		23.3
	2.05-2.14	1H	m		
17	2.14-2.20	1H	m	19	27.9
	2.28-2.36	1H	m		
18	4.02	1H	dd (8.6, 8.6)		60.4
19					167.2
20 (NH)	5.00	1H	s	22, 23	
21	4.93	1H	s	23, 28, 30	78.6
22					59.5
23					127.0
24	7.06-7.13	1H	m		126.0
25	6.76	1H	dd (7.5, 7.5)	23, 27	119.3
26	7.06-7.13	1H	m		129.8
27	6.60	1H	dd (7.5, 3.5)	23, 25	109.9

28					150.0
30	3.73	1H	dd (12.0, 5.2)		58.8
31	1.78	1H	dd (12.0, 12.0)	23, 32	36.3
	2.18-2.23	1H	m	21	
32					165.6
34	4.22-4.26	1H	m		63.2
35					164.0
36	3.20	1H	dd (14.3, 4.6)	35, 38, 42	36.2
	3.44	1H	dd (14.3, 3.4)	38, 42	
37					134.6
38	7.05	1H	d (7.5)	36	129.4
39	7.38-7.46	1H	m		129.3
40	7.38-7.46	1H	m		128.1
41	7.38-7.46	1H	m		129.3
42	7.05	1H	d (7.5)	36	129.4
43	3.00	3H	s	32, 34	32.7

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

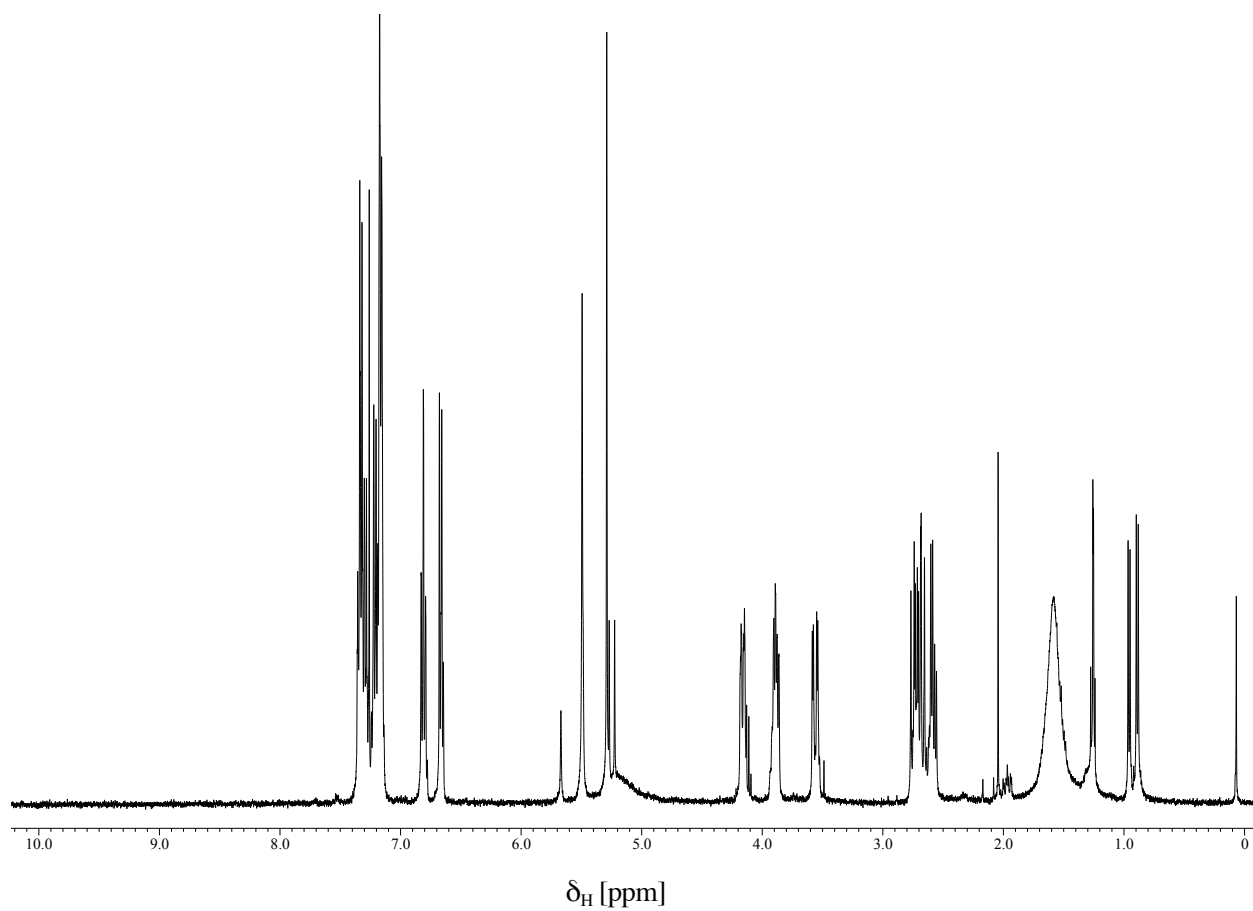
X-ray single crystal analysis of **3**

Crystal data of **3**: Triclinic space group $P1$, $a = 12.30640(10)$ Å, $b = 12.52690(10)$ Å, $c = 12.67480(10)$ Å, $\alpha = 104.5640(10)$ Å, $\beta = 90.45$ Å, $\gamma = 117.67$ Å, $V = 1657.08(2)$ Å³, $Z = 2$, $r = 1.324$ mg m⁻³, in the final least-squares refinement cycles on F^2 , the model converged at $R_1 = 0.0367$, $wR_2 = 0.1015$, and GOF = 1.034 for 38466 reflections. The absolute configuration was determined as $2S, 3S, 11S, 18S, 21S, 22S, 30S$ and $34S$ with the Flack x parameter value of -0.0547 with the estimated standard deviation of 0.1248. Crystallographic data for **3** have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Center (deposition number CCDC 956598).

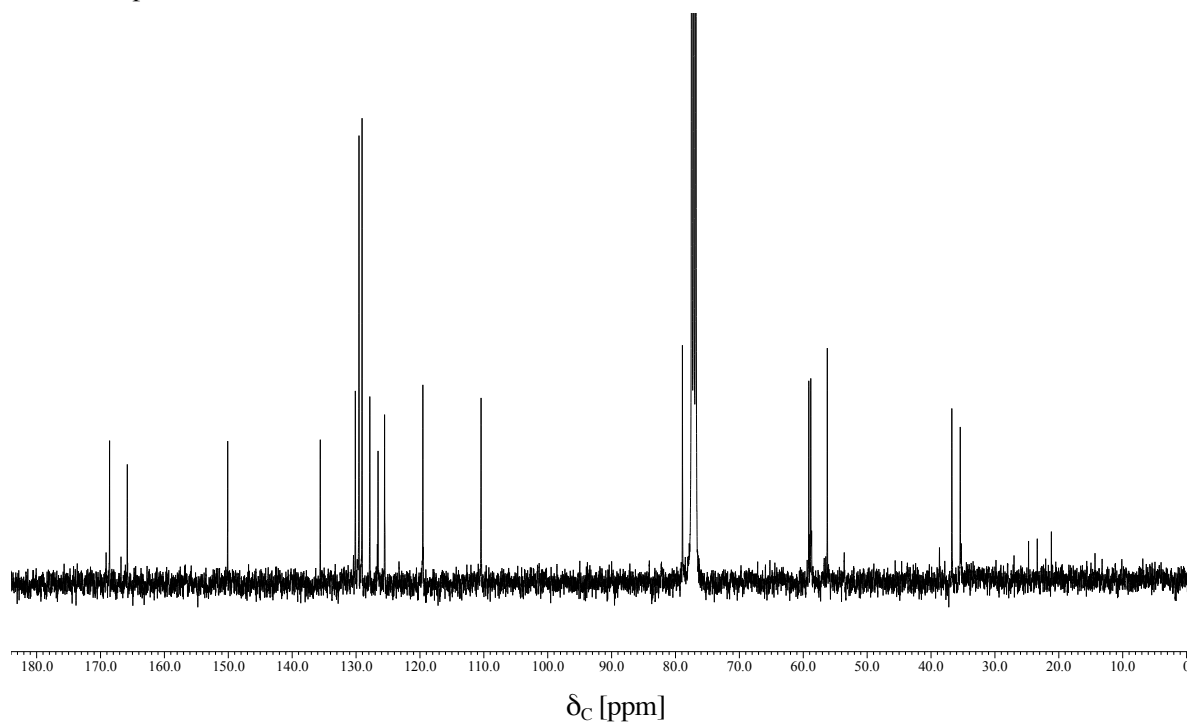


ORTEP representation of the crystal structure of **3**.

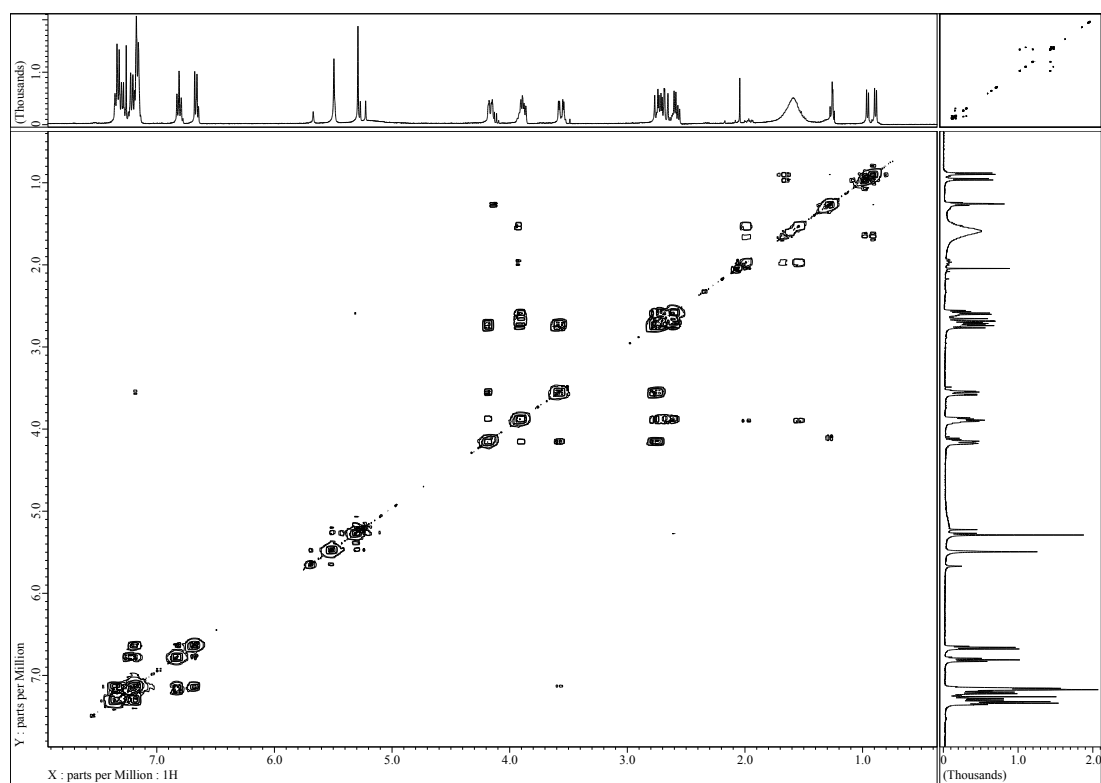
^1H NMR spectrum of **14** in CDCl_3 (400 MHz).



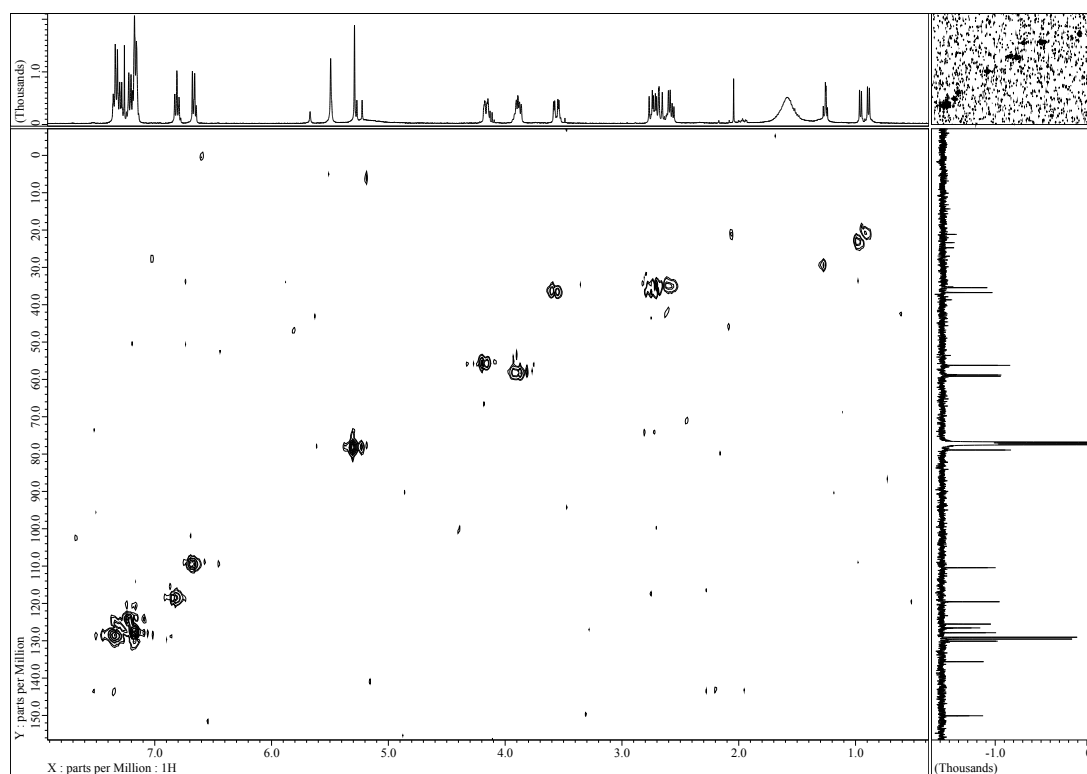
^{13}C NMR spectrum of **14** in CDCl_3 (100 MHz).



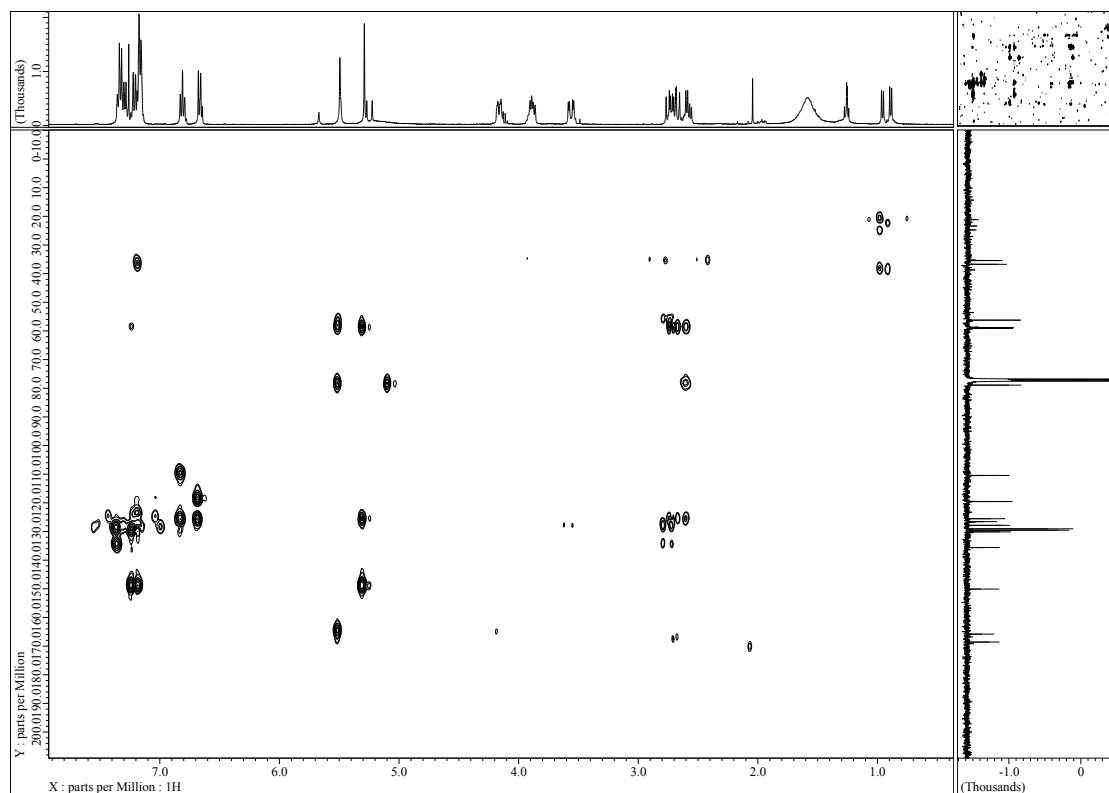
COSY spectrum of **14** in CDCl₃ (400 MHz).



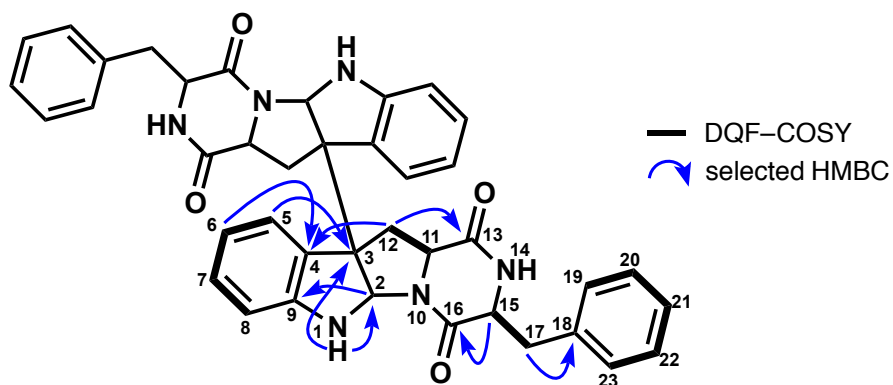
HMQC spectrum of **14** in CDCl₃ (400 MHz).



HMBC spectrum of **14** in CDCl_3 (400 MHz).



NMR data of **14** in CDCl₃. The molecular formula of **14** was established by mass data [ESI-MS: m/z 665 (M+H)⁺; HRESIMS: m/z 665.2871 (M+H)⁺, calcd. for C₄₀H₃₇N₆O₄⁺, 693.2871, Δ = 0 mmu]



Position	δ_H^a	mult. (J in Hz)		HMBC ^{a)}	δ_C^b
1 (NH)	5.49	2H	s	2, 3	
2	5.29	2H	s	3, 4, 9	78.9
3					59.2
4					126.6
5	7.21	2H	d (7.58)	3	125.4
6	6.81	2H	dd (7.58, 6.85)	4	119.6
7	7.13-7.20	2H	m		130.1
8	6.66	2H	d (7.58)	6	110.5
9				7, 8, 10, 11	150.0
11	3.88	2H	dd (11.00, 6.11)		58.9
12	2.59	2H	dd (12.72, 6.11)	2, 4	35.5
	2.69-2.75	2H	m	13	
13					168.6
15	4.13-4.20	2H	m	16	56.2
16					165.8
17	2.73	2H	dd (10.64, 4.16)	19	36.8
	3.56	2H	dd (10.64, 3.67)	18	
18					135.6
19	7.14-7.19	4H	m	17	129.6
20	7.30-7.36	4H	m		129.1
21	7.27-7.30	2H	m		127.9

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

第6節 参考文献

1. Pompon, D.; Louerat, B.; Bronine, A.; Urban, P.; Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* **1996**, 272, 51-64.
2. 第1章 第2節を参照
3. Tadano, S. Mukaeda, Y.; Ishikawa, Hayato. Bio-inspired dimerization reaction of tryptophan derivatives in aqueous acidic media: three-step syntheses of (+)-WIN 64821, (-)-ditryptophenaline, and (+)-naseaeazine B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, 52, 7990-7994.

第7章 DtpC が合成する微量成分の解析

第1節 緒言

前章において、DtpC が触媒する酵素反応について解析を行った。その中で、非生理的な基質である **11** を反応させた時のみ合成される微量成分 ts-11-34-1 および ts-11-7-3 を見出した。これら化合物は、本来の生成物である **3** と同じ質量電荷比を与えるものの、保持時間が異なっていた。DtpC はベンジルラジカルを介した反応を触媒する酵素だとその機能を推定したことから、これら微量成分は、非生理的な基質である **11** と DtpC のアクティブサイトとの親和性が弱まり、立体化学の制御ができなくなることで合成された副生成物であると考えた。そこで、これら微量成分の構造を解析することが DtpC の触媒する反応機構をより詳細に理解する手がかりになると期待した。しかしながら、**3** と比較すると、微量成分 ts-11-34-1 および ts-11-7-3 は合成量がごくわずかであり、*in vitro* 反応によりこれら化合物を十分量確保することは困難であると考えられた。そこで本章では、**11** の生合成遺伝子である FtmA¹⁾ および DtpC を *A. niger* にて異種発現することで微量成分を *in vivo* にて合成し、単離・精製することを目的とした。

第2節 ftmA および dtpC 共発現系の構築

異種発現の宿主としては、膜結合型タンパク質である DtpC を発現しつつ、より多くの化合物量を確保するため、*A. niger* を使用することとした。FtmA を出芽酵母 *S. cerevisiae* および *A. niger* で異種発現させた場合、*S. cerevisiae* では培養液 1 L 当たり 22 mg、*A. niger* では、培養液 1 L 当たり 40 mg の brevianamide F が生産されることが当研究室のこれまでの実験から分かっていた。そこで、より多くの化合物を確保するため、発現宿主として *Aspergillus* を選択し、*Aspergillus* 属において働くアミラーゼ誘導型プロモーター²⁾の下流に、**11** の生合成遺伝子である ftmA および dtpC を配置し、1つのプラスミドとした pKW4164 を作成した (fig. 7-1)。

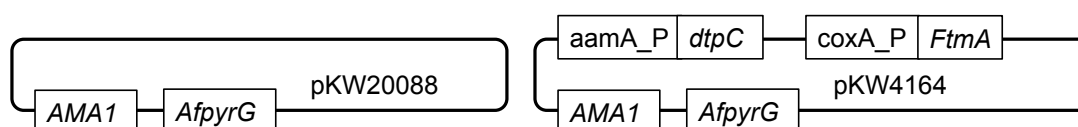


fig. 7-1 pKW20088 および pKW4164 の模式図

第3節 (-)-dibrevianamide F (2) 類縁体の合成と単離精製

構築した pKW4164 をプロトプラスト-PEG 法により、*A. niger* A1179 株へと導入し、CD/starch 液体培地にて培養することで、ftmA および dtpC 遺伝子の発現誘導および化合物生産誘導を行った。この際、空ベクターでありネガティブコントロールとなる pKW20088 を導入した株も同時に調製した。培養液を酢酸エチルにて抽出し、有機層に含まれる成分を LC-MS にて解析することで、pKW4164 を導入した株では **2** に加え、目的とする微量成分 ts-11-34-1 および ts-11-7-3 が生産されていることを確認した (fig. 7-2)。そこで、さらに大量培養を行うことで、化合物の単離精製を試みた。まず、CD/starch 液体培地より菌体をろ過により取り除き、得られた培養液上清を酢酸エチルにて分液した。酢酸エチル層をシリカゲルカラムに供し、粗精製後、HPLC により最終精製をおこなった。

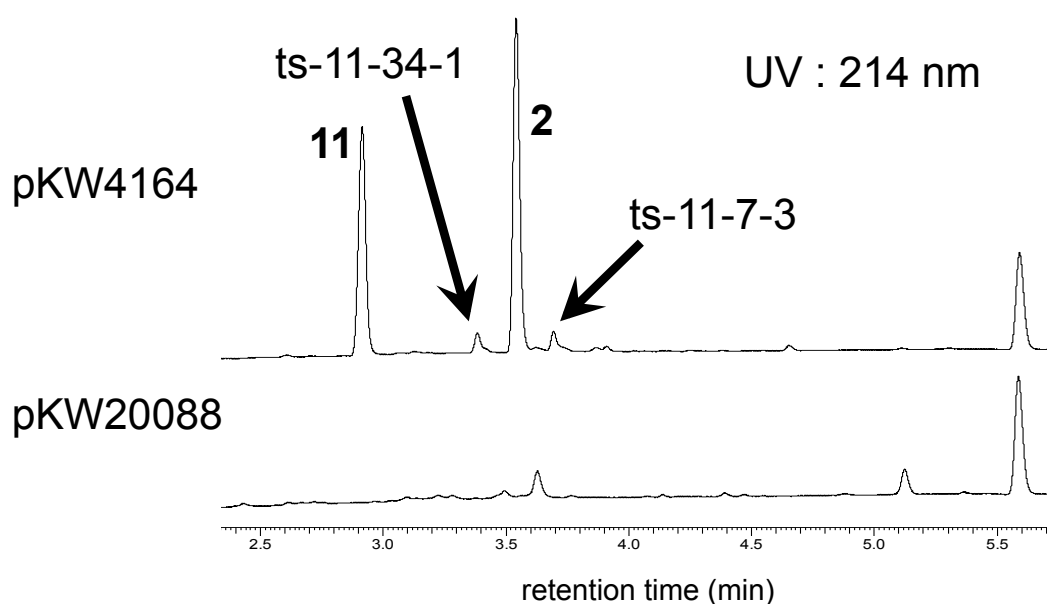


fig. 7-2 pKW4164 および pKW20088 を導入した A1179 生産化合物の解析

上段に pKW4164 導入株、下段に pKW20088 導入株の酢酸エチル抽出物の解析結果を示した (UV=214 nm)

第4節 (-)-dibrevianamide F(2)類縁体の構造解析

生産された ts-11-34-1 および ts-11-7-3 について各種 NMR スペクトルを解析することで、その構造を明らかにすることとした。まず ^1H NMR を比較 (fig. 7-3) すると、各々似通ったケミカルシフトやカップリング様式を示すものの、ts-11-34-1 および ts-11-7-3 は **2** に対して水素シグナルが倍増している様子が明らかとなった。これは、**2** が対称点を有する完全なホモダイマーであるために、モノマー分の水素シグナルのみが見られるのに対し、新たに単離された2つの化合物については、非対称なホモダイマーもしくはヘテロダイマーであることが予想された。さらに、新たに単離された化合物の一方である ts-11-34-1 は、ケミカルシフトにして約 8.35 ppm に特徴的なシングレットのシグナルを与えた。そこで、各種二次元 NMR を解析したところ、これら2つの化合物は、構成単位として2分子の **11** を有する点においては **2** と同様であるものの、その閉環および結合様式は異なっており、一方のモノマーが閉環し C3 で結合する点は同様であるが、もう一方のモノマーが閉環しておらず、C3以外で結合していることが大きな違いとして現れた。

(-)-dibrevianamide F

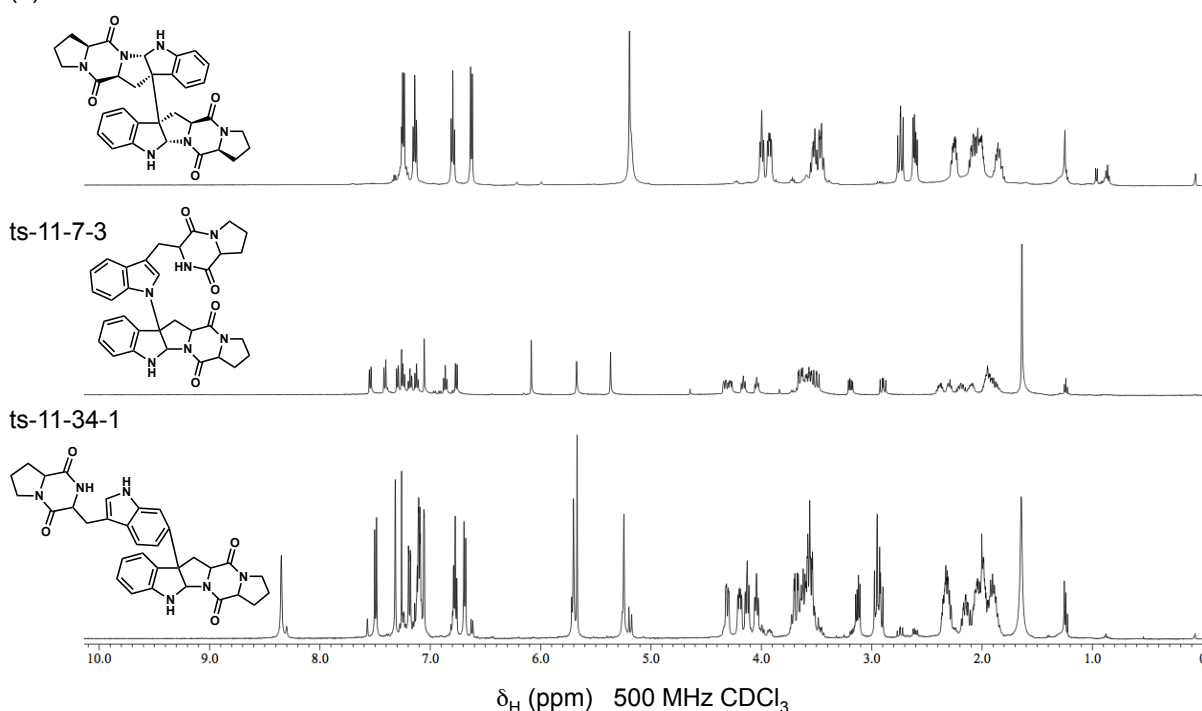


fig. 7-3 **2** 類縁化合物の平面構造式および ^1H NMR スペクトルの比較

上から順に、**2**, ts-11-7-3, ts-11-34-1 の平面構造および ^1H NMR スペクトルを示した。

第5節 考察

11 を基質として DtpC に与えた際、合成される 2 つの minor product について解析することで、その反応機構を明らかにすることを目的とした。その結果、本来の基質である化合物 10 を与えた際には見られなかった結合様式を有する 2 種の化合物 ts-11-7-3 および ts-11-34-1 を単離することに成功した。これら 2 つの化合物に共通する点は、一方のモノマーユニットが閉環しておらず、インドール環が保持されている点、インドール環の芳香族原子と C 3 部位が結合している点である。このような化合物が合成された反応機構として、やはりラジカル中間体を経た反応機構が考えられる。すなわち、本来の DtpC の反応機構は、アミド窒素上の水素を引き抜くことでラジカルを発生させた後、そのラジカルが転移し、C 3 上にラジカルが来た時のみ 2 分子のモノマーが結合できるようなコンフォメーションを形成しているものと考えられる (fig. 7-4 青文字部分)。しかし、本来の基質ではなく、化合物 10 アナログである 11 を導入した際には、基質として認識はできるものの、基質と酵素の親和性が低く、コンフォメーションの保持が不完全になると考えられる。その結果、本来水素の引き抜きが起こるアミド窒素上ではなく、インドール環の N1 位より水素の引き抜きが発生する (fig. 7-4 赤文字部分)。発生したラジカルは共鳴によりインドール環上を転移し、N1 および C 6 上にラジカルが存在する状態で C 3 と結合したものが今回得られた 2 つの minor product であると考えられる (fig. 7-4)。この反応機構は、前章で述べたベンジルラジカルを介した反応機構を支持する結果であり、その可能性をより確からしいものにしたと言える。これら 2 つの化合物と同様の閉環および二量体化を辿ったと考えられる化合物(+)-pestalazine B³⁾, (+)-naseseazine B⁴⁾が天然から単離されており、これら天然物の生合成酵素も、dtpC と同じくラジカル反応を触媒するものであると予想することができた。

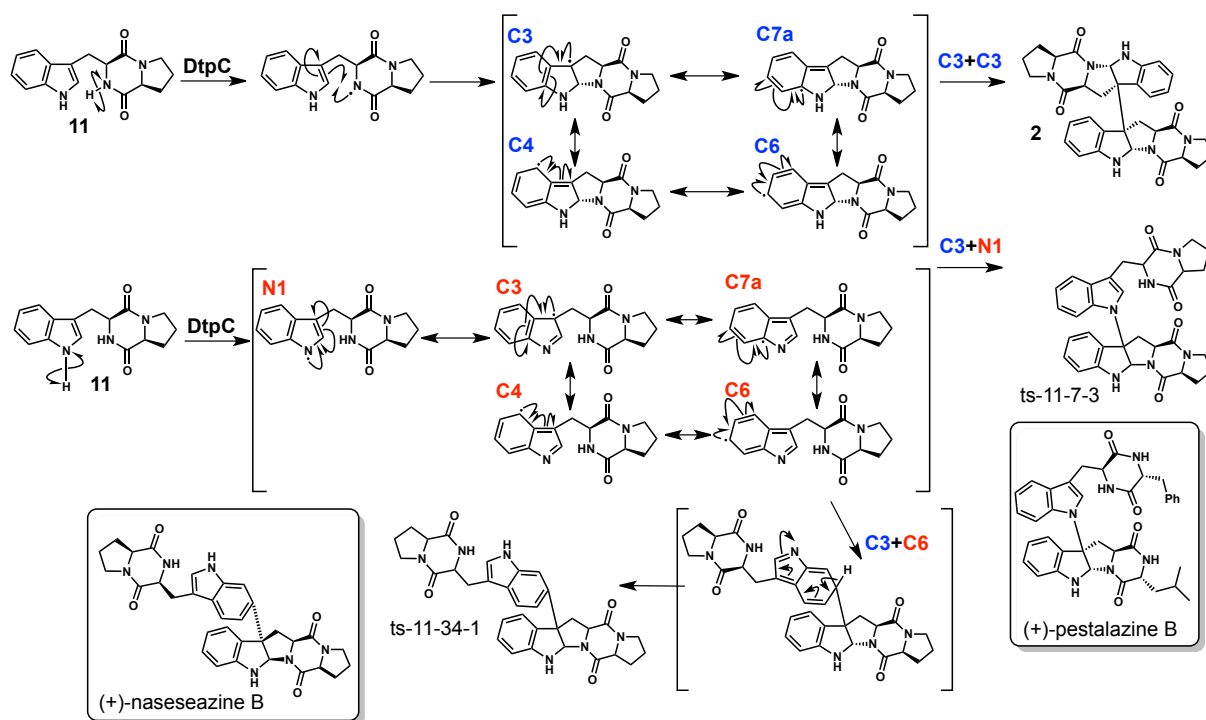


fig. 7-4 ts-11-34-1 および ts-11-7-3 の予想生成機構

1 と同様の生成経路をたどり、アミド窒素上における水素の引き抜きから派生したラジカル中間体を青、立体制御の乱れから生じた新たな経路から派生したラジカル中間体を赤で示した。新たに単離された **ts-11-34-1** および **ts-11-7-3** と類似した構造を有する天然物である(+)-pestalazine B および(+)-naseeseazine B の化学構造も併せて記した

本反応メカニズムが確かであるならば、ラジカルが発生を起点とした閉環および二量体化は **DtpC** のアクティブサイト内で行われており、二量体化による反応が終結するまでは、中間体は水分子等から隔離された環境にあると考えられる。仮に中間体がアクティブサイト内に保持されていないのであれば、ラジカルが転移することで生じる **ts-11-34-1** および **ts-11-7-3** と同様の結合様式を有する化合物が、**10** から生じるはずである。しかし本研究において、**DtpC** は **10** を基質とする際は **1** を唯一の生成物として与え、他の立体および結合様式を有する類縁体の生成は確認されなかった。これらの結果は、生理的条件下では **DtpC** はアクティブサイト内にて二量体化反応を進行させることで、その結合様式を厳密に制御していることを示しており、非生理的な基質である **11** はその制御機構から漏れだした化合物であると言える。

そこで、**DtpC** の高次構造と高い相同性を有すると考えられるヒト由来 CYP3A4 を鋳型に **DtpC** のホモロジーモデルを作成すると、ヘム鉄を中心とするアクティブサイトが大きく開いており、二量体化合物を受け入れるの十分なスペースがあることが分かった (fig. 7-5)。鋳型となった CYP3A4 は、阻害剤である ketoconazole がアクティブサイト内に2分子はまり込んだ形で共結晶が取られており⁵⁾、他にも複数の基質との共結晶が取られた P450 が知られている⁶⁷⁾。これらの点から考えて、やはり **DtpC** も2分子の基質をアクティブサイト内に隔離することで、二量体化が進行するまでの間ラジカルを安定に保持しているものと考えられる。この点については、今後 **DtpC** と基質との共結晶が得られることで、より明らかとなると期待される。

Homology model of binding DTP to DtpC (template : human CYP3A4)

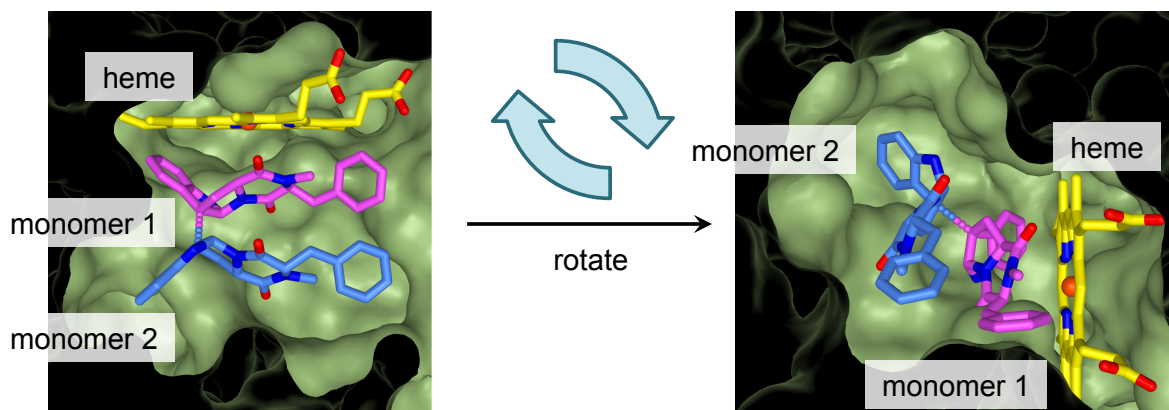


fig. 7-5 ヒト CYP3A4 を鋳型とした DtpC のホモロジーモデル

ヘム鉄を中心としたアクティブサイトが大きく広がっており、DTP を受け入れるのに十分なスペースがある様子が見てとれる

第6節 実験項

(1) 使用菌株

A. niger A1179

FtmA および dtpC の異種発現宿主として使用した

(2) 遺伝子発現誘導および物質生産誘導

[プラスミドの導入]

4章5節(7)と同様の方法により行った

[ftmA、dtpC 発現誘導]

4章5節(7)項と同様の方法により行った

(3) 2 類縁体の単離・精製

6 L の CD/starch 培養液をろ過することで菌体と培地を分離した。菌体についてはアセトンで抽出、減圧留去した後に、酢酸エチルで分液抽出し、得られた有機層を減圧乾固した。培地については、等量の酢酸エチルを用いて分液抽出し、得られた有機層を減圧乾固した。得られた2つの有機層乾燥物を合わせた後、シリカゲルカラムにて粗精製した。さらに、ナカライテスク社製 Cosmosil 5C18-MS-II (20 x 250 mm, MeCN/H₂O = 22/78, 流速 8 mL/min)、Cosmosil Cholester (20 x 250 mm, MeCN/H₂O = 20/80, 流速 8 mL/min)、Cosmosil Cholester (10 x 250 mm, MeCN/H₂O = 28/72, 流速 4 mL/min) を用いた HPLC により、各化合物を単離・精製した (fig. 7-6)。

pKW4164 / A1179 (*Aspergillus niger*)
 CD starch 6 L, 30°C, 5 day, shaking culture

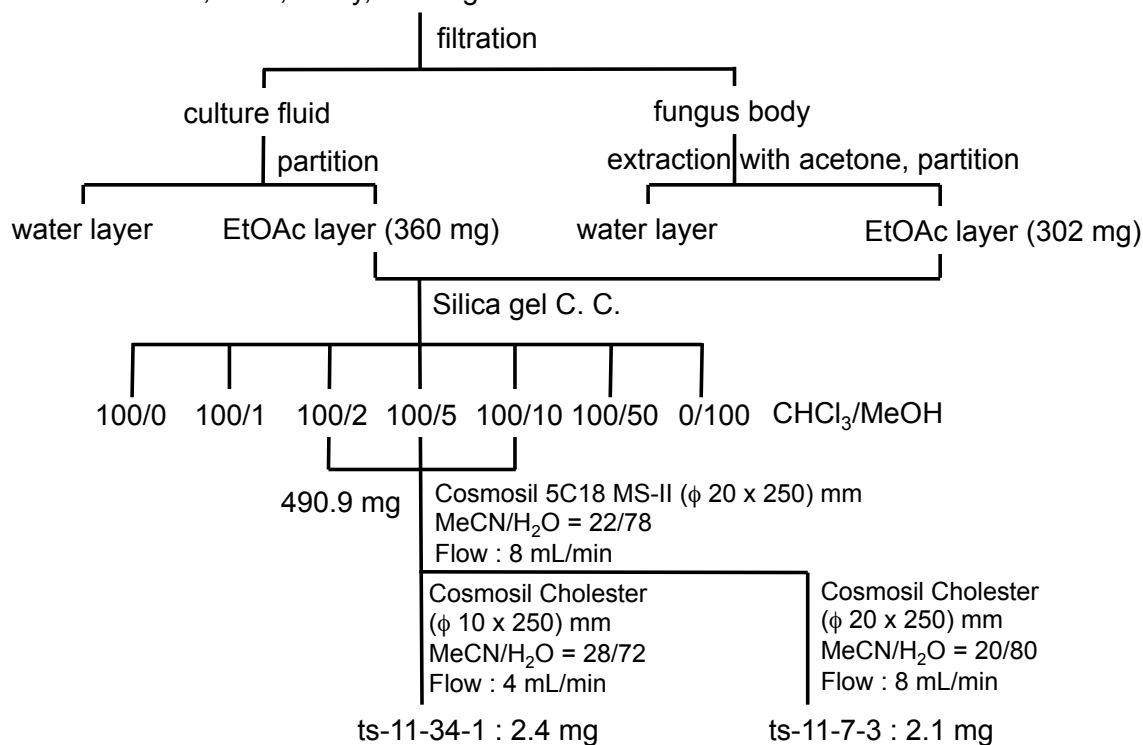


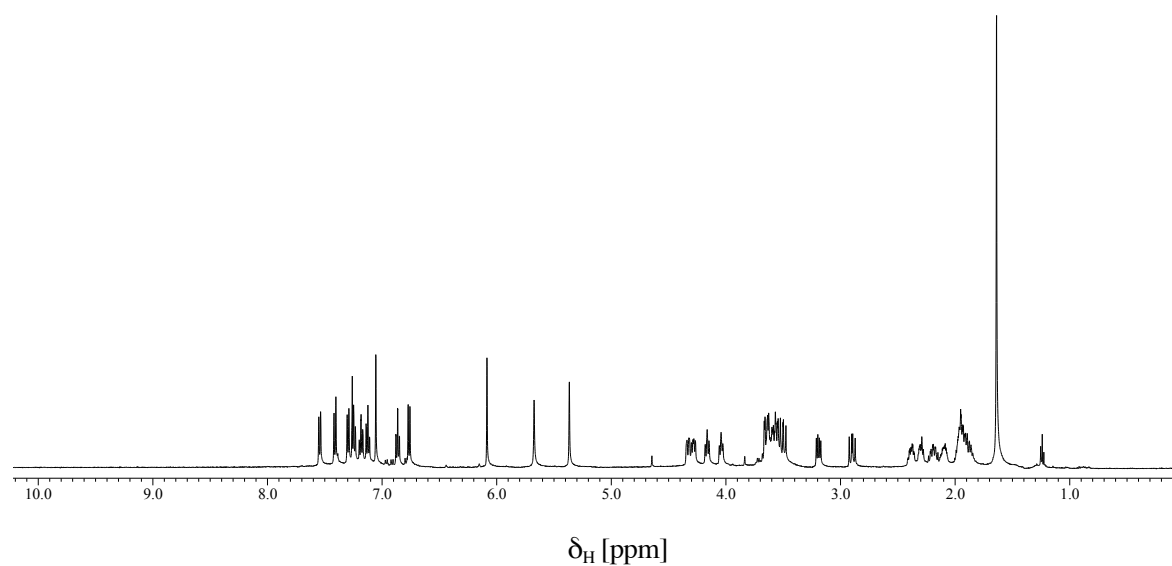
fig. 7-6 ts-11-34-1 および ts-11-7-3 の精製スキーム

(4) ホモロジーモデルの作成

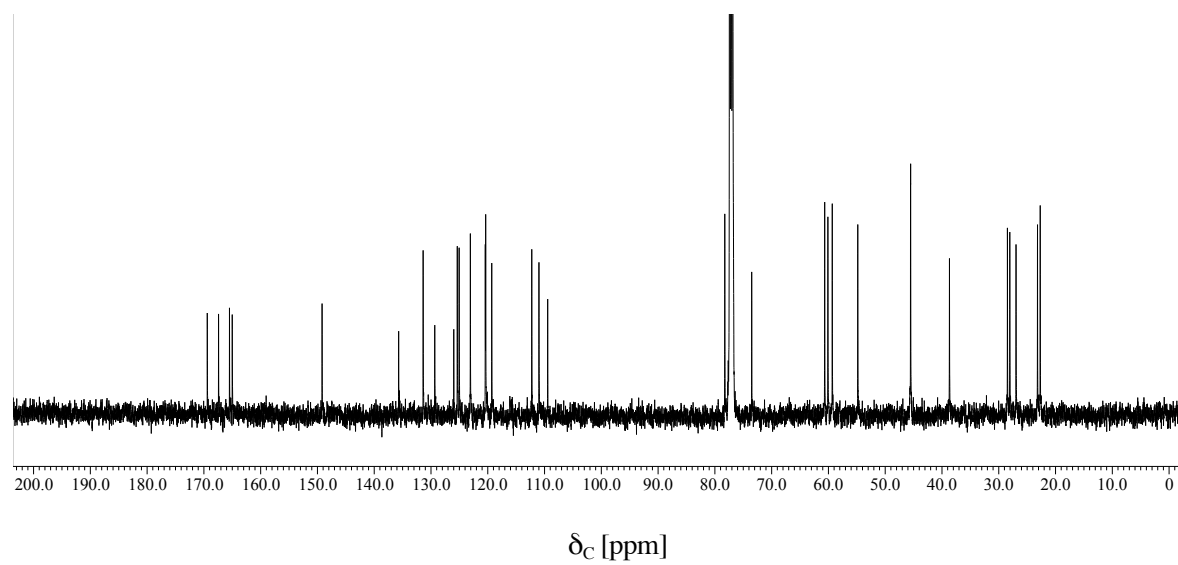
ntpC と高次構造の相天性が高いタンパク質を検索するため、FFAS03 (<http://ffas.burnham.org/ffas-cgi/cgi/ffas.pl>) を使用した。protein data bank に保存されるタンパク質結晶構造に対し、高次構造の相天性検索を行った結果、ntpC はヒト由来 cytochrome P450 3A4 (PDB ID : 3TJS) と最も高い相天性を有することが分かった (score:-77.700)。ホモロジーモデルの作成には、タンパク質の構造および機能の推定を行うオンラインのプラットフォームである I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) を利用し、基質と酵素のドッキングは手作業にて行った。

第7節 NMR データ

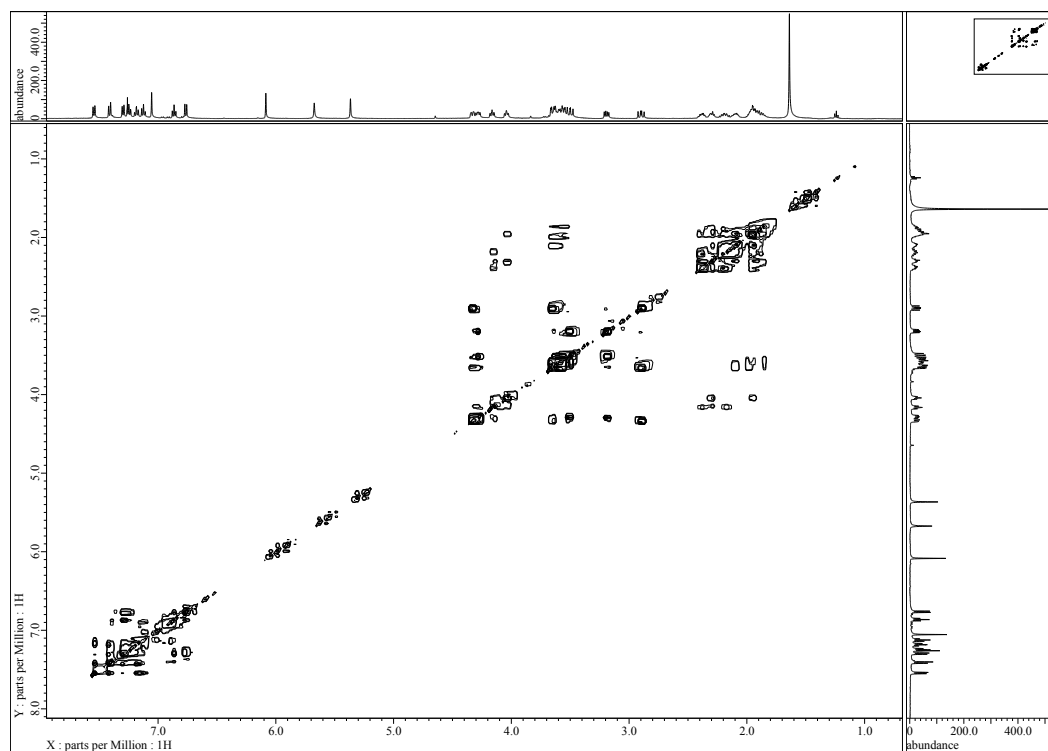
^1H NMR spectrum of ts-11-7-3 in CDCl_3 (500 MHz).



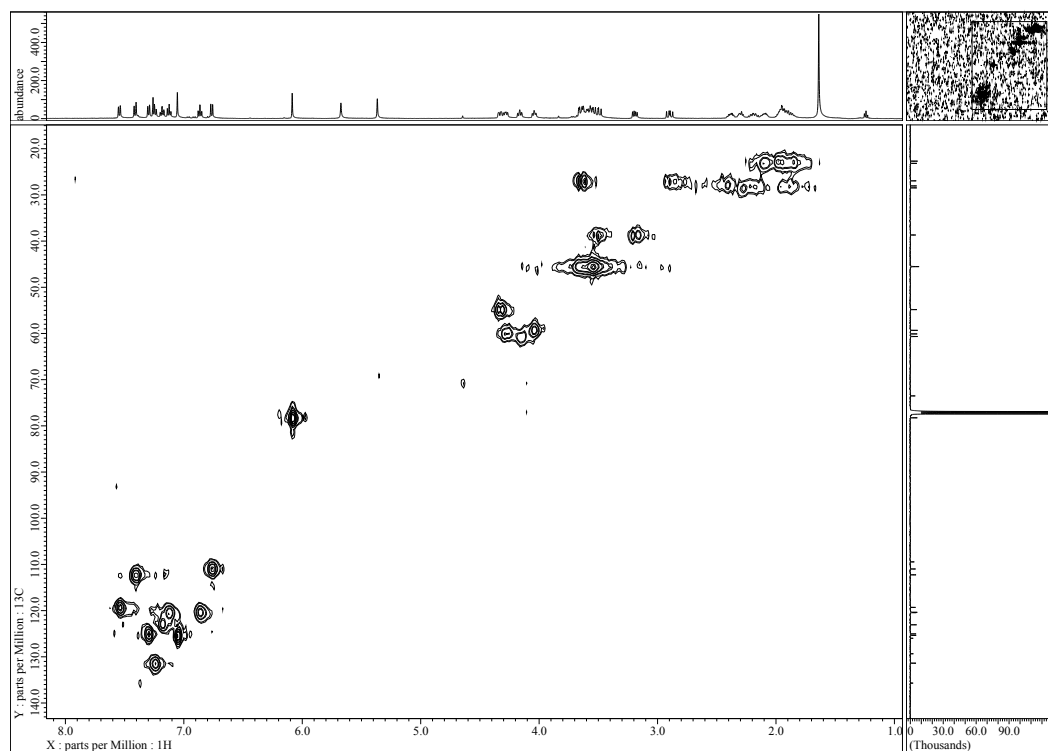
^{13}C NMR spectrum of ts-11-7-3 in CDCl_3 (125 MHz).



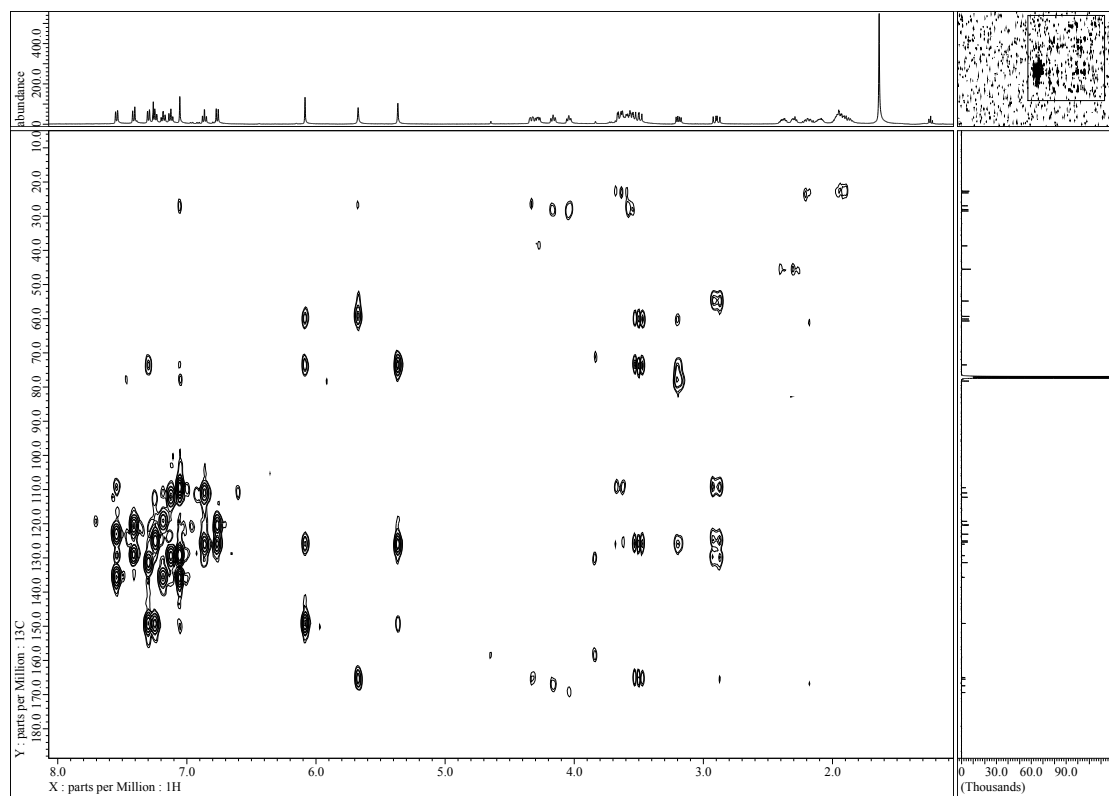
DQF-COSY spectrum of ts-11-7-3 in CDCl₃ (500 MHz).



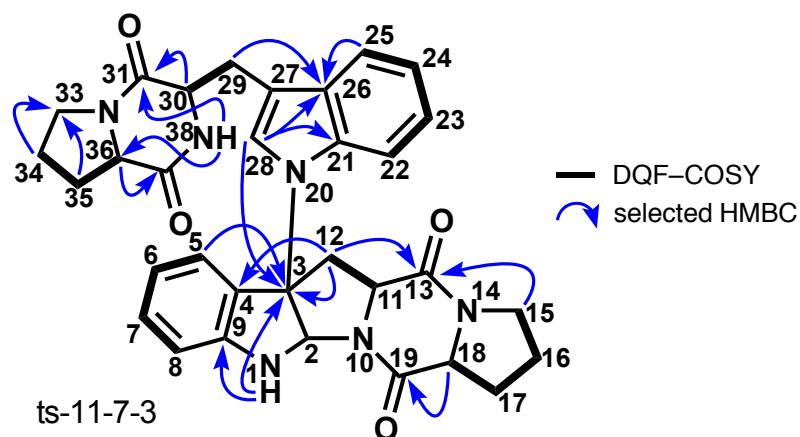
HMQC spectrum of ts-11-7-3 in CDCl₃ (500 MHz).



HMBC spectrum of ts-11-7-3 in CDCl₃ (500 MHz).



NMR data of ts-11-7-3 in CDCl₃. The molecular formula of ts-11-7-3 was established by mass data [ESI-MS: m/z 565 (M+H)⁺; HRESIMS: m/z 565.2558 (M+H)⁺, calcd. for C₃₂H₃₃N₆O₄⁺, 565.2557, Δ = 0.1 mmu]

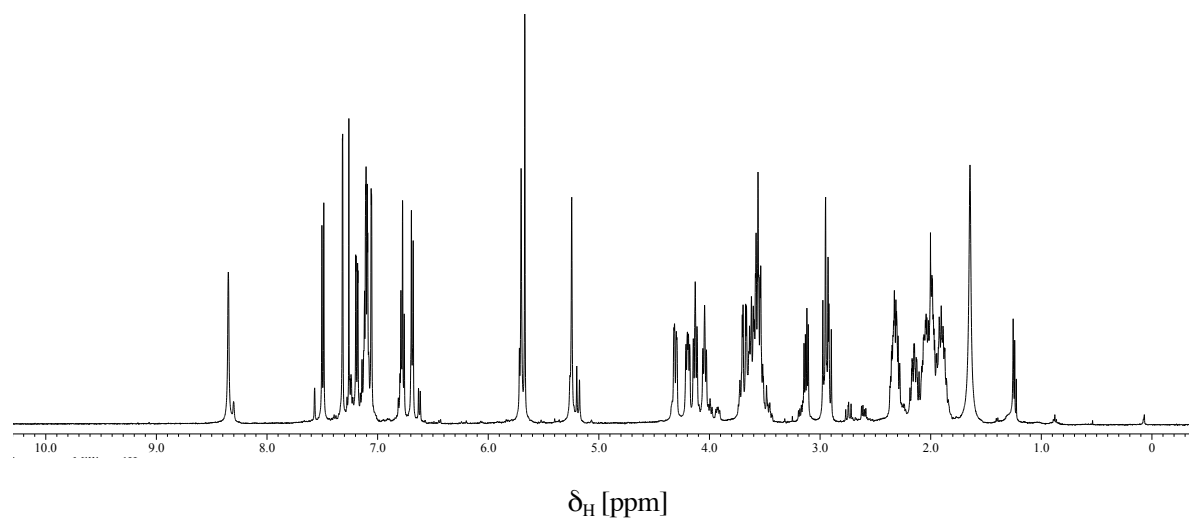


Position	δ_H^a	mult. (J in Hz)		HMBC ^a	δ_C^b
1 (NH)	5.37	1H	s	3, 4, 9	
2	6.09	1H	s	3, 4, 9, 11	78.3
3					73.5
4					125.9
5	7.30	1H	d (7.5)	3, 6, 9	125.0
6	6.86	1H	dd (7.5, 7.4)	4, 8	120.4
7	7.25	1H	dd (7.5, 7.4)	5, 8, 9	131.4
8	6.77	1H	d (7.5)	4, 6	111.0
9					149.2
11	4.28	1H	dd (10.3, 6.3)	12	60.1
12	3.19	1H	dd (12.9, 6.3)	2, 3, 4, 11	38.7
	3.50	1H	dd (13.2, 10.3)	4, 11, 13	
13					165.0
15	3.52-3.62	1H	m	13	45.5
	3.52-3.62	1H	m		
16	1.80-2.02	1H	m		22.7
	1.80-2.02	1H	m		
17	1.80-2.02	1H	m		28.1
	2.04-2.15	1H	m		
18	4.16	1H	dd (9.7, 5.7)	17, 19	60.7
19					167.4
21					135.7
22	7.41	1H	d (8.0)	24, 26	112.3
23	7.18	1H	dd (8.0, 7.5)	21, 25	123.1
24	7.12	1H	dd (8.0, 7.5)	22, 26	120.4
25	7.55	1H	dd (8.0, 7.5)	21, 24, 26, 27	119.3
26					129.3
27					109.4
28	7.05	1H	s	21, 26, 27	125.4
29	2.89	1H	dd (15.5, 10.9)	26, 27, 30,	27.0
	3.62-3.69	1H	m		
30	4.33	1H	dd (10.6, 2.9)	29, 31	54.8
31					165.5

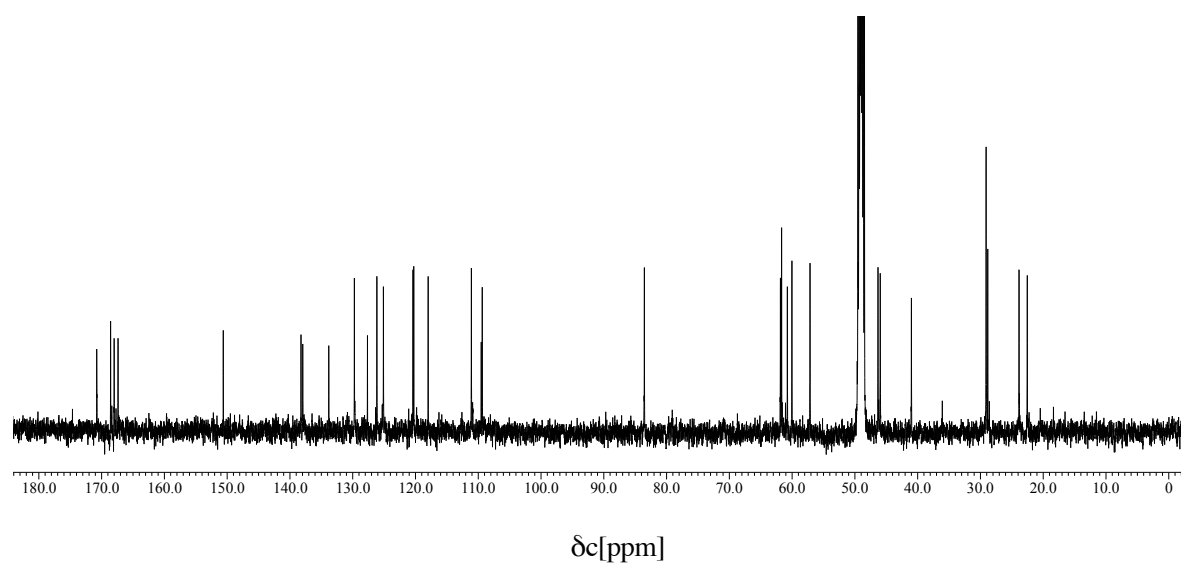
33	3.52-3.62	1H	m		45.5
	3.52-3.62	1H	m		
34	2.15-2.25	1H	m		28.5
	2.25-2.34	1H	m		
35	1.80-2.02	1H	m		28.1
	2.34-2.44	1H	m		
36	4.04	1H	dd (7.7, 7.5)	35, 37	59.3
37					169.4
38(NH)	5.67	1H	s	29, 36, 31	

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

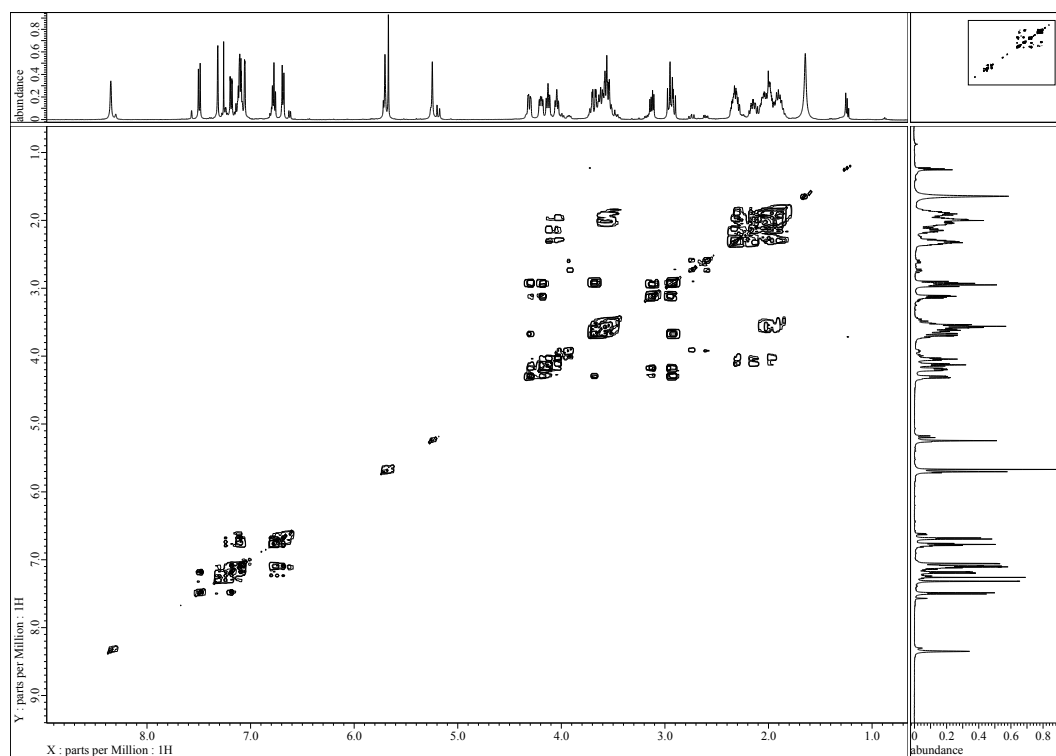
^1H NMR spectrum of ts-11-37-1 in CDCl_3 (500 MHz).



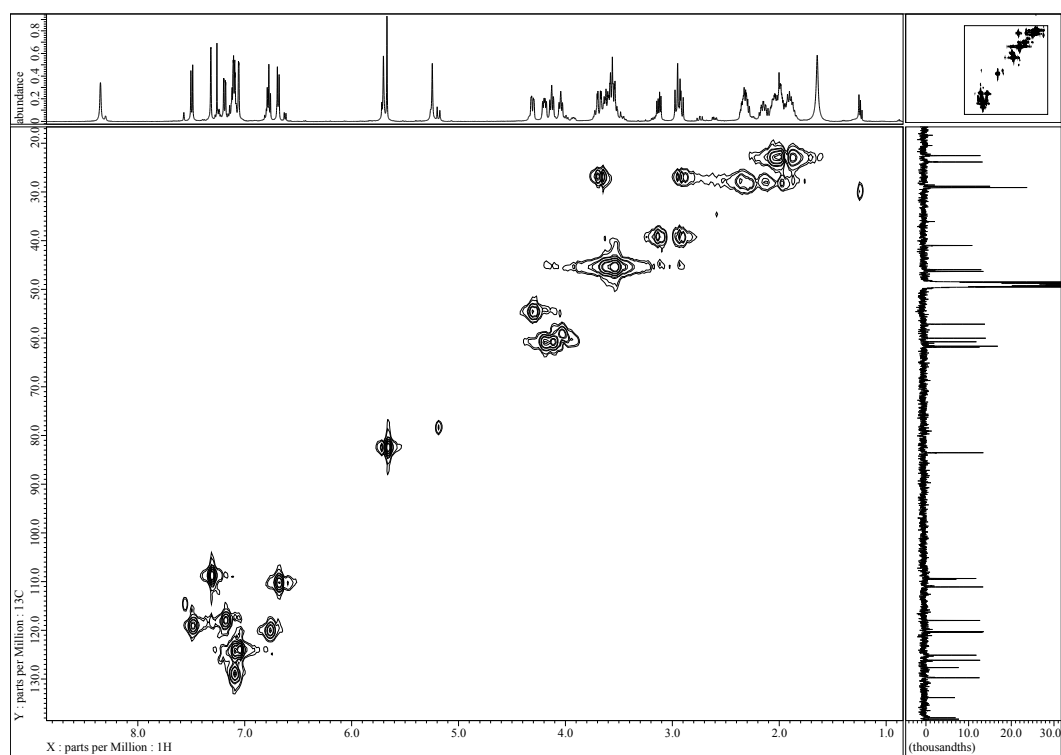
^{13}C NMR spectrum of ts-11-37-1 in CDCl_3 (125 MHz).



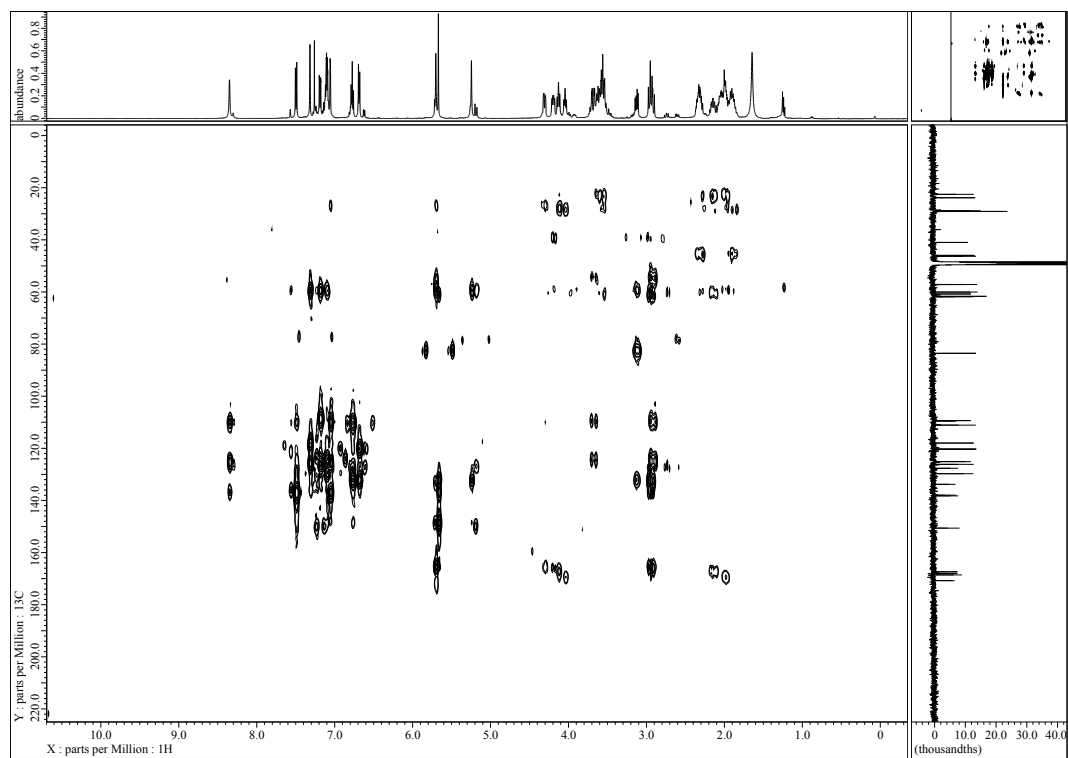
COSY spectrum of ts-11-37-1 in CDCl_3 (500 MHz).



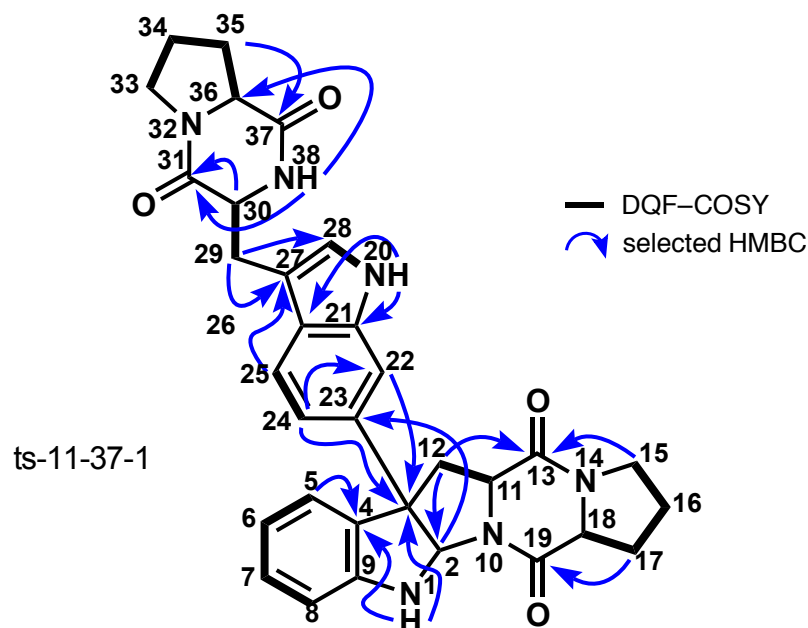
HMQC spectrum of ts-11-37-1 in CDCl_3 (500 MHz).



HMBC spectrum of ts-11-37-1 in CDCl₃ (500 MHz).



NMR data of ts-11-37-1 in CDCl₃. The molecular formula of ts-11-37-1 was established by mass data [ESI-MS: m/z 629 (M+H)⁺; HRESIMS: m/z 565.2558 (M+H)⁺, calcd. for C₃₂H₃₃N₆O₄⁺, 565.2557, Δ = 0.1 mmu]



Position	$\delta_{\text{H}}^{\text{a)}$	mult. (J in Hz)		HMBC ^{a)}	$\delta_{\text{C}}^{\text{b)}$
1 (NH)	5.25	1H	s	3, 4	
2	5.67	1H	s	4, 9, 11, 23	82.5
3					59.4
4					132.3
5	6.69	1H	d (7.9)	4, 6	110.3
6	6.77	1H	dd (7.9, 7.3)	4, 5, 8	120.0
7	7.08-7.10	1H	m	8	124.0
8	7.10-7.12	1H	m		129.4
9					148.7
11	4.19	1H	dd (10.5, 6.2)	12, 13	60.9
12	2.95	1H	dd (14.7, 10.5)	4, 11, 13	39.3
	3.13	1H	dd (14.7, 6.2)	2, 3, 4	
13					165.8
15	3.50-3.65	1H	m	16	45.4
	3.50-3.65	1H	m		
16	1.81-1.96	1H	m	15	23.2
	1.96-2.09	1H	m		
17	2.10-2.20	1H	m		27.9
	2.27-2.37	1H	m		
18	4.13	1H	dd (9.6, 6.2)	17, 19	60.7
19					167.1
20(NH)	8.35		brs	26, 27	
21					136.8
22	7.32	1H	d (1.7)	3, 24, 26	108.8
23					137.5
24	7.19	1H	dd (8.5, 1.7)	3, 22, 26	118.1

25	7.50	1H	d (8.5)	21, 27	119.1
26					125.9
27					109.9
28	7.05	1H	d (2.3)	21, 27	124.2
29	2.93	1H	dd (15.3, 10.8)	27, 28	26.9
	3.68	1H	dd (15.3, 2.8)	27, 28, 30	
30	4.31	1H	dd (10.8, 2.8)	29, 31	54.7
31					165.5
33	3.50-3.65	1H	m		45.5
	3.50-3.65	1H	m		
34	2.00-2.10	1H	m		22.9
	2.00-2.10	1H	m		
35	1.96-2.02	1H	m		28.4
	2.27-2.37	1H	m		
36	4.05	1H	dd (7.7, 7.4)	35, 37	59.4
37					169.4
38(NH)	5.70	1H	brs	31, 36	

a) Recorded at 500 MHz. b) Recorded at 125 MHz.

第 8 節 参考文献

1. Tsunematsu, Y.; Ishikawa, N.; Wakana, D.; Goda, Y.; Noguchi, H.; Moriya, H.; Hotta, K.; Watanabe, K. Spiro-carbon formation by different chemistry involving pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9*, 818-825.
2. Blumhoff, M.; Steiger, M. G.; Marx, H.; Mattanovich, D.; Sauer, M. Six novel constitutive promoters for metabolic engineering of *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 259-267.
3. Ding, G.; Jiang, L.; Guo, L.; Chen, X.; Zhang, H.; Che, Y. Pestalazines and pestalamides, bioactive metabolites from the plant pathogenic fungus pestalotiopsis theae. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 1861-1865.
4. Raju, R.; Piggott, A. M.; Conte, M.; Aalbersberg, W. G. L.; Feussner, K.; Capon, R. J. Naseseazines A and B: a new dimeric diketopiperazine framework from a marine-derived actinomycete, *Streptomyces* sp. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 3862-3865.
5. Ekroos, M.; Sjögren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 13682-13687.
6. Shah, M. B.; Wilderman, P. R.; Pascual, J.; Zhang, Q.; Stout, C. D.; Halpert, J. R. Conformational adaptation of human cytochrome P450 2B6 and rabbit cytochrome P450 2B4 revealed upon binding multiple amlodipine molecules. *Biochemistry* **2012**, *51*, 7225-7238.
7. Zhao, B.; Guengerich, F. P.; Bellamine, A.; Lamb, D. C.; Izumikawa, M.; Lei, L.; Podust, L. M.; Sundaramoorthy, M.; Kalaitzis, J. A.; Reddy, L. M.; Kelly, S. L.; Moore, B. S.; Stec, D.; Voehler, M.; Falck, J. R.; Shimada, T.; Waterman, M. R. Binding of two flaviolin substrate molecules, oxidative coupling, and crystal structure of *Streptomyces coelicolor* A3(2) cytochrome P450 158A2. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 11599-11607.

第8章 総括

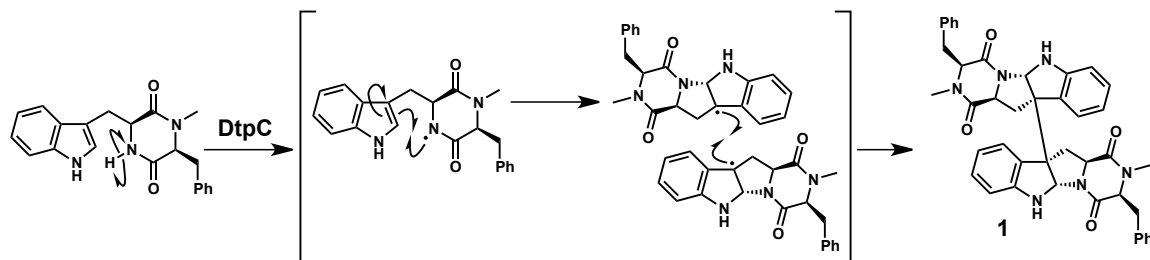
本研究では、特徴的な二量体化ジケトピペラジン構造を有する天然物(–)-ditryptophenaline(**1**)に着目し、その生合成経路を明らかにすること、および鍵反応となる二量体化がどのように進行しているかを明らかにすることを目的に実験を行った。

まず、**1** がメチル化ジケトピペラジンの二量体化合物である点から、その生合成には NRPS、メチル基転移酵素、酸化酵素が必要であると考え、生合成遺伝子クラスターを推定した。本予想生合成遺伝子クラスターと **1** の関係性を明らかにするために、各遺伝子破壊株を作成したところ、全ての破壊株において DTP の生産能力が失われた。このことから、これら生合成遺伝子を dtpA (NRPS)、dtpB (N-methyltransferase)、dtpC (P450) とし、**1** 生合成遺伝子クラスターを決定した。

dtpA および dtpB については、出芽酵母 *S. cerevisiae* および糸状菌 *A. niger* を宿主として遺伝子異種発現により、その機能を明らかとした。すなわち、dtpA を異種発現させた *S. cerevisiae* においては、トリプトファンとフェニルアラニンのジケトピペラジン **9** が合成されていることを確認し、dtpA および dtpB を同時に異種発現させた *A. niger* においては、dtpC の破壊株において生産された N-メチルジケトピペラジン **10** と同一の化合物が生産されていることを確認した。これらの結果から、その後のインドール環とジケトピペラジンの間の閉環反応を dtpC が担うことが期待された。

そこで、dtpC を含むミクロソーム画分による *in vitro* 反応を試みた結果、dtpC は閉環–二量化反応を触媒した。それら 2 つの反応は協奏的に進行し、安定に単離することが可能である中間体を与えず、**1** のみを生成物として与えることが分かった。本結果および dtpC が P450 であることを考えると、dtpC はラジカル反応を司どり、アミド窒素上の水素の引き抜きにより生じたラジカルが駆動力となり、閉環および二量体化を位置および立体選択的に進行させる酵素であると予想した。本予想反応経路は、dtpC の基質アナログである **11** を dtpC に与えた際に生じる ts-11-7-3 および ts-11-37-1 の構造からも支持されるものである。すなわち、ts-11-7-3 および ts-11-37-1 の結合部位がインドール環上でのラジカル転移する部位と一致しており、本反応がラジカルを介する 1 つの証明になっていると考えられる。

ジケトピペラジン系化合物の二量体化反応について、分子生物学的に証明した例は本研究が初めてである。一方で、有機化学的合成においては以前からラジカル反応を介した二量体化反応が盛んに行われており、近年も Ishikawa らによりその合成法が提唱されている。これら有機合成的手法と、本研究により発見された dtpC との違いは、その部位及び立体選択性の厳密さにあり、dtpC はトリプトファンのユニットを認識し、閉環および二量体化を触媒するが、圧倒的な比率で立体中心が全て S の化合物のみを与える。このように厳密な選択性を有する酵素の発見が、分子生物学やバイオインフォマティクスを利用した生合成研究はもちろん、今後の有機化学的合成の一助になると期待できる。



謝辞

学部4年生にて本研究室に配属されて以来、終始御指導、御鞭撻を賜りました、静岡県立大学薬学研究生薬学講座教授 野口博司先生に深く感謝致します。

日々直接の指導に当たって下さり、自由な研究の場を与えて頂きました、生薬学講座准教授 渡辺賢二先生に心から感謝を申し上げます。

度々、適切な御助言を下さいました生薬学講座講師 梅原薫先生、生薬学講座助教 鰐淵清史先生に感謝致します。

また、博士論文を作成するにあたり、副査として懇切丁寧な御助言を下さいました、医薬品製造化学分野教授 菅敏幸先生、医薬品創製化学分野教授 濱島義隆先生、生命物理化学分野教授 橋本博先生に感謝致します。

出芽酵母に関する数々のサンプルやアドバイスを御恵与頂きました岡山大学異分野融合先端研究コア准教授 守屋央朗先生に深甚なる謝意を表します。

(-)-dibrevianamide F および(-)-tryptophenaline のX線結晶構造解析に御協力頂きました千葉大学大学院工学研究科准教授 三野孝先生、ならびに千葉大学共用機器センター特任助教 八木下史敏先生に深甚なる謝意を表します。

生合成研究に携わるきっかけを与えて下さいました東京大学大学院薬学系研究科教授 阿部郁朗先生に心より感謝致します。

糸状菌研究に関する基本的な実験手技や知識を御恵与頂きました京都大学大学院農学研究科助教 中沢武人先生に御礼申し上げます。

公私にわたり、研究の楽しみ、人生の歩き方を指南して下さいました生薬学講座特任助教 佐藤道大先生、恒松雄太先生、田中秀則先生、山本剛先生に心より感謝申し上げます。

研究室での生活において、沢山の御助言や御協力を頂いた、生薬学講座の先輩、同級生、後輩の方々に心から感謝致します。

最後に、これまで成長を温かく見守って下さり、常に心の支えとなって頂きました両親をはじめとする家族に深く感謝致します。

2014年3月 猿渡隆佳