

博士論文

ネクトリシン生合成機構の解明と
製法構築への応用に関する研究

平成 28 年 12 月

宮内隆記

略号	4
1. 緒言	6
1.1 イミノ糖の発見と医薬への応用	6
1.1.1 イミノ糖	6
1.1.2 糖尿病治療薬	6
1.1.3 ライソゾーム病治療薬	7
1.1.4 N 結合型糖鎖プロセッシングの阻害	7
1.2 イミノ糖の生合成	8
1.2.1 スワインソニンの推定生合成経路	8
1.2.2 デオキシノジリマイシンの推定生合成経路	8
1.3 Nectrisine	9
1.4 Nectrisine の CS-1036 製法への応用	10
1.5 本論文の目的と概要	10
1.6 引用文献	11
2. <i>Thelonectria discophora</i> SANK 18292 における nectrisine の生合成経路の 解析	15
2.1 緒言	15
2.2 実験方法と結果	16
2.2.1 菌株の同定	16
2.2.2 中間体候補物質の探索	16
2.2.2.1 <i>T. discophora</i> の培養	17
2.2.2.2 化合物の分析	17
2.2.2.3 糖類の消費量と nectrisine 生産量の評価	18
2.2.3 ¹³ C 標識した D-ribose と D-xylose の添加実験	20
2.2.4 4-amino-4-deoxyarabinitol の X 線単結晶構造解析	23
2.2.4.1 <i>T. discophora</i> の培養と 4-amino-4-deoxyarabinitol の精製	23
2.2.4.2 X 線単結晶構造解析	24
2.2.5 菌体抽出液による 4-amino-4-deoxyarabinitol の nectrisine への変換	26
2.2.5.1 菌体抽出液の調製	26
2.2.5.2 ELSD-HPLC	26
2.2.5.3 菌体抽出液による 4-amino-4-deoxyarabinitol の nectrisine への変換	26
2.3 考察	27
2.3.1 Nectrisine の推定生合成経路	27
2.4 小括	31
2.5 引用文献	31

2.6	補遺.....	35
3.	Nectrisine 生合成酵素の <i>Thelonectria discophora</i> SANK 18292 からの精製 と特性解析	42
3.1	緒言.....	42
3.2	実験方法と結果.....	43
3.2.1	<i>T. discophora</i> の培養と 4-amino-4-deoxyarabinitol oxidase (NecC) の 精製.....	43
3.2.2	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) によ る NecC の部分アミノ酸配列の推定	45
3.2.3	NecC の補因子の分析	48
3.2.4	NecC の会合状態の分析	49
3.2.5	NecC の反応特性	51
3.2.6	4-amino-4-deoxyarabinitol の菌体内での蓄積	54
3.3	考察.....	55
3.3.1	NecC の精製.....	55
3.3.2	NecC の会合状態.....	55
3.3.3	NecC の反応特性	55
3.3.4	Nectrisine の製法構築への応用.....	56
3.4	小括.....	57
3.5	引用文献.....	57
4.	Nectrisine 生合成遺伝子の同定と機能解析	61
4.1	緒言.....	61
4.2	実験方法と結果.....	62
4.2.1	ヌクレオチドのアクセッション番号	62
4.2.2	糸状菌の株と培養条件	62
4.2.3	細菌の株と核酸の取り扱い及び PCR 用プライマー	62
4.2.4	<i>necC</i> 遺伝子のクローニング	63
4.2.4.1	<i>necC</i> 遺伝子断片のクローニング	64
4.2.4.2	<i>T. discophora</i> ゲノム DNA ライブラリーの構築とスクリーニ ング	64
4.2.5	<i>necC</i> 遺伝子の大腸菌発現による機能検証	67
4.2.5.1	<i>necC</i> 遺伝子の大腸菌による生産と精製.....	67
4.2.5.2	Nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol の LC-MS 分析.....	67
4.2.5.3	<i>necC</i> 遺伝子の大腸菌発現による機能検証.....	68
4.2.6	<i>necC</i> 周辺のゲノム DNA 配列の解析.....	70
4.2.7	<i>T. discophora</i> 形質転換系の確立.....	72

4.2.7.1	遺伝子破壊・相補のための基本ベクターの構築	72
4.2.7.2	形質転換系の検討	72
4.2.8	遺伝子破壊と相補による <i>necA</i> 、 <i>B</i> 、 <i>C</i> 遺伝子の機能検証	73
4.2.8.1	遺伝子破壊ベクターの構築	73
4.2.8.2	遺伝子相補ベクターの構築	73
4.2.8.3	プロトプラストの調製と PEG を用いた形質転換	74
4.2.8.4	サザンハイブリダイゼーション	74
4.2.8.5	代謝産物の抽出と LC-MS 分析	74
4.2.8.6	<i>necC</i> 遺伝子の破壊と相補による機能検証	75
4.2.8.7	<i>necA</i> 遺伝子の破壊と相補による機能検証	78
4.2.8.8	<i>necB</i> 遺伝子の破壊による機能検証	81
4.2.9	<i>necA</i> 、 <i>necB</i> 、 <i>necC</i> の大腸菌での共発現	83
4.2.9.1	方法	83
4.2.9.2	結果	84
4.3	考察	86
4.3.1	Nectrisine の推定生合成経路	86
4.3.2	Nectrisine 生合成遺伝子クラスター	87
4.4	異種発現による nectrisine の生産	88
4.5	小括	89
4.6	引用文献	89
4.7	補遺	94
5.	結論と今後の展望	95
5.1	結論	95
5.2	今後の展望	96
5.2.1	生合成遺伝子と酵素の解析	96
5.2.2	異種発現による nectrisine 生産	96
5.2.3	元菌による nectrisine の大量生産	97
5.2.3.1	CS-1036 の製法への応用	97
5.2.3.2	<i>T. discophora</i> による nectrisine の大量生産法の開発	97
5.2.4	他のイミノ糖の生合成遺伝子の取得	98
5.3	引用文献	98
	研究業績	100
	謝辞	102

略号

ABTS	2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
BLAST	Basic local alignment search tool
CBB	Coomassie Brilliant Blue R-250
DAB	1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol
DIG	Digoxigenin
DMJ	1-Deoxymannojirimycin
DNJ	1-Deoxynojirimycin
DSC	Differential scanning calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELSD	Evaporative light scattering detection
EMS	Ethylmethane sulfonate
ESI	Electrospray ionization
GMC	Glucose-methanol-choline
GPYC	Glycerol、Potato granule、Yeast extract、CaCO ₃
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC	High performance liquid chromatography
ITS	Internal Transcribed Spacer
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
Max	Maximum
MFS	Major facilitator superfamily
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NBD	7-Nitrobenzofurazan
NBD-F	4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan
NCBI	National center for biotechnology information
NJ	Nojirimycin
NTG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine
ORF	Open reading frame
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDA	Photo diode array
PDA (培地)	Potato Dextrose Agar (培地)
PEG	Polyethylene glycol
SE-HPLC	Size exclusion-high performance liquid chromatography

SEC	Size exclusion chromatography
TCA	Trichloroacetic acid
TLC	Thin layer chromatography
h	Hour
rpm	Round per minute
sec	Second

1. 緒言

1.1 イミノ糖の発見と医薬への応用

1.1.1 イミノ糖

イミノ糖 (アザ糖) は微生物や植物などが産生する糖のアナログで、最も基本的なものはピラノース環やフラノース環中の酸素が窒素に置換された構造を有する。例えばノジリマイシン (NJ) はグルコースのアナログである (Figure 1-1)。一般に、イミノ糖はそれぞれに対応した糖の構造を模擬することでそれらに作用するグリコシダーゼを阻害する (1-6)。

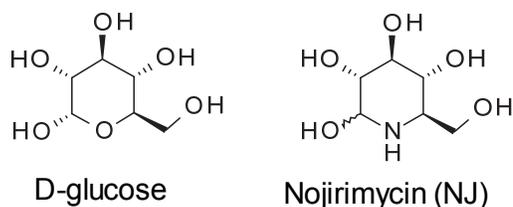


Figure 1-1 Structure of D-glucose and an iminosugar nojirimycin.

1.1.2 糖尿病治療薬

初めて見つかった天然のイミノ糖は NJ で、*Streptomyces* 属から 1966 年に日本で発見された (7)。類似した化合物であるデオキシノジリマイシン (DNJ) (Figure 1-2) は、初め 1968 年に合成され、後に 1976 年にクワより単離された (3)。DNJ は強い α -、 β -グルコシダーゼ阻害活性を有する。グルコシダーゼは腸内の多糖類の分解に関与しているので、その活性を阻害するイミノ糖は糖尿病治療薬や抗肥満薬として期待できる。Miglitol (N-ヒドロキシエチル-DNJ) は DNJ の誘導体であり、2 型糖尿病治療薬として市販されている。

CS-1036 はデオキシグルコース、グルコース、及びイミノ糖である 1,4-ジデオキシ-1,4-イミノ-D-アラビニトールの 3 つのパーツ (以降、A、B、C ユニットと表記) から構成される糖誘導体であり、食後過血糖改善及び 2 型糖尿病の治療薬として三共株式会社 (現第一三共株式会社) にて創製された化合物である (8, 9)。作用機序は α -アミラーゼを阻害することによるグルコースの吸収阻害であり、既に市販されている α -グリコシダーゼ阻害剤の薬効を維持しながら、下痢等の副作用低減を期待し開発されていたが、フェーズ 2 における臨床試験で期待した効果が得られずに開発は中断されている。

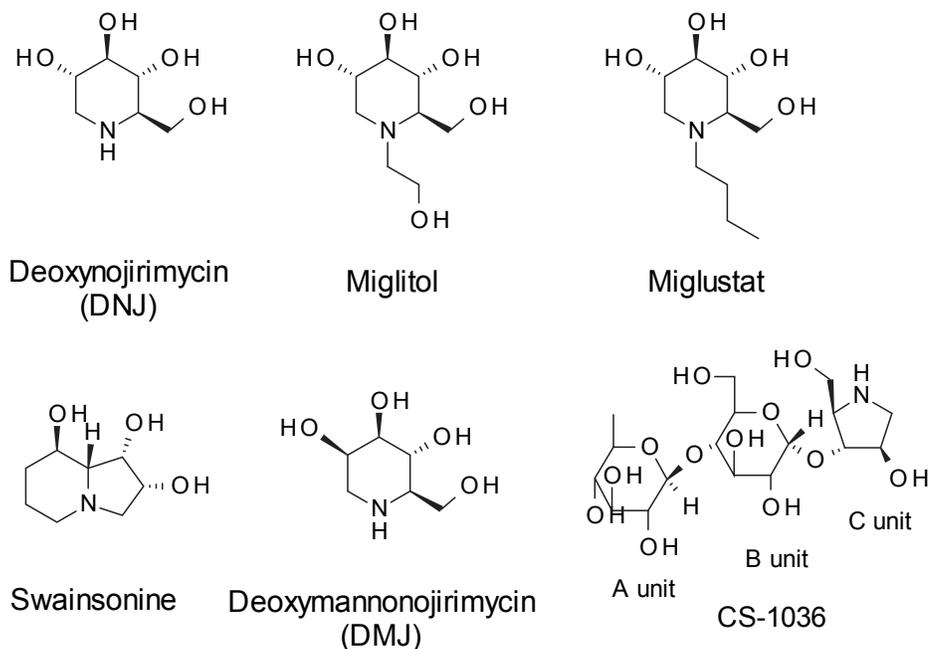


Figure 1-2 Structure of iminosugars.

1.1.3 ライソゾーム病治療薬

イミノ糖はライソゾーム内の加水分解酵素活性を阻害しうることが知られている。スフィンゴ糖脂質の分解は、ライソゾームで一連の加水分解により行われる。スフィンゴ糖脂質加水分解酵素の一つあるいは複数が遺伝的に欠損するとライソゾーム内に分解されない物質が蓄積し、ライソゾーム病になる。Miglustat (N-ブチル-DNJ) はDNJの誘導体であり、ライソゾーム病の一種であるゴーシェ病やニーマンピック病 C 型の治療薬として市販されている。Miglustat はスフィンゴ糖脂質のグルコシル化に関係しているグルコシルセラミド合成酵素 (グルコシルトランスフェラーゼ) を可逆的に阻害して問題の加水分解反応における基質の生成を抑制することで機能する (4, 10)。

1.1.4 N 結合型糖鎖プロセッシングの阻害

イミノ糖は糖蛋白質のプロセッシングも阻害しう。アスパラギン結合型糖蛋白質の糖鎖は、まず高マンノース糖鎖がアスパラギン残基に転移後、小胞体やゴルジ体で各種グリコシダーゼやトランスフェラーゼによりプロセッシングを受ける。これらのうち α -グルコシダーゼや α -マンノシダーゼなどの活性を阻害しうイミノ糖が知られている (4)。例えば、1979 年に *Swainsona canescens* から単離されたと報告されたスワインソニン (11) は、 α -マンノシダーゼ阻害活性を有し、従って N 型糖鎖のプロセッシングを阻害することが知られている (12)。なお、スワインソニンは糸状菌である *Rhizoctonia*

leguminicola や植物の diablo locoweed (*Astragalus oxyphysus*) 等も生産することが知られている (2, 12)。このようにイミノ糖によって特定の成熟した糖蛋白質の生成を防ぐことで、ウイルス感染 (13–15) やがん (4, 16) などの治療薬への応用が期待されている。

1.2 イミノ糖の生合成

1.2.1 スワインソニンの推定生合成経路

イミノ糖の生合成に関しては報告が少なく知見が乏しい。また、それらの報告の多くは安定同位体を用いた菌体レベルの解析にとどまっている。 α -マンノシダーゼ阻害活性を有するスワインソニンの生合成経路としては、Figure 1-3 に示すように lysine を出発物質とした pipercolic acid を経る経路が同位体添加実験により推定されている (17, 18)。

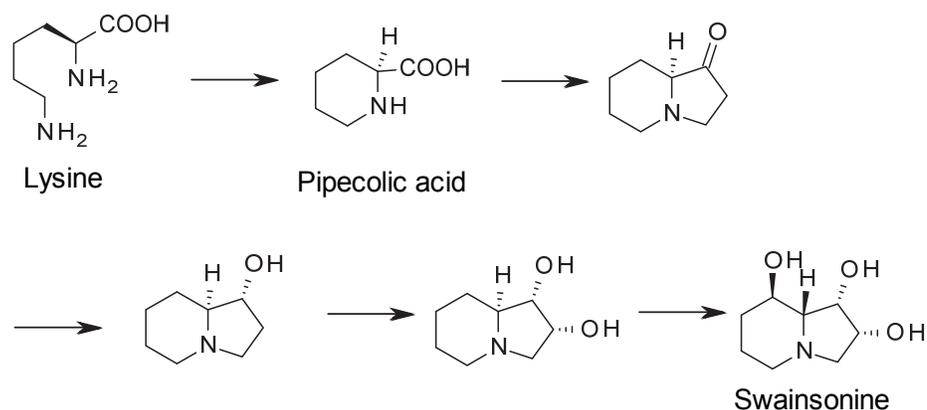


Figure 1-3 Proposed biosynthetic pathway for swainsonine in *R. leguminicola* based on stable isotope feeding experiments (17, 18).

1.2.2 デオキシノジリマイシンの推定生合成経路

イミノ糖類の中で生合成について最も調べられているのは DNJ である。1990 年代前半に Hardick らは同位体標識した glucose を *Bacillus atrophaeus* と *Streptomyces subrutilus* に添加して DNJ や 1-deoxymannojirimycin (DMJ) への同位体の濃縮を解析して、グルコースを中間体とする DNJ 及び DMJ の生合成経路を推定した (19–21)。また、Shibano らは、 $1\text{-}^{13}\text{C}$ glucose の添加実験によって *Commelia communis* (露草) の DNJ 生合成経路は *B. atrophaeus* や *S. subrutilus* の場合の C2/C6 環化反応とは異なり C1/C5 環化反応を経ると推定した (22)。最近になって、DNJ を産生する *Bacillus amyloliquefaciens* のゲノム DNA より *gabT1*, *yktC1*, *gutB1* の 3 つの遺伝子が大腸菌での共発現により DNJ 生合成遺伝子として同定され、それらは aminotransferase, phosphatase, dehydrogenase と推定された (23)。同様の遺伝子は、DNJ 生産株である *Bacillus subtilis* MORI 3K-85 のゲノムライブラリー

のスクリーニングによっても同定された (24)。これらの知見より推定された DNJ の生合成経路を Figure 1-4 に示した。

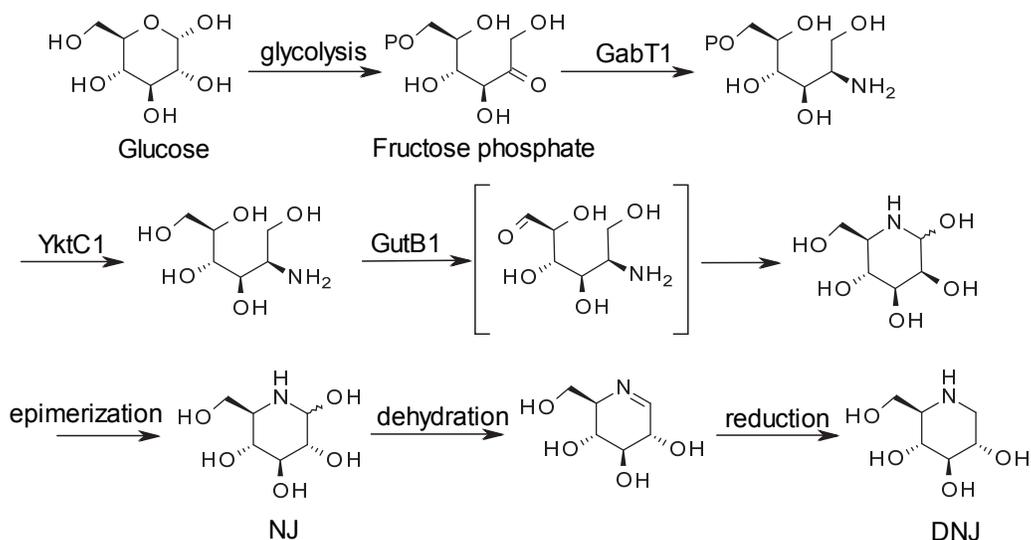


Figure 1-4 Proposed microbial biosynthetic pathway of DNJ based on stable isotope feeding experiments by Hardick et al (19–21) and putative biosynthetic genes identified by Clark et al (23).

1.3 Nectrisine

Nectrisine (Figure 1-5) は藤沢薬品工業 (現アステラス製薬) により 1988 年に報告された 5 員環を有するイミノ糖で (25, 26)、 α -、 β -グリコシダーゼ、 α -、 β -マンノシダーゼ阻害活性を示し (27)、糸状菌である *Nectria lucida* F-4490 により産生される (28)。また、当社 (当時、三共株式会社) においても 1991 年に自社の微生物ライブラリーより nectrisine 生産菌を見出した。Nectrisine は化学合成も研究されている。例えば D-arabinose や D-serine、butadiene monoepoxide (26, 29–32) を出発物質とした合成法が報告されている。

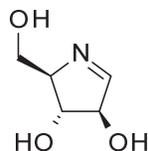


Figure 1-5 Structure of nectrisine.

1.4 Nectrisine の CS-1036 製法への応用

Nectrisine の構造は、上記で触れた CS-1036 の C ユニットと絶対配置が同じで類似していたため、nectrisine をその原料として利用できる可能性が考えられる。CS-1036 は、はじめに全合成法が確立されたが、イミノ糖である C ユニットの合成コストが高いことが課題となっていた。そこで、我々は醗酵生産による C ユニットの製造原価低減を企図した。さらなる菌株のスクリーニングによって糸状菌である *Thelonectria discophora* SANK 18292 株を nectrisine 高生産株として見出したが、工業的に本菌株を利用するにはその生産性は非常に低かった。

製造原価低減のためには、大量生産に適した微生物による nectrisine 生合成遺伝子を導入して生産する方法が魅力的と考えられたが、nectrisine の生合成遺伝子や生合成経路に関する情報は報告されていなかった (33)。

1.5 本論文の目的と概要

本論文では、糸状菌である *T. discophora* における nectrisine の生合成機構を解明し、製法構築へ知見を応用することを目的とした。

はじめに、第 2 章では、菌体レベルで生合成経路を解析した。

我々は DNJ に関する先行研究を踏まえて nectrisine の生合成中間体としてペントースを推測した。そして、D-キシロースと D-リボースの各種 ¹³C 同位体添加実験により、これらの基質は nectrisine の中間体であることを示した。また、菌体抽出液から 4-amino-4-deoxyarabinitol を単離、X 線結晶構造解析によりその構造を決定した。この化合物に菌体抽出液を反応させると nectrisine を生じたことから本化合物が nectrisine の前駆体であると示された。これらより、nectrisine の推定生合成経路を提案した。

第 3 章では、この反応を触媒する酵素 (NecC) を精製してその特性を解析した。

まず、NecC を菌体抽出液より精製した。次に、NecC のトリプシン消化物の LC-MS/MS 分析により、NecC の部分アミノ酸配列を推定した。データベース検索により NecC は oxidase と相同性を示した。また、NecC の補因子や会合状態などの物理化学的性質、活性の至適 pH や至適温度などの反応特性を解析した。

第 4 章では、生合成遺伝子の同定と機能検証を行った。

まず、推定された NecC の部分アミノ酸配列から設計した縮重プライマーを用いて遺伝子断片を増幅、クローニングし、さらに *T. discophora* のゲノムライブラリーをスクリーニングして遺伝子全長をクローニングした。次に、残りの生合成遺伝子を見つけるため、ゲノム上の *necC* 遺伝子座周辺の遺伝子の配列を解析した結果、aminotransferase と choline kinase に相同性を示す配列 (*necA* と *necB*) が見つかった。これらの遺伝子の機能を遺伝子破壊と相補、及び大腸菌による発現で検証し、これらが nectrisine 生合成遺伝子であることを示した。以上より、アミノ化、脱リン酸化、酸化の各反応を含む nectrisine 推定生合成経路を提案した。また、これらの遺伝子の発現が大腸菌での共発現により

nectrisine が生産できることを示した。これにより異種発現による nectrisine 生産の基盤を構築できた。本研究の結果得られた nectrisine 生合成の概要を Figure 1-6 に示した。

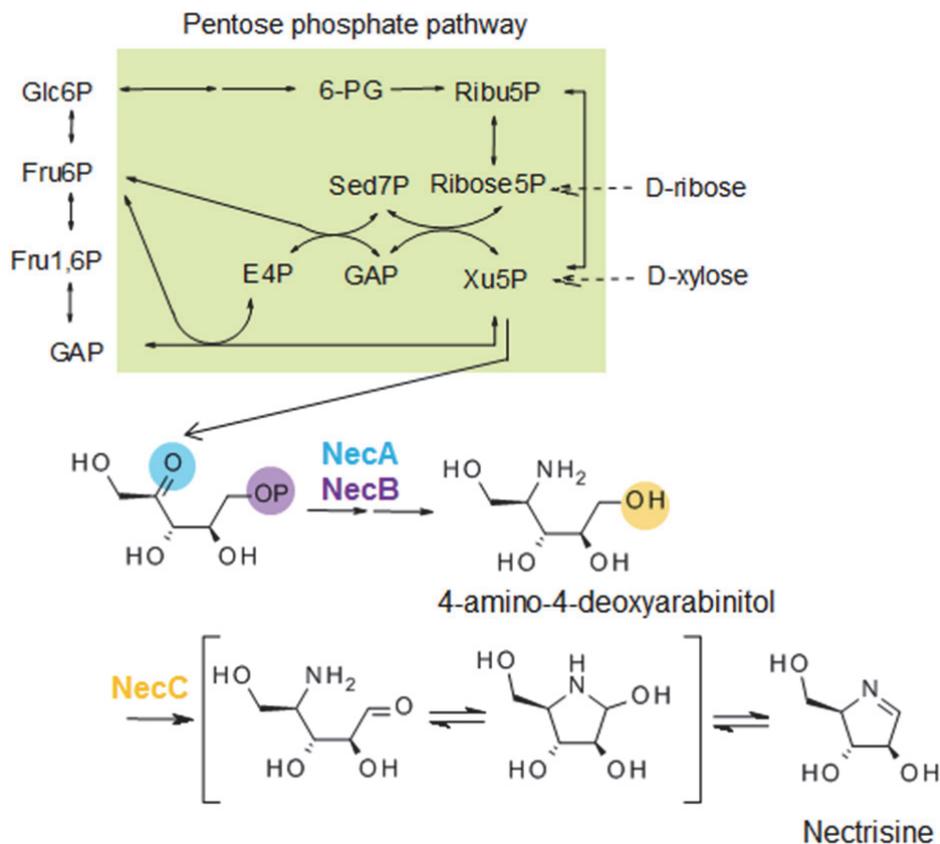


Figure 1-6 Summary of this study modified from (33).

1.6 引用文献

1. **Compain P, Martin OR.** 2007. Iminosugars: from synthesis to therapeutic applications. John Wiley & Sons. Wiley, Hoboken, NJ.
2. **Horne G, Wilson FX, Tinsley J, Williams DH, Storer R.** 2011. Iminosugars past, present and future: medicines for tomorrow. *Drug Discov Today* **16**:107–118.
3. **Nash RJ, Kato A, Yu C-Y, Fleet GW.** 2011. Iminosugars as therapeutic agents: recent advances and promising trends. *Future Med Chem* **3**:1513–1521.
4. **Winchester BG.** 2009. Iminosugars: from botanical curiosities to licensed drugs. *Tetrahedron: Asymmetry* **20**:645–651.
5. **Zechel DL, Withers SG.** 2000. Glycosidase mechanisms: anatomy of a finely tuned

-
- catalyst. *Acc Chem Res* **33**:11–18.
6. **Asano N.** 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* **13**:93R–104R.
 7. **Inouye S, Tsuruoka T, Nida T.** 1966. The structure of nojirimycin, a piperidinose sugar antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)* **19**:288–92.
 8. **Honda T, Okuno A, Izumi M, Li X.** 2004. オリゴ糖誘導体. WO 2004067542 A1.
 9. **Honda T, Izumi M.** 2006. 複素環を有するオリゴ糖誘導体. WO 2006011561 A1.
 10. **Trapero A, Llebaria A.** 2013. Glucocerebrosidase inhibitors for the treatment of Gaucher disease. *Future Med Chem* **5**:573–590.
 11. **Colegate S, Dorling P, Huxtable C.** 1979. A spectroscopic investigation of swainsonine: An α -mannosidase inhibitor isolated from *swainsona canescens*. *Aust J Chem* **32**:2257–2264.
 12. **Elbein AD, Solf R, Dorling PR, Vosbeck K.** 1981. Swainsonine: An inhibitor of glycoprotein processing. *Proc Natl Acad Sci USA* **78**:7393–7397.
 13. **Kaptein SJ, Neyts J.** 2016. Towards antiviral therapies for treating dengue virus infections. *Curr Opin Pharmacol* **30**:1–7.
 14. **Scanlan CN, Offer J, Zitzmann N, Dwek RA.** 2007. Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature* **446**:1038–1045.
 15. **Makhluf H, Kim K, Shresta S.** 2016. Novel strategies for discovering inhibitors of Dengue and Zika fever. *Expert Opin Drug Discov* **0441**:17460441.2016.1212013.
 16. **Wrodnigg TM, Steiner AJ, Ueberbacher BJ.** 2008. Natural and synthetic iminosugars as carbohydrate processing enzyme inhibitors for cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **8**:77–85.
 17. **Schneider MJ, Ungemach FS, Broquist HP, Harris TM.** 1982. Biosynthesis of swainsonine in *Rhizoctonia leguminicola*. Epimerization at the ring fusion. *J Am Chem Soc* **4**:6863–6864.
 18. **Harris CM, Cambell BC, Molyneux RJ, Harris TM.** 1988. Biosynthesis of swainsonine in the diablo locoweed (*Astragalus oxyphysus*). *Tetrahedron Lett* **29**:4815–4818.
 19. **Hardick DJ, Hutchinson DW, Trew SJ, Wellington EMH.** 1991. The biosynthesis
-

-
- of deoxynojirimycin and deoxymannonojirimycin in *Streptomyces subbrutilus*. J Chem Soc Chem Commun 729–730.
20. **Hardick DJ, Hutchinson DW, Trew SJ, Wellington EMH.** 1992. Glucose is a precursor of 1-deoxynojirimycin and 1-deoxymannonojirimycin in *Streptomyces subbrutilus*. Tetrahedron **48**:6285–6296.
 21. **Hardick DJ, Hutchinson DW.** 1993. The biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Bacillus subtilis var niger*. Tetrahedron **49**:6707–6716.
 22. **Shibano M, Fujimoto Y, Kushino K, Kusano G, Baba K.** 2004. Biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Commelina communis*: a difference between the microorganisms and plants. Phytochemistry **65**:2661–2665.
 23. **Clark LF, Johnson J V, Horenstein NA.** 2011. Identification of a gene cluster that initiates azasugar biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*. Chembiochem **12**:2147–2150.
 24. **Kang KD, Cho YS, Song JH, Park YS, Lee JY, Hwang KY, Rhee SK, Chung JH, Kwon O, Seong S-I.** 2011. Identification of the genes involved in 1-deoxynojirimycin synthesis in *Bacillus subtilis* MORI 3K-85. J Microbiol **49**:431–440.
 25. **Kayakiri H, Takase S, Setoi H, Uchida I, Terano H, Hashimoto M.** 1988. Structure of FR 900483, a new immunomodulator isolated from a fungus. Tetrahedron Lett **29**:1725–1728.
 26. **Kayakiri H, Nakamura K, Takase S, Setoi H, Uchida I, Terano H, Hashimoto M, Tada T, Koda S.** 1991. Structure and synthesis of nectrisine, a new immunomodulator isolated from a fungus. Chem Pharm Bull **39**:2807–2812.
 27. **Tsujii E, Muroi M, Shiragami N, Takatsuki A.** 1996. Nectrisine is a potent inhibitor of alpha-glucosidases, demonstrating activities similarly at enzyme and cellular levels. Biochem Biophys Res Commun **220**:459–466.
 28. **Shibata T, Nakayama O, Tsurumi Y, Okuhara M, Terano H, Kohsaka M.** 1988. A new immunomodulator, FR-900483. J Antibiot (Tokyo) **41**:296–301.
 29. **Bosco M, Bisseret P, Bouix-Peter C, Eustache J.** 2001. A new concise synthesis of nectrisine and its facile conversion to phosphonoazasugars. Tetrahedron Lett **42**:7949–7952.

-
30. **Ribes C, Falomir E, Carda M, Marco JA.** 2008. Short, stereoselective synthesis of the naturally occurring pyrrolidine radicamine B and a formal synthesis of nectrisine. *J Org Chem* **73**:7779–7782.
 31. **Hulme AN, Montgomery CH.** 2003. Stereoselective synthesis of the α -glucosidase inhibitor nectrisine. *Tetrahedron Lett* **44**:7649–7653.
 32. **Soriano S, Azzouz M, Llaveria J, Marcé P, Matheu MI, Díaz Y, Castellón S.** 2016. Enantioselective formal synthesis of nectrisine using a palladium-catalyzed asymmetric allylic amination and cross-metathesis as key steps. *J Org Chem* **81**:5217–5221.
 33. **Miyauchi R, Shiba Y.** 2017. Elucidation of nectrisine biosynthesis pathway in a fungus. *Kagaku to seibutsu*, in press.

2. *Thelonectria discophora* SANK 18292 における nectrisine の生合成経路の解析

2.1 緒言

Nectrisine (Figure 2-1) はイミノ *Thelonectria* 糖の一種で、糸状菌の *Nectria lucida* F-4490 が産生する化合物である FR-900483 としても知られている (1)。なお、*Nectria lucida* は Chaverri et al. によって *Thelonectria lucida* と同意として扱われている (2)。Nectrisine は α -glucosidase、 α - and β -mannosidases、 α -N-acetylglucosaminidase の阻害活性を有する (3)。

Nectrisine の化学合成は D-arabinose や D-serine などのキラル化合物を出発物質とした方法が知られている (4-7)。Nectrisine の微生物による生産は、*T. lucida* F-4490 を用いた例が知られているが、我々のスクリーニングによって、*N. mammoidea*/*N. veuillotiana* group と *Cylindrocarpon* group 2 (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) に属する (2) *Thelonectria discophora* SANK 18292 (JCM 30947) も nectrisine を生産することを見出した。*Thelonectria* 属は最近枯れたまたは枯れつつある樹皮に見られる (2, 8)。この菌を nectrisine の工業生産に利用する場合は、菌株改良による nectrisine 生産量の増大や堅牢性の高い大量培養や大量精製プロセスの構築が必須である。Nectrisine の生合成経路の情報は、これらを行う上で有用であり、さらには生合成遺伝子を同定して、異種発現系を構築する上でも重要と考えられるが、その情報は報告されていなかった。

そこで本研究では、まず、*T. discophora* SANK 18292 における生合成経路を解明するため、 ^{13}C 同位体標識した基質の nectrisine への取り込みを解析した。また、新規な化合物 **2** (Figure 2-1) を菌体抽出液から単離し、X 線結晶構造解析によりこの化合物が 4-amino-4-deoxyarabinitol であることを示した。そして、この化合物と粗酵素液との反応により本化合物が nectrisine の前駆体であることを示した。最後に、得られた知見を踏まえて nectrisine の推定生合成経路を提唱した。

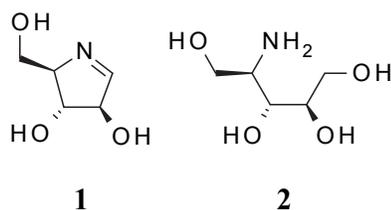


Figure 2-1 Structures of nectrisine (1) and 4-amino-4-deoxyarabinitol (2).

2.2 実験方法と結果

2.2.1 菌株の同定

糸状菌である SANK 18292 は、円筒状の分生子で、知られている *Thelonectria discophora* と同様の形態であった (2, 8)。

また、SANK 18292のリボソームDNA中の内部転写スペーサー (Internal Transcribed Spacer、ITS) 配列をITS1-F (9) とITS4 (10) プライマーを用いてpolymerase Chain Reaction (PCR) で増幅、配列を決定した。決定した配列はDDBJ/EMBL/GenBankデータベースにアクセッション番号LC020017として登録した。*Thelonectria discophora* SANK 18292のITS領域の配列は、DDBJ/EMBL/GenBankデータベースのBLAST検索 (11) で見出された*Thelonectria discophora* AR4499 (HM364296) の5.8 S rDNA-ITS領域の配列と99.1%相同であった。99%以上であれば同一種であると判断するのが妥当であるので (12, 13)、SANK 18292が*Thelonectria discophora*であると同定された。そして、*T. discophora* SANK 18292は、理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (茨城県つくば市) にアクセッション番号JCM 30947として登録された。

2.2.2 中間体候補物質の探索

イミノ糖である deoxynojirimycin (7) は6員環構造を有する天然物で、Figure 2-2 に示すようにグルコースが初期生合成中間体として提案されている (14)。これより、5員環で、炭素原子を5つ有する nectrisine の初期生合成中間体としてペントース類を推測した。

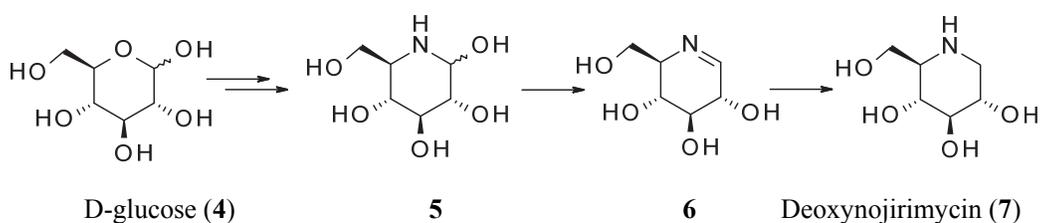


Figure 2-2 Biosynthesis of deoxynojirimycin (7) (14–17).

そこで、nectrisine の生合成中間体を同定する上で手がかりを得るため、まず、D-xylulose (8)、D-xylose (9)、L-xylose (10)、xylitol (11)、D-arabinose (12)、L-arabinose (13)、D-ribose (14) (Figure 2-3) を培地にそれぞれ単独に添加して培養し、各物質の消費量と nectrisine 生産量を調べることにした。

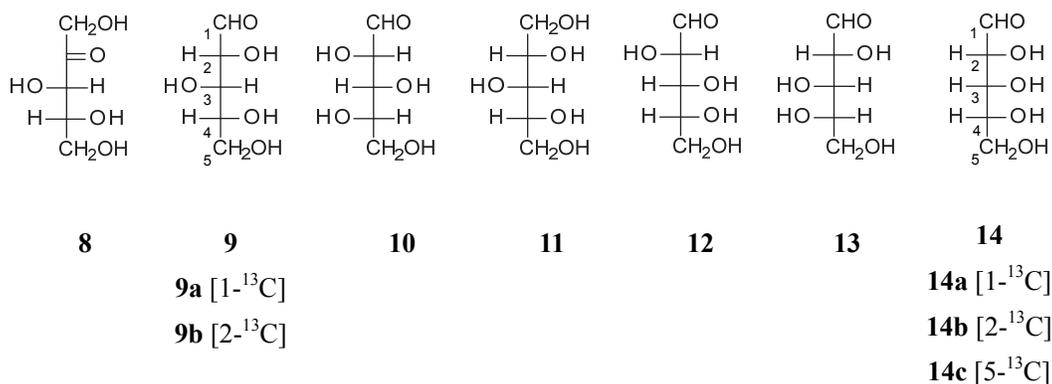


Figure 2-3 Structures of D-xylulose (**8**), D-xylose (**9**), L-xylose (**10**), xylitol (**11**), D-arabinose (**12**), L-arabinose (**13**), D-ribose (**14**), [1-¹³C] D-ribose (**14a**), [2-¹³C] D-ribose (**14b**), [5-¹³C] D-ribose (**14c**), [1-¹³C] D-xylose (**9a**), and [2-¹³C] D-xylose (**9b**).

2.2.2.1 *T. discophora* の培養

Potato Dextrose Agar (PDA、和光純薬) スラントに生育した *T. discophora* SANK 18292 より胞子を回収した。A-1 培地 (3% (v/v) glycerol, 2% (w/v) soluble starch, 3% (w/v) glucose, 0.25% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) soybean meal, 0.25% (w/v) gelatin, 0.25% (w/v) NH₄NO₃) を 100 mL 三角フラスコに 20 mL 入れて綿栓し、オートクレーブで 30 分間滅菌後、この胞子懸濁液を添加し、23°C、210 rpm で 5 日間培養した。この培養液に等量の 20% glycerol 水溶液を加え、混合後、分注して-80°C で保存し、シード液とした。A-1 培地にこのシード液を 1%加え、23°C、210 rpm で 5 日間、前培養した。

次に、D-xylulose (**8**)、D-xylose (**9**)、L-xylose (**10**)、xylitol (**11**)、D-arabinose (**12**)、L-arabinose (**13**)、D-ribose (**14**) を個別に純水に溶かし 0.22 μm Millex フィルター (Merck Millipore) で濾過滅菌し、それぞれ別々に 20 mL の Glycerol-Yeast (GY) 培地 (5% glycerol and 1.75 % Bacto yeast extract) に終濃度 1 g/L になるように加えた。そして前培養液を 1% (v/v) 加え、23°C、210 rpm で 7 日間培養した。

2.2.2.2 化合物の分析

Nectrisine は UV 吸収がないため、誘導体化してから high performance liquid chromatography (HPLC) で検出・定量した。菌体抽出液 (0.1 mL) に用時調製した NaBH₄ 水溶液 (1 mg/mL) 50 μL を加え 5 min 以上放置して還元した。そして 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) (18, 19) 溶液 (2 mg/mL-MeOH) 0.3 mL を加え攪拌後、100 mM ホウ酸 pH 8.2 を 50 μL 加えて nectrisine を 7-nitrobenzofurazan (NBD) で標識し、Unison UK-C18 カラム、4.6×75 mm (Imtakt) を装備した LC2010CHT HPLC システム (島津製作所) で分析した。条件は、溶離液 A : 10 mM NH₄CO₂H, 2.2 mM HCO₂H in

H₂O、溶離液 B : 2.2 mM HCO₂H in CH₃CN、グラジエント B : 10→90% in 10 min、流量 : 1.2 mL / min、カラムオープンの温度 : 30°C、検出波長 500 nm とした。

糖類は示差屈折率検出器 RID-10A (島津製作所) と Wakopak WB-T-130E カラム (和光純薬) を接続した LC-10A HPLC システムで定量した。条件は、溶離液 : 純水、流量 : 0.6 mL/min、カラムオープンの温度 : 65°C とした。

2.2.2.3 糖類の消費量と nectrisine 生産量の評価

D-arabinose (12) は培養により減少しなかったため、この菌は D-arabinose を資化し難いと示唆された (Table 2-1)。また、D-arabinose (12) 以外の中間体候補物質は、いずれも培養により消費され、特に D-xylose (9)、次いで L-arabinose (13) が顕著に消費された。これは、*T. discophora* における D-xylose (9) と L-arabinose (13) の異化経路が同じ経路上にあるためと推測された。一般に、糸状菌において、D-xylose (9) は xylitol (11) を経て D-xylulose (8) へ変換され、L-arabinose (13) は L-arabinitol、L-xylulose、xylitol (11) を経て D-xylulose (8) へ変換されるため (Figure 2-4) (20, 21)、D-xylose (9) と L-arabinose (13) の異化経路は xylitol (11) で合流して、D-xylulose 5-phosphate (3) へ導かれることとなる。

Nectrisine の生産量は、D-ribose を添加した場合、コントロールの 1.6 倍になり、その他の物質を添加した場合はコントロールとほぼ同等かわずかに減少した。

これらの知見より、D-xylose (9) と L-arabinose (13)、D-ribose (14) を中間体候補物質と考えた。ここで、D-xylose (9) と L-arabinose (13) の異化経路が同じ経路上にあることと、D-xylose が L-arabinose よりも消費されたことから、次の ¹³C 同位体添加実験で用いる物質として D-xylose と D-ribose を選抜した。

Table 2-1 Consumption of sugar and sugar-alcohol additives and nectrisine production by *T. discophora*

Additive	Concentration		
	Additive at Day 0 (mg L ⁻¹)	Additive at Day 7 (mg L ⁻¹)	Nectrisine at Day 7 (mg L ⁻¹)
Control	-	-	49±3
D-Xylulose (8)	813	440±11	46±9
D-Xylose (9)	1064	0±0	48±3
L-Xylose (10)	1026	822±38	46±4
Xylitol (11)	760	639±24	44±1
D-Arabinose (12)	864	903±31	49±4
L-Arabinose (13)	915	217±190	37±8
D-Ribose (14)	1132	876±55	79±2

Experiments were conducted in triplicate. Data are presented as means ± standard deviations.

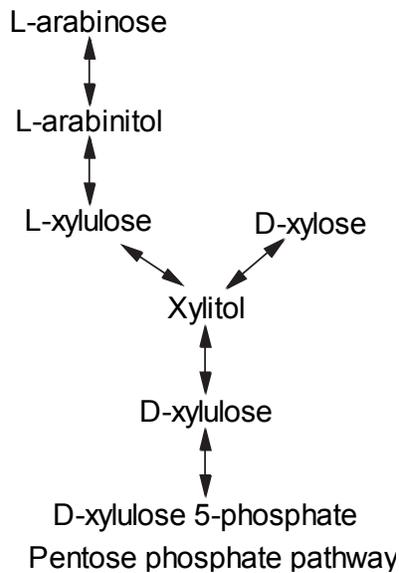


Figure 2-4 L-arabinose and D-xylose catabolism in fungi.

2.2.3 ¹³C 標識した D-ribose と D-xylose の添加実験

D-ribose と D-xylose の同位体添加実験では、¹³C 標識した D-ribose 3 種 ([1-¹³C] D-ribose (14a)、[2-¹³C] D-ribose (14b)、[5-¹³C] D-ribose (14c)) と ¹³C 標識した D-xylose 2 種 ([1-¹³C] D-xylose (9a)、[2-¹³C] D-xylose (9b)) (Figure 2-3) を使用した。400 mg の[1-¹³C] D-ribose (14a)、[2-¹³C] D-ribose (14b)、[5-¹³C] D-ribose (14c)、[1-¹³C] D-xylose (9a)、[2-¹³C] D-xylose (9b) (Cambridge Isotope Laboratories) を個別に純水に溶かし 0.22 μm Millex フィルターで濾過滅菌し、それぞれ別々に 2 L 容の三角フラスコに入れた 400 mL の Czapek-Dox 培地 (3% (w/v) sucrose、0.2% (w/v) NaNO₃、0.1% (w/v) K₂HPO₄、0.005% (w/v) MgSO₄·7 H₂O、0.05% (w/v) KCl、0.001% (w/v) FeSO₄·7 H₂O、pH 6.0) に加えた。そして前培養液を 1% (v/v) 加え、23°C、210 rpm で 6 日間培養した。

回収した培養液 (1.2 L) にセライトを加え濾過後、代謝物を抽出するため、得られた菌体に純水を 2 mL/(g-菌体) 加え凍結融解した。そして 60°C で 10 分間攪拌した後ろ過し、ろ液を回収した。再び菌体に前回と同量の純水を加え、60°C で 10 分間攪拌した後ろ過し、ろ液を回収した。これらのろ液を pH 6.0 に調整後、NH₄⁺が吸着した陽イオン交換樹脂 SK110 (三菱化学) 100 mL が充填されたカラムに添加した。純水で洗浄後、0.2 M アンモニア水溶液で樹脂から溶出させた。nectrisine を多く含むフラクションを減圧濃縮後凍結乾燥し、nectrisine を 31-35 mg 得た。

生産された nectrisine のエレクトロスプレーイオン化 (ESI) -TOFMS スペクトルを JMS-T100LC spectrometer (JEOL) を用いて、正イオンモードで取得した。生産された nectrisine の ¹³C 同位体存在率は ¹³C D-ribose 類を添加した場合 5-6%、¹³C D-xylose 類を添加した場合 12-16%で、自然界の ¹³C 同位体存在率である 1.1%より顕著に高かった (Table 2-2)。これより D-xylose (9) と D-ribose (14) は nectrisine の生合成中間体であることが示された。

Table 2-2 Incorporation of ¹³C-labeled precursors into nectrisine (1) determined with mass spectrometry

Precursors	Relative intensity of [M+H+1] signal (%) ^a	Abundance of ¹³ C (%) ^b
[1- ¹³ C] D-ribose (14a)	28	5.6
[2- ¹³ C] D-ribose (14b)	26	5.2
[5- ¹³ C] D-ribose (14c)	23	4.6
[1- ¹³ C] D-xylose (9a)	58	11.5
[2- ¹³ C] D-xylose (9b)	78	15.6

^a Relative to the intensity of [M+H]=100.

^b Natural abundance of ¹³C is 1.1%

次に、nectrisine のどの炭素に同位体を取り込まれたかを ^{13}C NMR で評価した。サンプルは D_2O に溶解させ、Avance III 500 MHz spectrometer (Bruker) を用いて ^{13}C NMR スペクトルを 500 MHz で取得した。Nectrisine の ^{13}C NMR シグナルの帰属は引用文献 (4, 22) に従った。[1- ^{13}C] D-ribose (**14a**) を添加すると ^{13}C が nectrisine の C-6 (δ 61.4) C-2 (δ 77.0) に最も低いシグナルに対して 5.9 倍、2.5 倍濃縮された (Table 2-3, Figure 2-5)。[2- ^{13}C] D-ribose (**14b**) を添加すると ^{13}C が nectrisine の C-2 と C-6 に 7.3 倍、4.4 倍濃縮された。[5- ^{13}C] D-ribose (**14c**) を添加すると ^{13}C が nectrisine の C-5 (δ 170.7) のみに 9.5 倍濃縮され、他の炭素には濃縮が見られなかった。[1- ^{13}C] D-xylose (**9a**) と [2- ^{13}C] D-xylose (**9b**) による nectrisine の ^{13}C 標識パターンは、[1- ^{13}C] D-ribose (**14a**) と [2- ^{13}C] D-ribose (**14b**) による ^{13}C 標識パターンとそれぞれ同様であった。これらより、D-ribose (**14**) または D-xylose (**9**) の C-1 から C-5 は nectrisine の C-6、C-2、C-3、C-4、C-5 にそれぞれ相当することが示唆された。

Nectrisine への同位体濃縮率は、 ^{13}C D-xylose からの方が ^{13}C D-ribose からより高かった。これは、未標識のこれらの基質を添加した際に、この菌が前者の方をより資化したことと一致している。ただし、未標識体の添加実験では栄養豊富な培地を用い、同位体添加実験では最小培地を用いたという違いがある点には留意すべきであろう。また、D-ribose (**14**) は核酸合成などのより大きな別の用途に使用されたために、nectrisine への同位体の濃縮が D-xylose の場合より低くなったとも考えられる。このことは、D-ribose (**14**) を培地に添加すると nectrisine 生産量が増加するとともに菌体量の増加がみられたことと矛盾しない。

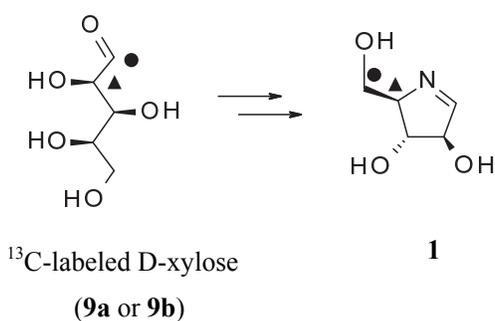
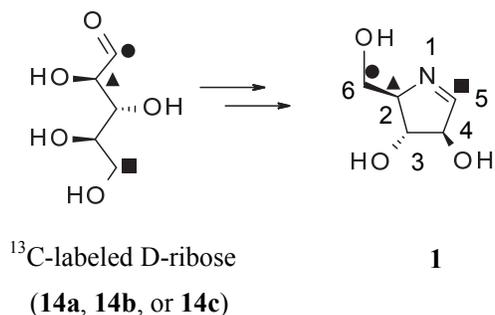


Figure 2-5 Isotopically enriched carbons of nectrisine (**1**) from [1-¹³C] D-ribose (**14a**), [2-¹³C] D-ribose (**14b**), [5-¹³C] D-ribose (**14c**), [1-¹³C] D-xylose (**9a**), or [2-¹³C] D-xylose (**9b**), representing.

Circles, triangles, and squares indicate predominantly labeled carbons. Circles are derived from **14a** or **9a**. Triangles are derived from **14b** or **9b**. Squares are derived from **14c**.

Table 2-3 Carbon-13 NMR chemical shifts and enrichment ratio of nectrisine (**1**) biosynthesized from ¹³C-labeled precursors

Carbon No. ^a	Chemical shift (ppm)	Relative ¹³ C enrichment ratio ^b				
		D-Ribose			D-xylose	
		[1- ¹³ C]	[2- ¹³ C]	[5- ¹³ C]	[1- ¹³ C]	[2- ¹³ C]
5	170.7	1.4	1.0	9.5	2.8	1.0
4	83.6	1.0	1.4	1.2	1.0	1.9
3	78.5	1.3	1.5	1.0	1.5	1.1
2	77.0	2.5	7.3	1.0	4.3	12.0
6	61.4	5.9	4.4	1.2	22.0	6.7

^a The numbering of **1** is described in Figure 2-5.

^b The lowest signal of each carbon was normalized to 1.

2.2.4 4-amino-4-deoxyarabinitol の X 線単結晶構造解析

2.2.4.1 *T. discophora* の培養と 4-amino-4-deoxyarabinitol の精製

T. discophora の前培養液を 15 L の培地 (8% (v/v) glycerol, 2.6% (w/v) Bacto yeast extract, 0.2% CaCO₃ (w/v)) に植菌し 30 L 容醗酵槽を用いて培養した。セライトを適量添加してろ過後、湿菌体重量の 4 倍量の 60°C の水道水にろ過した菌体を投入し、50°C で 1 h 攪拌することで代謝産物を抽出した。そして室温まで直ちに冷却後濾過した。ろ液 2 L を pH 6.0 に調整し、SK110 陽イオン交換樹脂 300 mL を充填したカラムに空間速度 3 h で加えた。樹脂量の 3 倍量の脱イオン水を用いてカラムを洗浄後 0.8 M アンモニア水により溶出させた。溶出液を減圧濃縮後凍結乾燥した。1.61 g の凍結乾燥品を 2 mL の水に溶解し、Silica gel 60 (メルク) 30 g を充填したカラムに添加した。展開溶媒として MeOH : 水 : トリエチルアミン (6 : 4 : 0.1) の溶液を用いた。本展開溶媒による Thin layer chromatography (TLC) で Rate of flow (Rf) 値が 0.23 付近にスポットが現れた画分を減圧濃縮して乾固し 125.3 mg のオイル状の茶褐色の物質 **2** を得た。**2**: [α]_D²⁰: -1.16 (c 1.04, H₂O)、IR (ATR) ν_{\max} : 3277, 2927, 2881, 1623, 1395, 1334, 1029 cm⁻¹、HRESI-TOFMS (正イオンモード) m/z : 152.0926 [M + H]⁺ (C₅H₁₄NO₄ の計算値: 152.0923)。ここで、IR スペクトルは FT/IR-6100 (JASCO) で取得した。20°C での旋光度は Autopol V Plus polarimeter (Rudolph Research Analytical) で取得した。セル長は 10 cm であった。

化合物 **2** の分子式は HRMS スペクトルと元素分析より C₅H₁₃NO₄ と決定された。また、本化合物の ¹H NMR と ¹³C NMR の各スペクトルのピークの帰属と HMBC スペクトルの相関を Table 2-4 に示した。化合物 **2** は DEPT スペクトルより 2 つのメチレン (δ 61.6, 62.4) と 3 つのメチン (δ 52.8, 70.3, 70.4) を含み、HMBC と DQF-COSY スペクトルから化合物 **2** が 4-amino-4-deoxyarabinitol であることが示された。

Table 2-4 ¹H and ¹³C NMR spectroscopic data (500 and 125 MHz, D₂O) for aminoalcohol (**2**)
Chemical shifts are in ppm relative to TMS

Position ^a	δ C, Type	δ H (J in Hz)	HMBC correlation (from H to C)
1a	61.6, CH ₂	3.64, dd (11.6, 6.8)	2, 3
1b		3.83, dd (11.6, 3.9)	2, 3
2	52.8, CH	3.07, ddd (7.1, 7.1, 4.0)	1, 3, 4
3	70.4, CH	3.61, dd (7.2, 2.7)	1, 2, 5
4	70.3, CH	3.86, ddd (7.0, 5.2, 2.8)	2, 5
5a	62.4, CH ₂	3.66, dd (11.6, 6.9)	3, 4
5b		3.68, dd (11.6, 5.2)	3, 4

^a The numbering of **2** is described in Figure 2-8.

2.2.4.2 X線単結晶構造解析

等モルの 4-amino-4-deoxyarabinitol とシュウ酸を含む EtOH-H₂O (20:80, v/v) 溶液から 4-amino-4-deoxyarabinitol シュウ酸塩 (**2**) (C₇H₁₅NO₈) の結晶を得た。X 線回折実験は X 線構造解析装置 R-AXIS RAPID (Rigaku) で、グラフィートモノクロメーターで取り出した Cu-K α 線を用いて行った。格子定数は a = 5.6890 (2) Å, b = 6.6505 (3) Å, c = 26.0888 (9) Å, V = 987.06 (6) Å³ で、斜方晶と一致し、空間群は P2₁2₁2₁ であった (Table 2-5)。詳細な結晶データは Cambridge Crystallographic data Centre (CCDC) のデータベースに番号 1017089-1017090 として登録した (<http://www.ccdc.cam.ac.uk/conts/retrieving.html>、または CCDC、12 Union Road、Cambridge CB2 1EZ、UK; Fax: +44 1223 336033; E-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk)。

Table 2-5 X-ray crystallographic analysis for oxalate derivative of **2**

Empirical formula	C ₇ H ₁₅ NO ₈
Formula weight	241.20
Crystal system	Orthorhombic
Lattice type	Primitive
Lattice parameters	a = 5.6890(2) Å
	b = 6.6505(3) Å
	c = 26.0888(9) Å
	V = 987.06(6) Å ³
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Z value	4
Linear absorption coefficient (μ , for CuK α)	13.197 cm ⁻¹
No. observations (All reflections)	1782
No. variables	152
Residuals: R1 ^a (I > 2.00 σ (I))	0.0417
Residuals: wR2 ^b (All reflections)	0.1286
Goodness of fit indicator	1.143
Flack parameter (Friedel pairs = 700)	-0.0(5)
Max shift/error in final cycle	0

^a $R1 = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$

^b $wR2 = [\frac{\sum (w (F_o^2 - F_c^2)^2)}{\sum w (F_o^2)^2}]^{1/2}$, where w is least squares weights.

化合物 **2** はシュウ酸塩として結晶化できた。X線による結晶構造解析により、その相対配置が 4-amino-4-deoxyarabinitol であることが示された (Figure 2-6)。なお、Flack parameter (23) は-0.0 (5) であったため、化合物 **2** の絶対配置は決定できなかった。

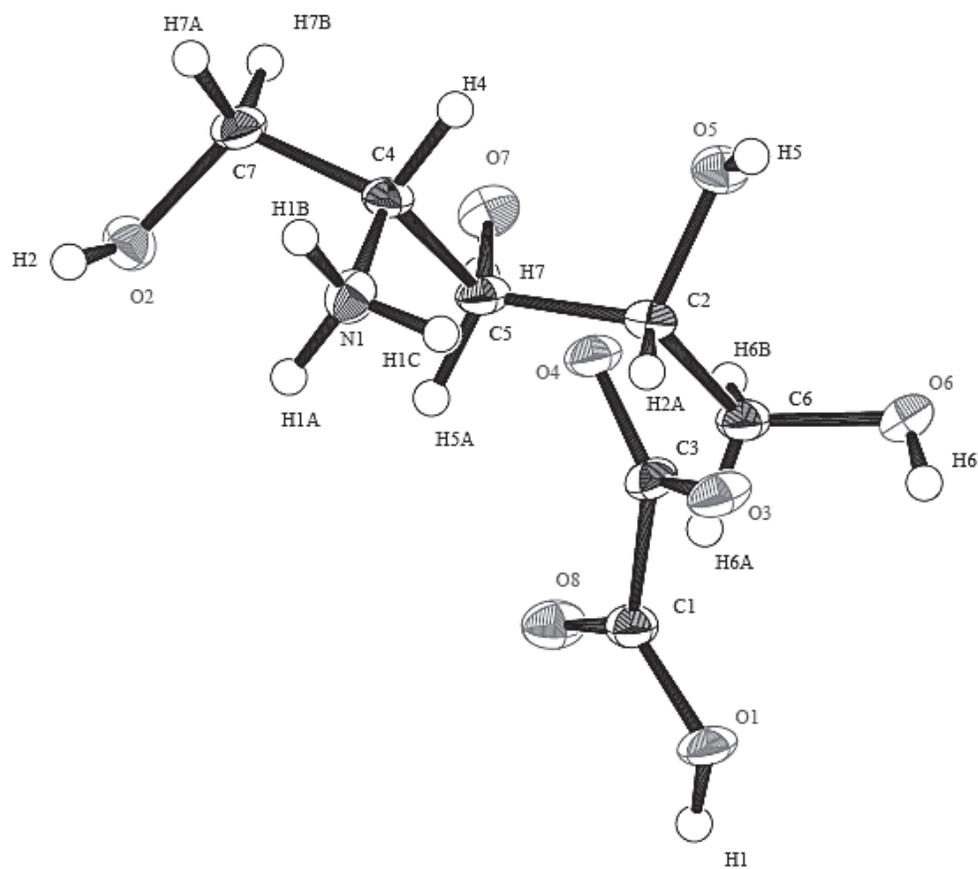


Figure 2-6 X-ray ORTEP drawing of oxalate derivative of **2**.

2.2.5 菌体抽出液による 4-amino-4-deoxyarabinitol の nectrisine への変換

4-amino-4-deoxyarabinitol (2) と nectrisine (1) は、7 日間培養した菌体の抽出液中に、典型的には 4 : 6 から 5 : 5 の割合で存在しているが、この抽出液を室温で放置すると、4-amino-4-deoxyarabinitol が減少するとともに nectrisine が増加した。この変換を確認するため、精製した 4-amino-4-deoxyarabinitol と菌体抽出液を混合して反応が進行するか調べた。

2.2.5.1 菌体抽出液の調製

7 日間培養した *T. discophora* 培養液を 0.9% NaCl 水溶液で洗浄後、-80°C で凍結し、乳鉢と乳棒を用いてすりつぶした。これを 50 mM NH₄OAc、pH 7.0 に溶解させた。この上清から低分子化合物を除くため、Amicon ultra フィルターユニット (10 kDa カット、ミリポア) と 50 mM NH₄OAc、pH 7.0 で洗浄、濃縮し、菌体抽出液とした。

2.2.5.2 ELSD-HPLC

Nectrisine や 4-amino-4-deoxyarabinitol を直接検出するため、Evaporative light scattering detection (ELSD)-HPLC を ELSD 検出器モデル 300S (SofTA) と Atlantis silica HILIC カラム、4.6x150 mm、3 μm (Waters) を接続した Agilent 1100 HPLC システム (Agilent Technologies) を用いて行った (24)。条件は、溶離液 A : CH₃CN、溶離液 B : 100 mM NH₄OAc in H₂O、B 濃度 : 12% for 50 min、流量 : 1 mL/min、カラムオープンの温度 : 30°C、スプレーチャンバー : 50°C、ドリフトチューブ : 60°C とした。

2.2.5.3 菌体抽出液による 4-amino-4-deoxyarabinitol の nectrisine への変換

この菌体抽出液を 4-amino-4-deoxyarabinitol 水溶液へ添加したところ、nectrisine が増加し、4-amino-4-deoxyarabinitol が減少した。一方、4-amino-4-deoxyarabinitol を glycine-HCl pH 3.0、リン酸 pH 7.5、glycine-NaOH pH 10.0 の各バッファー中で室温で置いた場合は、少なくとも 3 日間は 4-amino-4-deoxyarabinitol の濃度は変化せず、nectrisine は生成しなかった。これより、4-amino-4-deoxyarabinitol は抽出液中に存在する酵素の働きにより nectrisine へ変換されることが推測された。

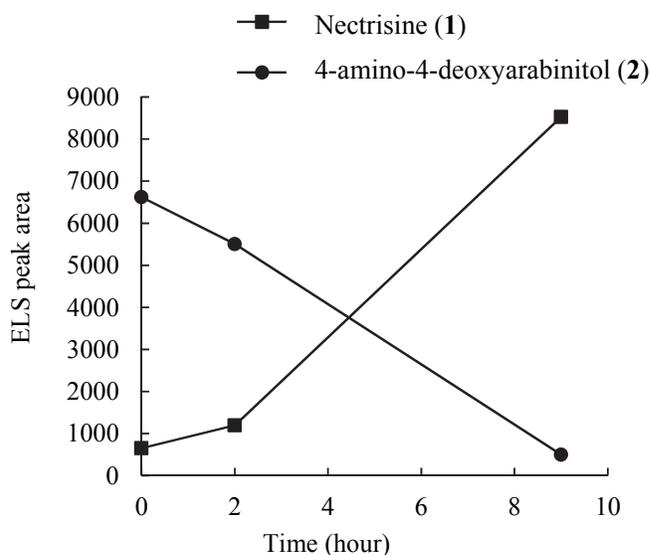


Figure 2-7 Time course of nectrisine (1) production in solution of purified 4-amino-4-deoxyarabinitol (2) supplemented with a cell-free extract of *T. discophora*.

2.3 考察

2.3.1 Nectrisine の推定生合成経路

本研究の結果、D-ribose や D-xylose は nectrisine の生合成中間体で、D-ribose または D-xylose の C-1 から C-5 は nectrisine の C-6、C-2、C-3、C-4、C-5 にそれぞれ相当すること、及び 4-amino-4-deoxyarabinitol が nectrisine の前駆体であることが推定された。これらより、nectrisine の *T. discophora* における生合成経路を Figure 2-8 のように推測した。本経路では、まず、ペントースリン酸回路の物質で 4-amino-4-deoxyarabinitol と立体配置が類似している D-xylulose 5-phosphate (3) から 4-amino-4-deoxyarabinitol (2) が生成すると推測した。次に、4-amino-4-deoxyarabinitol から nectrisine への変換は、まず、4-amino-4-deoxyarabinitol のヒドロキシル基が酸化されて中間体 15 となると考えた。続いて 15 のアミノ基が分子内でカルボニル基へ付加することで自発的に環化して 16 へ変換され、16 は脱水されて nectrisine (1) を生じると推測した。この経路では、脱リン酸化とアミノ化、酸化が起こると考えられる。

同様の生合成経路はイミノ糖である deoxynojirimycin の *Streptomyces subrutilus* や *Bacillus subtilis* (14, 16, 17)、植物である *Commelina communis* による推定生合成経路 (15) においても見られる。これらの先行研究では、D-glucose が Deoxynojirimycin の生合成

中間体であり、その生合成反応にはアミノ化と酸化が含まれると報告されている。さらに、最近になって *Bacillus subtilis* MORI 3K-85 (25) と *Bacillus amyloliquefaciens* (26) における deoxynojirimycin の推定生合成遺伝子には、Aminotransferase、phosphatase、oxidoreductase をコードする遺伝子が含まれていると推定された。

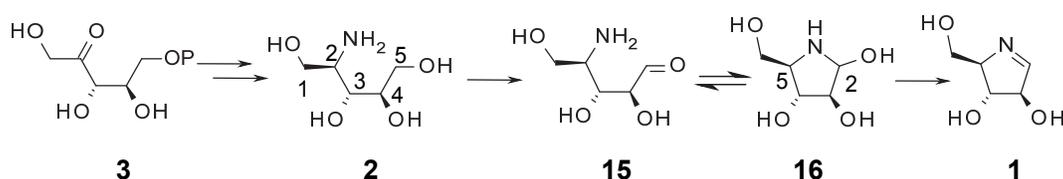


Figure 2-8 Proposed biosynthetic pathway of nectrisine (1) from D-xylulose 5-phosphate (3).

今回の実験の結果、 ^{13}C 標識した D-ribose と D-xylose を添加した場合の nectrisine への同位体の濃縮パターンが同様であったことは、ペントースリン酸回路を用いて説明することができる。 ^{13}C 標識した D-ribose は ribokinase によりリン酸化されて D-ribose 5-phosphate (17) となり (27–29)、ペントースリン酸回路により D-xylulose 5-phosphate (3) へ変換される (Pathway 1, Figure 2-9 (A))。この一連の D-xylulose 5-phosphate への変換反応で、炭素骨格は D-ribose (14) から変化せず、D-ribose に由来する D-xylulose 5-phosphate の炭素の並びは C1C2C3C4C5 となる。D-ribose (14) から D-xylulose 5-phosphate (3) に至るもう一つの経路は、glucose 6-phosphate (19) を経由する比較的長いものが考えられる (Pathway 2, Figure 2-9 (B))。始めに、D-ribose (14) は pathway 1 と同様に ribose 5-phosphate (17) と ribulose 5-phosphate (18) を経由して D-xylulose 5-phosphate (3) に変換される。Ribose 5-phosphate (17) と D-xylulose 5-phosphate は transketolase と transaldolase によって fructose 6-phosphate (22) へ変換される。そして、6-phosphogluconate (21) が fructose 6-phosphate (22) から 3 ステップの反応で生成する。これらの反応によって炭素骨格は D-ribose (14) の C1C2C3C4C5 から C1C2C1C3C4C5 へ変化する。その後、脱炭酸反応と異性化反応により D-xylulose 5-phosphate (3) が生じる。この時、D-xylulose 5-phosphate の炭素骨格は C2C1C3C4C5 となり、pathway 1 を経た場合の D-xylulose 5-phosphate の炭素骨格と異なる。従って、 $[1-^{13}\text{C}]$ D-ribose (14a) または $[2-^{13}\text{C}]$ D-ribose (14b) を添加した場合、pathway 2 によって、nectrisine の炭素に 2 番目に大きな同位体濃縮が引き起こされると考えられる。このことは、Table 2-3 に示された実験結果と一致している。

今回の結果、 ^{13}C 標識された D-xylose と D-ribose をそれぞれ添加した場合の nectrisine の ^{13}C 同位体標識パターンは Figure 2-5 と Table 2-3 に示されているように同様であることがわかった。D-xylose (9) は、Figure 2-4 に示したように、数ステップを経てペントースリン酸回路の物質である D-xylulose 5-phosphate (3) に変換される (20, 21)。よって、D-xylose (9) から D-xylulose 5-phosphate (3) への代謝経路は、D-ribose (14) からの場合

と同様にペントースリン酸回路を用いて説明でき、短いものと長いものの2種類が考えられる (Figure 2-9)。これらの代謝経路を経ることによって起こる D-xylose (9) から D-xylulose 5-phosphate への炭素骨格の変化は、D-ribose からの場合と同一と推定される。そして、¹³C 標識された D-ribose を添加した場合と同様に、この炭素骨格の変化によって、¹³C 標識された D-xylose を添加した場合の nectrisine への ¹³C 濃縮パターンを矛盾なく説明できる。これらより、ペントースリン酸回路は nectrisine の生合成に含まれていて、D-xylulose 5-phosphate (3) がその中間体の一つと推測される。

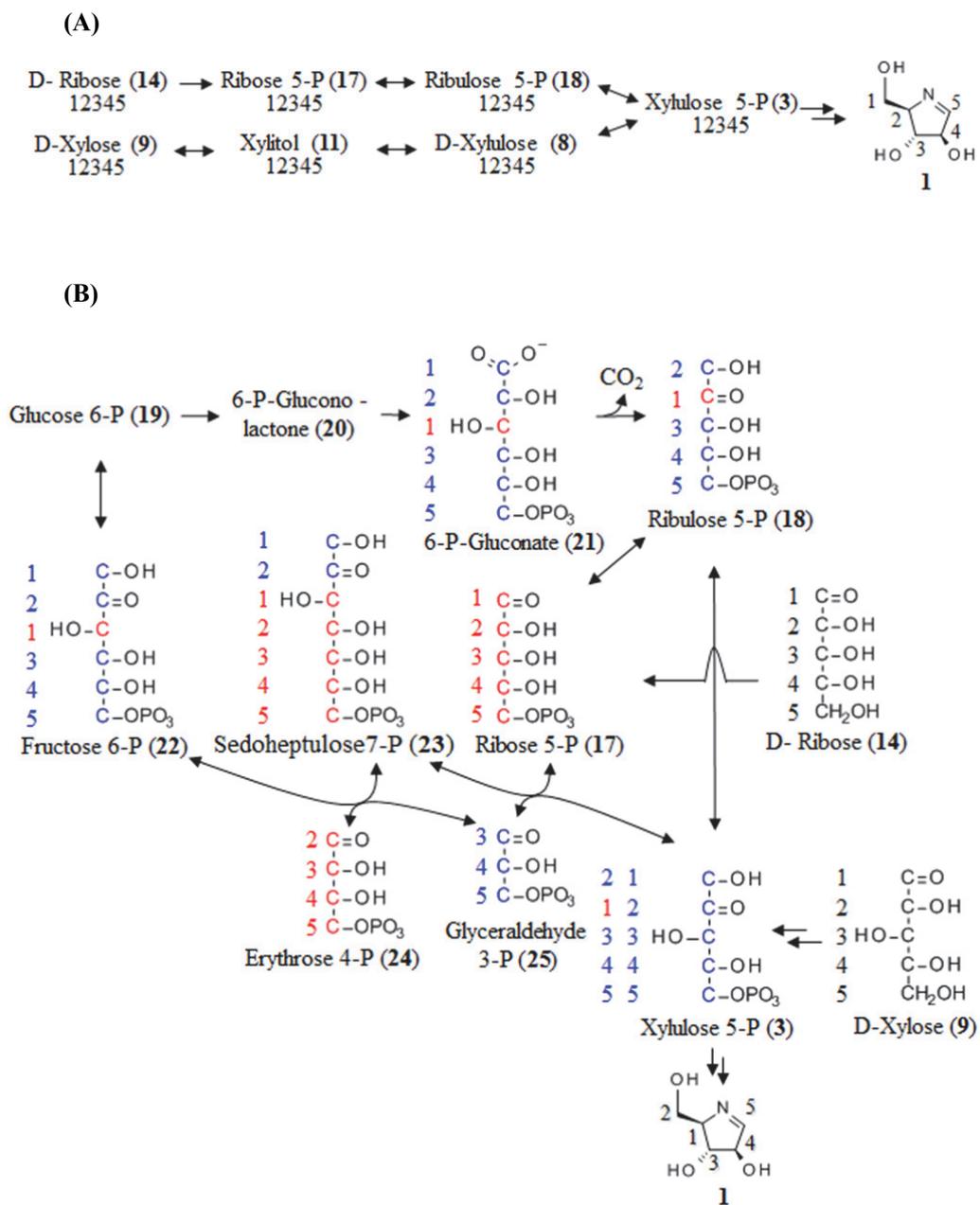


Figure 2-9 Proposed biosynthetic pathway of nectrisine (1) from D-ribose (14) or D-xylose (9) through the pentose phosphate pathway depicted in (A) a short pathway (Pathway 1) and (B) a long pathway (Pathway 2).

Numbers near each compound represent the fate of specific carbon atoms in 14 or 9. Carbons and their numbers derived from xylulose 5-phosphate (3) and 14 were colored blue and red, respectively.

2.4 小括

培地への安定同位体添加実験によって D-xylose と D-ribose が nectrisine の中間体であることが示された。また、 ^{13}C D-xylose または ^{13}C D-ribose に由来する同位体標識パターンより、ペントースリン酸回路の物質が nectrisine の潜在的な中間体であると示唆された。*T. discophora* から抽出、精製された新規物質は、X 線結晶構造解析、NMR や他の分光法などにより 4-amino-4-deoxyarabinitol であると決定した。そして、粗酵素を用いた実験により 4-amino-4-deoxyarabinitol が nectrisine の生合成後期段階の中間体であることが示された。これらより、nectrisine の推定生合成経路として、D-xylulose 5-phosphate と 4-amino-4-deoxyarabinitol を経る経路を提案した (30)。

2.5 引用文献

1. **Shibata T, Nakayama O, Tsurumi Y, Okuhara M, Terano H, Kohsaka M.** 1988. A new immunomodulator, FR-900483. *J Antibiot (Tokyo)* **41**:296–301.
2. **Chaverri P, Salgado C, Hirooka Y, Rossman AY, Samuels GJ.** 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (*Nectriaceae*, *Hypocreales*, *Ascomycota*) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. *Stud Mycol* **68**:57–78.
3. **Tsujii E, Muroi M, Shiragami N, Takatsuki A.** 1996. Nectrisine is a potent inhibitor of alpha-glucosidases, demonstrating activities similarly at enzyme and cellular levels. *Biochem Biophys Res Commun* **220**:459–466.
4. **Kayakiri H, Nakamura K, Takase S, Setoi H, Uchida I, Terano H, Hashimoto M, Tada T, Koda S.** 1991. Structure and synthesis of nectrisine, a new immunomodulator isolated from a fungus. *Chem Pharm Bull* **39**:2807–2812.
5. **Asano N.** 2003. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology* **13**:93R–104R.
6. **Hulme AN, Montgomery CH.** 2003. Stereoselective synthesis of the α -glucosidase inhibitor nectrisine. *Tetrahedron Lett* **44**:7649–7653.
7. **Ribes C, Falomir E, Carda M, Marco JA.** 2008. Short, stereoselective synthesis of the naturally occurring pyrrolidine radicamine B and a formal synthesis of nectrisine. *J Org Chem* **73**:7779–7782.
8. **Brayford D, Honda BM, Mantiri FR, Samuels GJ.** 2004. *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia.

Mycologia **96**:572–597.

9. **Gardes M, Bruns TD.** 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Mol Ecol* **2**:113–118.
10. **White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J.** 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal DNA genes for phylogenetics., p. 315–322. *In* Innis, M, Gelfand, J, Sninsky, J, White, T (eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. Academic Press, Orlando, Florida.
11. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389–3402.
12. **Peterson SW, Kurtzman CP.** 1991. Ribosomal RNA sequence divergence among sibling species of yeasts. *Syst Appl Microbiol* **14**:124–129.
13. **Sugita T, Nishikawa A, Ikeda R, Shinoda T.** 1999. Identification of medically relevant *Trichosporon* species based on sequences of internal transcribed spacer regions and construction of a database for *Trichosporon* identification. *J Clin Microbiol* **37**:1985–1993.
14. **Hardick DJ, Hutchinson DW, Trew SJ, Wellington EMH.** 1992. Glucose is a precursor of 1-deoxynojirimycin and 1-deoxymannonojirimycin in *Streptomyces subbrutilus*. *Tetrahedron* **48**:6285–6296.
15. **Shibano M, Fujimoto Y, Kushino K, Kusano G, Baba K.** 2004. Biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Commelina communis*: a difference between the microorganisms and plants. *Phytochemistry* **65**:2661–2665.
16. **Hardick DJ, Hutchinson DW, Trew SJ, Wellington EMH.** 1991. The biosynthesis of deoxynojirimycin and deoxymannonojirimycin in *Streptomyces subbrutilus*. *J Chem Soc Chem Commun* 729–730.
17. **Hardick DJ, Hutchinson DW.** 1993. The biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Bacillus subtilis var niger*. *Tetrahedron* **49**:6707–6716.
18. **Watanabe Y, Imai K.** 1981. High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

-
- Anal Biochem **116**:471–472.
19. **Imai K, Watanabe Y.** 1981. Fluorimetric determination of secondary amino acids by 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal Chim Acta* **130**:377–383.
 20. **Witteveen CFB, Busink R, Van De Vondervoort P, Dijkema C, Swart K, Visser J.** 1989. L-Arabinose and D-xylose catabolism in *Aspergillus niger*. *Microbiology* **135**:2163–2171.
 21. **Seiboth B, Metz B.** 2011. Fungal arabinan and L-arabinose metabolism. *Appl Microbiol Biotechnol* **89**:1665–1673.
 22. **Merino P, Delso I, Tejero T, Cardona F, Marradi M, Faggi E, Parmeggiani C, Goti A.** 2008. Nucleophilic additions to cyclic nitrones en route to iminocyclitols – total syntheses of DMDP, 6-deoxy-DMDP, DAB-1, CYB-3, nectrisine, and radicamine B. *European J Org Chem* **2008**:2929–2947.
 23. **Flack H, Bernardinelli G.** 2000. Reporting and evaluating absolute-structure and absolute-configuration determinations. *J Appl Crystallogr* **33**:1143–1148.
 24. **Kimura T, Nakagawa K, Saito Y, Yamagishi K, Suzuki M, Yamaki K, Shinmoto H, Miyazawa T.** 2004. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J Agric Food Chem* **52**:1415–1418.
 25. **Kang K-D, Cho YS, Song JH, Park YS, Lee JY, Hwang KY, Rhee SK, Chung JH, Kwon O, Seong S-I.** 2011. Identification of the genes involved in 1-deoxynojirimycin synthesis in *Bacillus subtilis* MORI 3K-85. *J Microbiol* **49**:431–440.
 26. **Clark LF, Johnson J V, Horenstein NA.** 2011. Identification of a gene cluster that initiates azasugar biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chembiochem* **12**:2147–2150.
 27. **Sigrell JA, Cameron AD, Jones TA, Mowbray SL.** 1998. Structure of *Escherichia coli* ribokinase in complex with ribose and dinucleotide determined to 1.8 Å resolution: insights into a new family of kinase structures. *Structure* **6**:183–193.
 28. **Sigrell JA, Cameron AD, Jones TA, Mowbray SL.** 1997. Purification, characterization, and crystallization of *Escherichia coli* ribokinase. *Protein Sci* **6**:2474–2476.

-
29. **Tozzi MG, Camici M, Mascia L, Sgarrella F, Ipata PL.** 2006. Pentose phosphates in nucleoside interconversion and catabolism. *FEBS J* **273**:1089–1101.
 30. **Miyauchi R, Takatsu T, Suzuki T, Ono Y, Shiba Y.** 2015. Biosynthesis of nectrisine in *Thelonectria discophora* SANK 18292. *Phytochemistry* **116**:87–93.

2.6 補遺

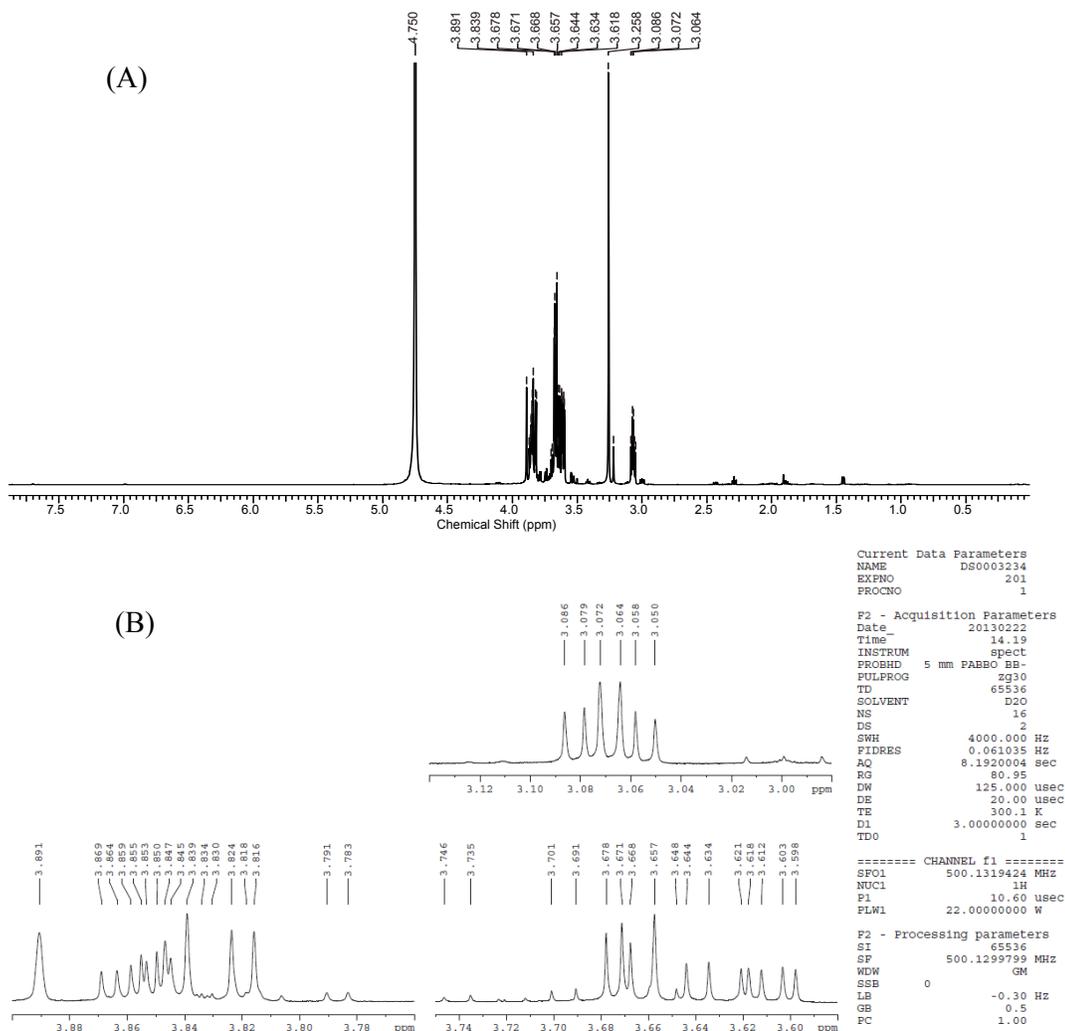


Figure S1. ^1H NMR spectrum of **2** in D_2O (500 MHz).

(A) region of 0 to 8 ppm, (B) region of 3.14 to 2.98 ppm and 3.90 to 3.76 ppm, 3.75 to 3.58 ppm.

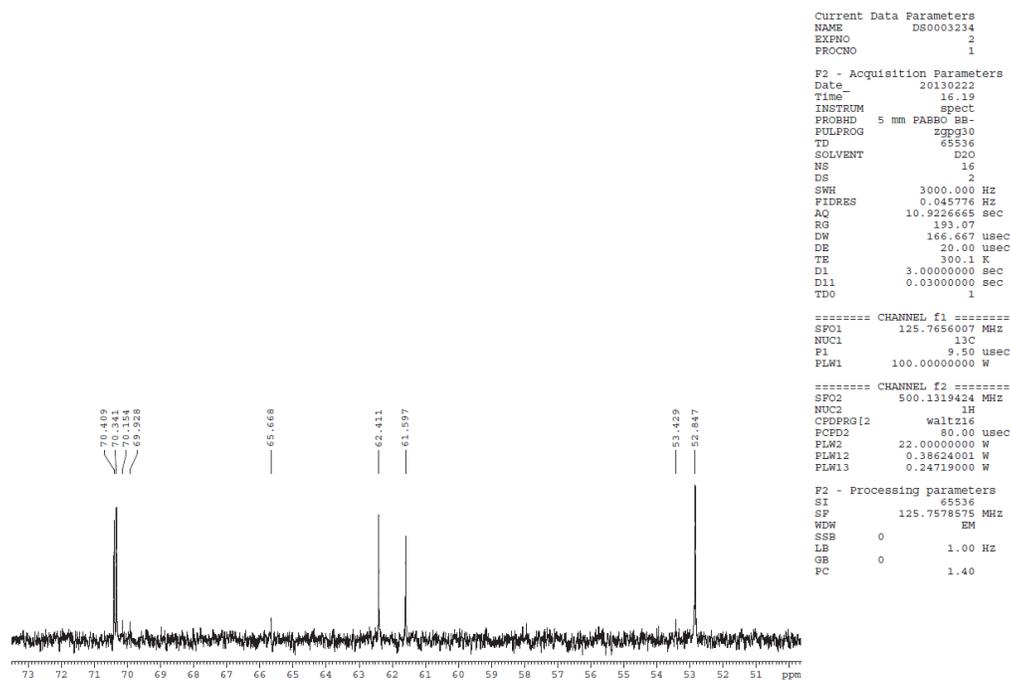


Figure S2. ^{13}C NMR spectrum of compound **2** in D_2O .

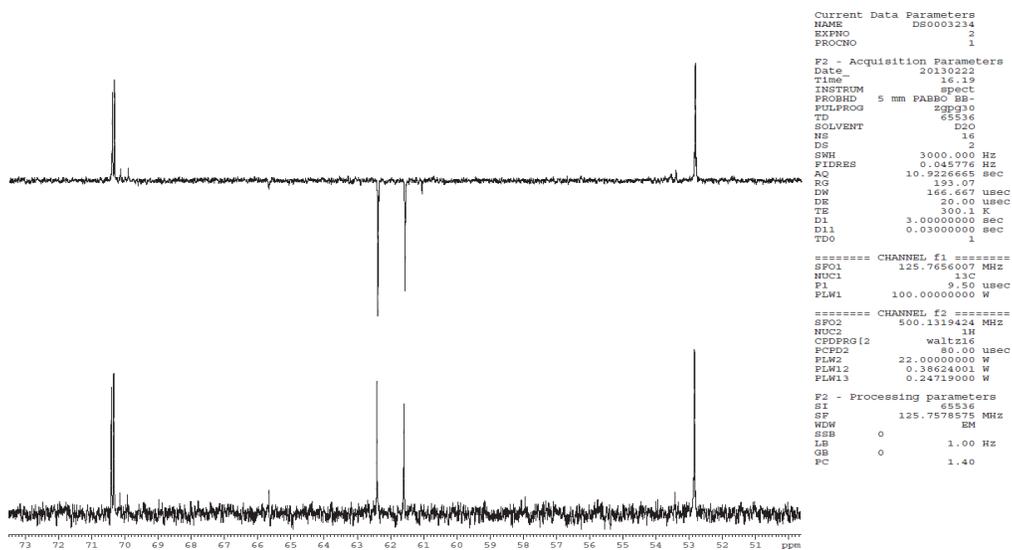


Figure S3. DEPT spectra of **2** in D_2O .

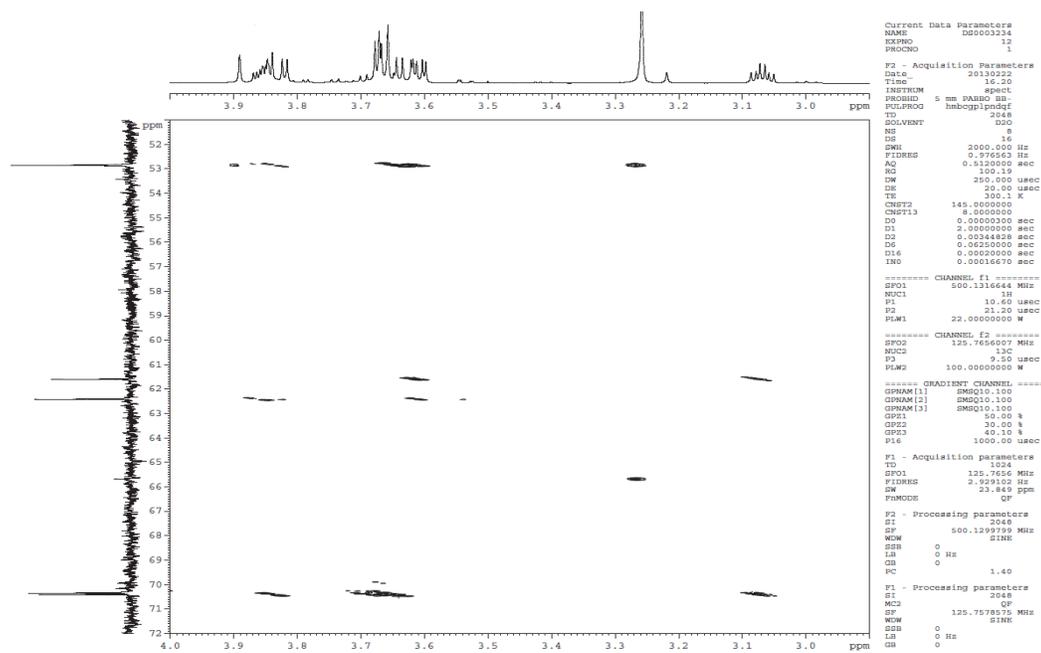


Figure S5. HMBC spectrum of **2** in D₂O.

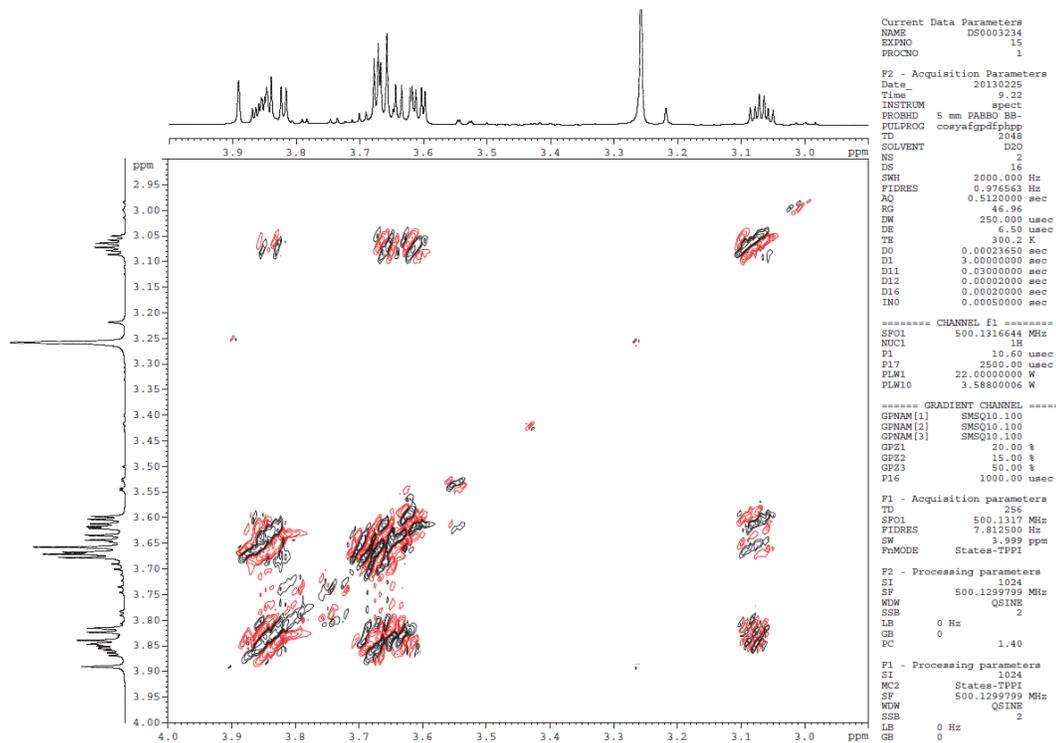


Figure S6. DQF COSY spectrum of **2** in D₂O.

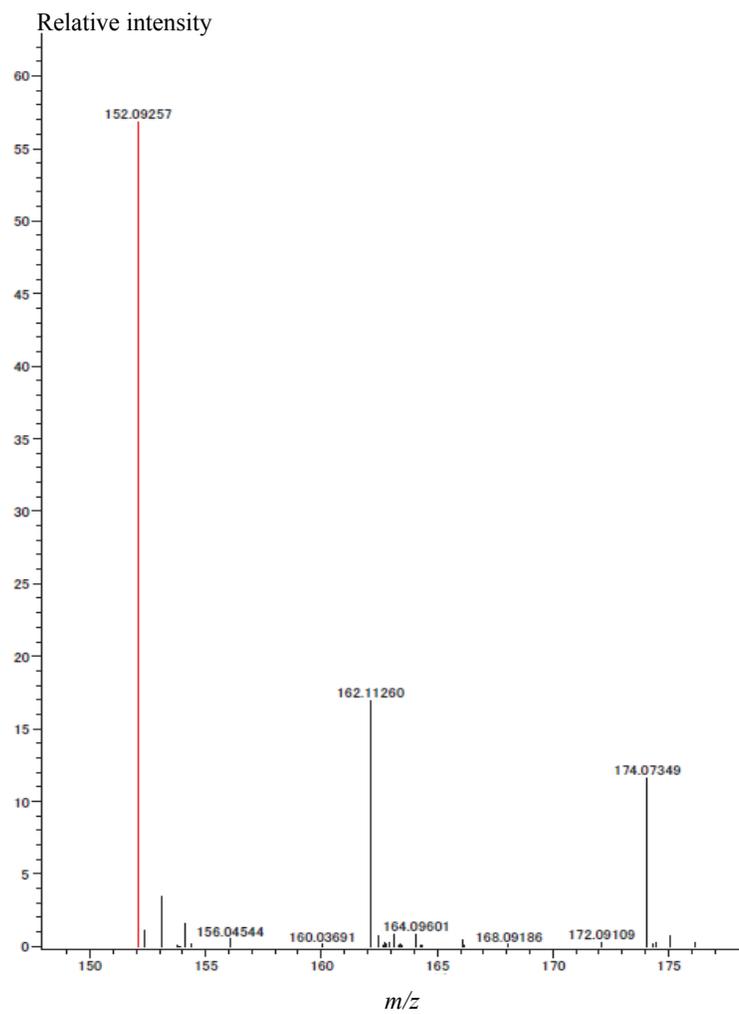


Figure S7. HR-ESI-TOF-MS spectrum of **2**.

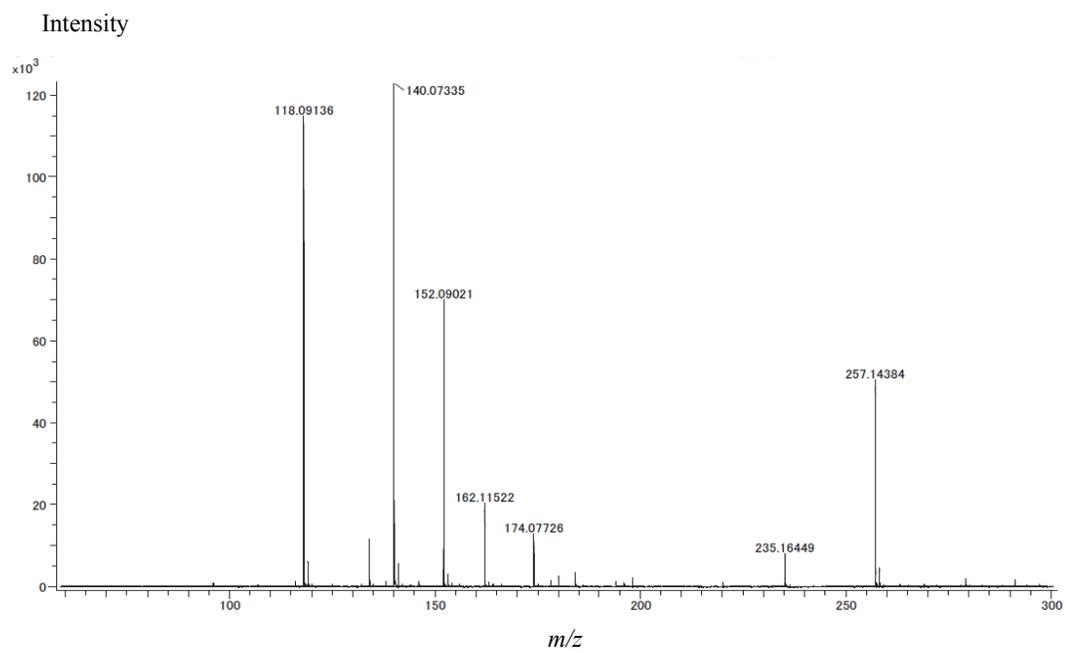


Figure S8. LR-ESI-TOF-MS spectrum of **2**.

3. Nectrisine 生合成酵素の *Thelonectria discophora* SANK 18292 からの精製と特性解析

3.1 緒言

Thelonectria discophora SANK 18292 の培養ブロスより単離された 4-amino-4-deoxyarabinitol に菌体抽出液を添加すると nectrisine が生じたことから、4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine に変換する酵素が菌体抽出液に含まれていると示唆された。しかし、nectrisine の生合成酵素に関する知見は全く報告されていない。*T. discophora* を用いた効率的な nectrisine の製造プロセスを構築し、さらには合理的な設計による遺伝子の改変によって nectrisine 高生産株を作出するために、生合成酵素を取得しその特性を明らかにすることは重要である。

本章では、4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine へ変換する酵素（以下、NecC）を精製し、その性質を明らかにすることを目的とした。始めに、nectrisine への変換活性を指標に NecC を精製し、LC-MS/MS 解析で部分アミノ酸配列を推定した。そして NecC の物理化学的特性や反応特性を調べた。最後に nectrisine の抽出について調べ、nectrisine 生産プロセスを開発する上での留意点を示した。

3.2 実験方法と結果

3.2.1 *T. discophora* の培養と 4-amino-4-deoxyarabinitol oxidase (NecC) の精製

本章では、Nectrisine 生産菌である *T. discophora* SANK 18292 (JCM 30947) を用いた。Potato Dextrose Agar (PDA、和光純薬) スラントに生育した菌から胞子を回収し、A-1 培地 (1) に接種し、23°C、210 rpm で 5 日間、回転振盪機で攪拌した。この培養液を GPYC-3 培地 (Glycerol 8%、Potato granule 1%、Yeast extract 2.6%、CaCO₃ 0.2%) に 1% v/v 添加し、23°C、210 rpm で 4 日間培養した。菌体を遠心して回収し、0.9% NaCl 水溶液で洗浄後、上清を除き、液体窒素で菌体を凍結させた。そして凍結菌体を乳鉢で粉碎した。粉碎菌体 13.07 g を 20 mL の 50 mM リン酸 pH 7.0 に溶解し、8200 rpm、10 分間遠心後、その上清をろ過して細胞などの残骸を除き、同バッファーを加えて 50 mL に調整して菌体抽出液を得た。

この液にミキサーで粉碎した (NH₄)₂SO₄ を終濃度 30%になるように加えてタンパク質を析出させ、これを遠心して沈殿を回収した。この沈殿を 30% (NH₄)₂SO₄ を含む 50 mM リン酸 pH 7.0 で洗浄後、50 mM リン酸/5 mM ジチオスレイトール (DTT) pH 7.0 (バッファーA) を加えて溶解させ、さらに同バッファーで Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (10000 M.W.カット) (Thermo Fisher Scientific) を用いて透析し、30%硫酸沈殿画分とした。

これをバッファーA で平衡化した陰イオン交換カラム (HiTrap DEAE FF 5 mL、GE ヘルスケア) に ACTAprime plus クロマトグラフィシステム (GE ヘルスケア) にて 5 mL/min で添加して吸着させた。バッファーA でカラムを洗浄後、50 mM リン酸/5 mM DTT/1 M NaCl pH 7.0 (バッファーB) を用いて 15 分間にバッファーB の濃度を 0%から 50%に直線勾配にて増大させることにより溶出させ、分画した。4-amino-4-deoxyarabinitol の nectrisine への変換活性を示した画分を回収し、グリセロールを加えて 50%グリセロール溶液とし、-20°C で保存した。

タンパク質の定量は DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) でメーカーの説明通り行った。タンパク質の純度はドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で確認した。その際、染色は Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB) で行い、分子量マーカーとして Sea Blue Plus 2 Pre-Stained Standards (Life Technologies) を用いた。

4-amino-4-deoxyarabinitol の nectrisine への変換活性は 0%から 30%硫酸沈殿画分にはほぼ 100%回収され、7.8 倍に精製された (Table 3-1)。続く DEAE 陰イオン交換クロマトグラフィではこの変換活性のある画分を収率 25%で回収し抽出液に対して 6 倍に精製された。精製された NecC の活性は 0.67 U/mg で、SDS-PAGE では分子量 60 kDa 付近にダブルバンドを示した (Figure 3-1)。

Table 3-1 Purification of NecC from *T. discophora*

Purification step	Total Protein (mg)	Total Activity (U)	Specific activity (U/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Mycelium extract	363.9	40.7	0.11	100	1.0
Ammonium sulfate precipitation	49.4	43.1	0.87	106	7.8
DEAE chromatography	14.9	10.0	0.67	25	6.0

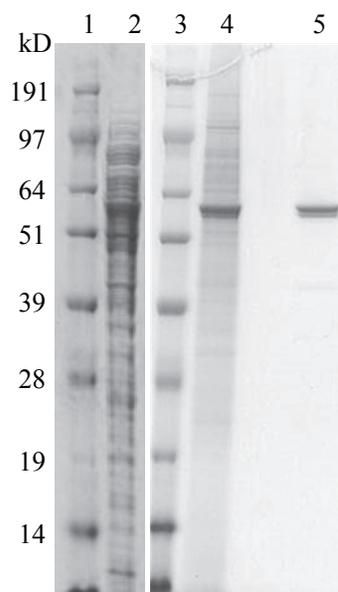


Figure 3-1 Purification of NecC from *T. discophora*.

Reducing 12% SDS-PAGE gels contain the following: lane 1 and 3, marker proteins; lane 2, cell-free extract; lane 4, 0% to 30% ammonium sulfate fraction; lane 5, purified NecC after DEAE-sepharose column chromatography.

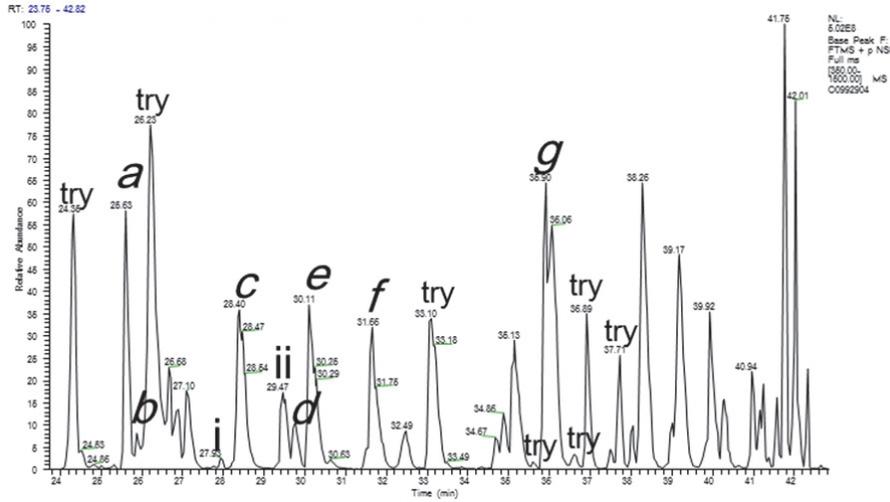
3.2.2 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) による NecC の部分アミノ酸配列の推定

NecC の部分アミノ酸配列を推定するため、NecC をゲル内でトリプシン消化し LC-MS/MS 解析した。方法は既報 (2, 3) を若干変更した。CBB 染色された NecC の SDS-PAGE 上のバンドを切り出し、CBB を除くため 50 mM NH₄HCO₃、pH 8.0 /30% CH₃CN 中で 37°C、15 分置いた。次にこのゲル断片を CH₃CN に浸漬し減圧乾燥することで脱水した。これに 10 mM DTT、20 mM NH₄HCO₃、pH 8.0 を加えて 50°C で 30 分置くことでタンパク質を還元、5 mM iodoacetamide、20 mM NH₄HCO₃、pH 8.0 を加えて暗所で 20°C で 20 分置いてアルキル化した。このゲル断片を減圧乾固後、50 µL の 20 mM NH₄HCO₃、10 ng/µL trypsin (Sequencing Grade Modified Trypsin; プロメガ)、0.005% (w/v) dodecyl-maltoside、pH 8.0 を加え 37°C で 12 時間おいた。得られたペプチドを 0.05% (v/v) ギ酸/水で 1 回、0.05% (v/v) ギ酸/CH₃CN で 2 回抽出後、減圧乾燥して約 20 µL に調整した。

LC-MS/MS は、LTQ-Orbitrap 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) と、自家製の BEH C₁₈ (1.7 µm, Waters) electrospray ionization tip カラム (0.15 x 50 mm) と Inertsil C₁₈ (3 µm、ジーエルサイエンス) トラップカラム (0.3 x 1 mm) を装備した DiNa nano-flow 液体クロマトグラフィーシステム (KYA Technologies) で、移動相 A : 0.1% (v/v) ギ酸/水、移動相 B : 0.1% (v/v) ギ酸/CH₃CN、グラジエント溶出 B : 5→35% in 60 min、温度 : 室温、流速 : 150 nL/min の条件で行った。MS/MS スペクトルは National Center for Biotechnology Information (NCBI) のタンパク質データベースを Mascot プログラム (Matrix Sciences) で検索し同定した。Mascot 検索で同定されなかった主要なプリカーサーイオンは手動で解析してアミノ酸配列を同定した。

その結果、いくつかの主要なクロマトグラムピークは同定できなかったが (Figure 3-2a)、Mascot 検索により 2 つのペプチドを、手動解析により 7 つのペプチドを同定した (Figure 3-2b)。同定したペプチドは、NCBI アクセッション番号 XP_388379 の、“hypothetical protein FG08203.1 [*Fusarium graminearum* PH-1]” (注: 現在はデータベースから削除されている) と相同性が高かった (Figure 3-2c)。この蛋白質は NCBI の conserved domain database (4) 検索でフラボ蛋白質である glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase ファミリー (5) の特徴を有すると推定された。

a



b

i, m/z 805.7³⁺

AKVQLTDSSDSYVGGPVYCVGGR
AKVQLTDSSDSYVGGPVYCVGGR

c, m/z 371.7²⁺

VLLIER
VLLIER

ii, m/z 1108.5²⁺

VQLTDSSDSYVGGPVYCVGGR
VQLTDSSDSYVGGPVYCVGGR

d, m/z 744.35²⁺

---IFSTHVLNT---
GGVIFSTHVLNTSR

a, m/z 862.3²⁺

---NSPEGNESVYDAVK
GASNSPEGNERVYDAVK

e, m/z 691.3²⁺

GLMDHDIYIVR
GLIDHNICYAR

b, m/z 435.8²⁺

KVLLIER
KVLLIER

f, m/z 1083.0²⁺

---FSTHVLNT---
GGVIFSTHVLNTSR

g, m/z 644.8²⁺

FGIEQLPDLTR
KGIENLWVCDL

c

Reference sequence: XP_388379

```
1   MDHLLHLDTD VVCLLAKLDS YDYIIVGSGF GGGPLAENLA SKKKKVLLIE
51  RGGVIFSTHV LNTSRPFYKR GASNSPEGNE RVYDAVKAKV QLTDSSDSYV
101 GGPVYCVGGR TNLWGTWIPE IGETLNAYF PPEIVKYLKE GGYADTYKYL
151 TDDDPDGIY PEGDGAHEVS AQDIGFAKQK LNHALEKAEF GIMPIAAQFN
201 APAPYKFAQG AYSTTLSIMN RMYANDPYLS VLLNTEVIAV QCESDDAPEK
251 MVTALQIRDK STGALKELGV GKAKVILAAG TIGTASIALN SGLQKSNELV
301 GKGLIDHNIC YARFAKEKSG GFTEKPLNLK THLKVGGEEC LVTVTINANF
351 FLAGSSATLS TTHFYDKEGR LLGPKSPANE QKNFDTICVL FEFVGKLADG
401 NSVLSIPGLD PVLDFRRDPL KHEVQCAMED IVRNVRDAFV DAQPFKSPTT
451 GHELCPDPGL RPQHLGFGVF SHECGTMRMD GPTKKDGVVD SDLKVKGIEN
501 LWVCDLSVMP VSPEANPALT LAALSLRLAE HLSPEVQV
```

Figure 3-2 Identification of NecC tryptic peptides by LC-MS/MS.

a, Total ion current chromatogram of NecC tryptic digests. Mascot search identified peaks i and ii homologous to XP_388379. *De novo* sequencing using MS/MS data also identified peaks *a-g* homologous to XP_388379. “try” indicates a trypsin autocleavage product. b, Identified peptide sequences (upper rows) and a reference sequence, XP_388379 (lower rows). *a-g*, and i and ii correspond to the panel a. Square indicates identical peptides. c, Position of the identified sequences on the sequence of XP_388379. Underlines, sequences i and ii; Dotted underlines, sequences *a-g*.

3.2.3 NecC の補因子の分析

T. discophora から精製した NecC は黄色を呈していたので補因子を保持していることが示唆された。そこで、精製した NecC の PBS、pH 7.4 溶液 (1 mg/mL) の吸収スペクトルを DU-730 分光光度計 (Beckman-Courter) で測定した。NecC の吸収スペクトルは、272 nm、388 nm、457 nm に極大波長があり、480 nm 付近に肩が見られた (Figure 3-3)。これは、フラボタンパク質の吸収スペクトルの特徴 (6) に一致した。

次に、補因子が NecC に共有結合しているかどうか確認するため、5 μ L の trichloroacetic acid (TCA) (和光純薬) を 100 μ L の NecC 溶液に加え、室温で 1 時間置いて NecC から補因子を脱落させた後、16000 g で 5 分遠心して不溶性タンパク質を沈殿させ、この上清の吸収スペクトルを測定した。このとき、Flavin adenine dinucleotide (FAD) (ナカライテスク) の 4.8% (v/v) TCA/PBS 溶液をコントロールサンプルとして用いた。波長 300 nm から 500 nm の上清の吸収スペクトル (Figure 3-3) は、沈殿の前後で波形と強度がほぼ同様であったことから、補因子は非共有結合でタンパク質と結合していることが示唆された。この補因子の吸収スペクトルは同じバッファー中の FAD の吸収スペクトルと類似していたので、この補因子はフラビン骨格を有していると推定された。

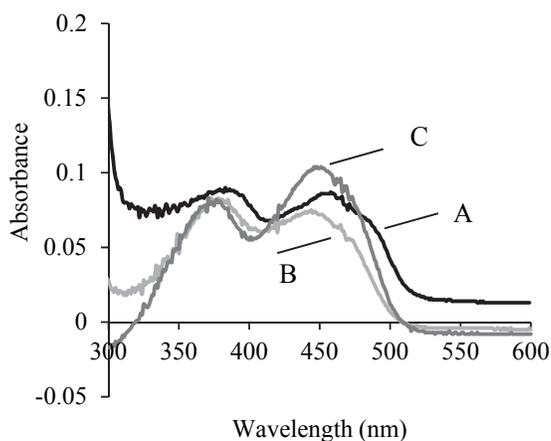


Figure 3-3 Adsorption spectra of NecC from *T. discophora* before and after precipitation with TCA.

Spectra of the untreated enzyme in PBS, pH 7.4 (A), supernatant after the precipitation of the enzyme (B) and FAD standard in PBS containing 4.8% TCA (C) are shown.

3.2.4 NecC の会合状態の分析

NecC のオリゴマーは blue native PAGE (7, 8) と size exclusion chromatography (SEC) で分析した。

blue native PAGE は NativePAGE 3–12% gel (Life Technologies) を用い、CBB で染色した。分子量マーカーとして NativeMark Unstained Protein Standards (Life Technologies) を使用した。

SE-HPLC は Acquity UPLC BEH200 SEC カラム、 4.6×150 mm、 $1.7 \mu\text{m}$ 粒子サイズ (Waters) を装備した LC2010 CHT HPLC システム (島津製作所) で行った。移動相は 20 mM リン酸ナトリウム/0.2 M KCl/pH 6.8、流速は 0.2 mL/min、カラムオープン温度は 40°C 、検出波長は 280 nm とした。

NecC は SDS-PAGE で 60 kDa 付近に泳動されたが (Figure 3-1)、Native PAGE では少なくとも 6 個のバンドを 500 kDa から 1000 kDa 付近の範囲に形成した (Figure 3-4a)。よって、NecC はいくつかのサイズの異なる非共有結合性のオリゴマーを形成していることが示された。NecC の単量体の分子量計算値は 61.3 kDa なので、Native PAGE で見られた 500 kDa、750 kDa、880 kDa のバンドはそれぞれ 8 量体、12 量体、14 量体に相当すると推測された。SEC 分析での主なピークは空隙容積付近の位置に溶出され、分子量マーカーとの比較よりその分子量は 670 kDa 以上で、Native PAGE で見られた 750 kDa 以上の分子種に相当すると推測された (Figure 3-4b)。2 番目に大きな SEC ピークの分子量は約 500 kDa で、Native PAGE で見られえた 500 kDa のバンドに相当すると推測された。

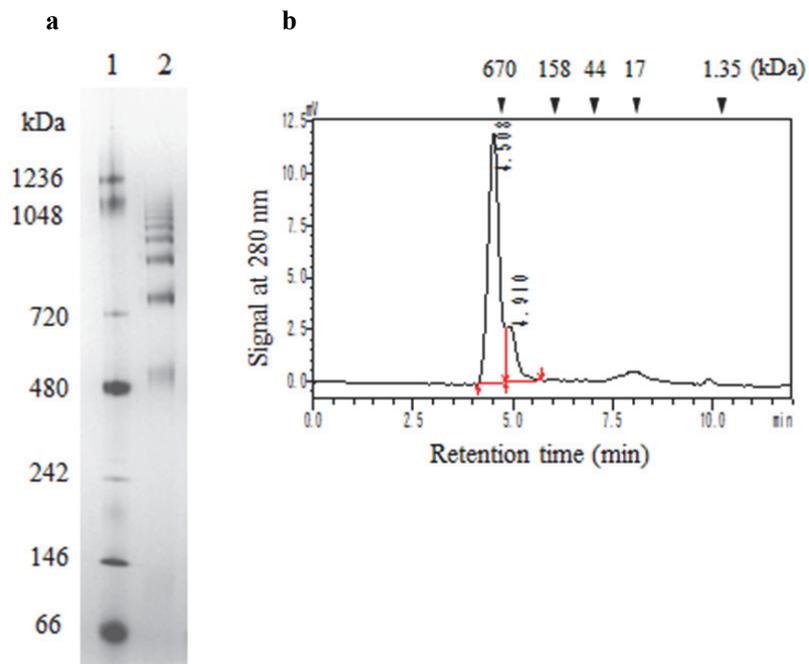


Figure 3-4 Blue native PAGE (a) and size-exclusion chromatogram (b) of NecC protein produced by *T. discophora*.

Lane 1, marker proteins; lane 2, NecC. Triangles in b indicate elution positions of marker proteins.

3.2.5 NecC の反応特性

NecC の活性は過酸化水素の生成を peroxidase と指示薬を用いたカップリング反応により測定した (9, 10)。終濃度がそれぞれ 0.6 mM の 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline 6-sulfonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich)、3 units の peroxidase from horseradish、1 mM の 4-amino-4-deoxyarabinitol、47.1 mM のリン酸カリウムバッファー、pH 7.0 を含む 1 mL の溶液 を 30°C で平衡化後、適当量のサンプルを加え 30°C で 10 分間置いた。4 N HCl 水溶液を 0.1 mL 加えて酵素反応を終了させ、波長 420 nm の吸光度を分光光度計 (日立製作所) で測定した。1 unit の酵素活性は、上記の反応で 2 μ mol の ABTS を 1 分間に酸化する酵素量とした。この測定条件を標準条件とした。

4-amino-4-deoxyarabinitol を基質に用いて NecC 活性を pH 5-10 の範囲で測定した (Figure 3-5a)。pH 5-6.5 がクエン酸 / リン酸バッファー、pH 6.5-8 がリン酸バッファー、pH 9-10 がグリシン/NaOH バッファーを用いた。NecC 活性の至適 pH は 7.0 であると示された。また、pH 5 以下または pH 10 以上では、NecC 活性は微弱であると示唆された。

次に、反応温度を 4-70°C の範囲で変化させて、NecC 活性を測定した (Figure 3-5b)。NecC 活性の至適温度は 30°C であり、50°C においては著しく酵素活性が低下し、60°C 以上においては、今回の測定条件では活性がほぼ検出されなかった。

NecC 活性の熱安定性を評価するため、NecC 溶液を 20-70°C の各種温度で 1 時間保温した後、標準条件で酵素活性を測定した。活性は 30°C 以下で 8 割以上保持され、50°C においては著しく低下し、60°C では検出されなかった。

NecC の熱安定性は MicroCal VP-Capillary DSC システム (Malvern) を用いた differential scanning calorimetry (DSC) でも評価した。参照バッファーとして PBS pH 7.4 を用い、サンプル (0.45 mg/mL、PBS pH 7.4) を 20°C から 90°C まで 60°C/h で加熱しデータを取得した。そしてバッファースキャンをサンプルスキャンから差し引きタンパク質濃度で規格化した。NecC の DSC サーモグラムは単峰性を示し、そのオンセットは 45°C から 50°C 付近で、 T_m は 57.3°C であった (Figure 3-5c)。これらより、NecC の熱による失活は、NecC の変性によるものと推測された。

NecC の酵素活性測定溶液中の 4-amino-4-deoxyarabinitol の濃度がその活性に与える影響を評価した (Figure 3-5d)。4-amino-4-deoxyarabinitol 濃度が高いほど活性が低下したことから、NecC 活性は基質阻害を受ける可能性が示唆された。

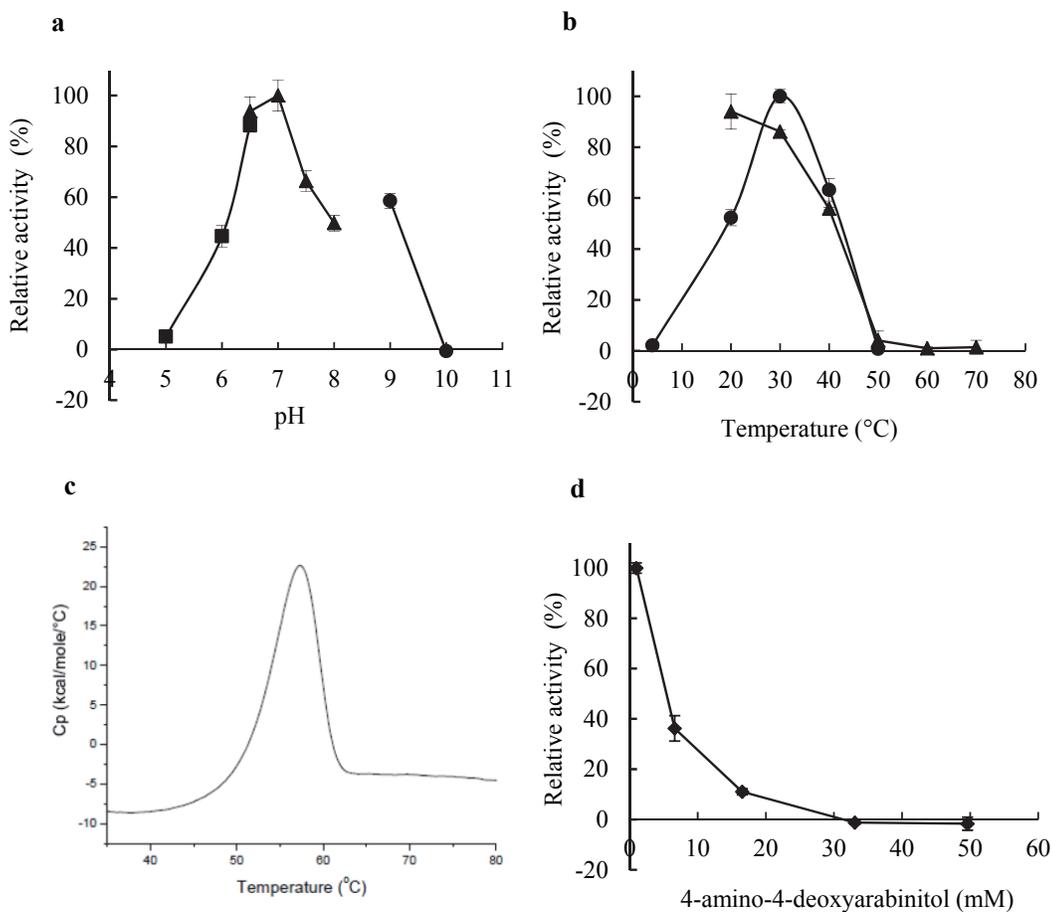


Figure 3-5 Effect of pH, temperature and 4-amino-4-deoxyarabinitol concentration on NecC activity.

a, The enzyme activity was measured under standard assay conditions except for pH. ■, citrate/phosphate buffer; ▲, phosphate buffer; ●, glycine/NaOH buffer. b, The enzyme activity was measured under standard assay conditions at various temperatures (●). For the stability study, the enzyme in 50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0 was preincubated for an hour at the indicated temperature, then the remaining activity was measured under the standard condition (▲). c, DSC thermogram of NecC in PBS, pH 7.4. d, The enzyme activity was measured under standard assay conditions except for 4-amino-4-deoxyarabinitol concentration.

NecC の D-sorbitol、D-arabinitol、xylitol に対する酵素活性はアッセイ溶液中の 4-amino-4-deoxyarabinitol をそれぞれの基質に変更して測定した。D-sorbitol、D-arabinitol、xylitol の 4-amino-4-deoxyarabinitol に対する相対活性はそれぞれ 46%、47%、48%であったので、4-amino-4-deoxyarabinitol は NecC が反応しやすい基質であると示唆された。1 mM の 4-amino-4-deoxyarabinitol の存在下においては、NecC 活性は 1 mM の各種糖アルコールの添加により阻害されなかった (Table 3-2)。

NecC 活性は 1 mM の NaCl または MgCl₂、KCl⁺、CaCl₂²⁺、CoCl₂、NiCl₂、ZnCl₂ の添加によりほぼ変化しなかった。1 mM の CuCl₂ またはキレート剤である ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を添加した場合は、NecC 活性が 73%、40%にそれぞれ低下し、MnCl₂ を添加した場合は、NecC 活性が若干向上した。0.2 mM または 1 mM、5 mM の MnCl₂ を添加すると、NecC 活性は 20% または 27%、30%それぞれ向上した。

Table 3-2 Effect of additives on NecC activity

The enzyme activities were measured under standard assay conditions containing 1 mM 4-amino-4-deoxyarabinitol with 1 mM per additives, unless otherwise specifically noted. Values are an average of three independent experiments.

Additives	Relative activity (%)
None	100
D-sorbitol	98
D-arabinitol	97
Xylitol	101
NaCl	97
MgCl ₂	102
KCl	101
CaCl ₂	100
MnCl ₂ (0.2 mM)	120
MnCl ₂ (1 mM)	127
MnCl ₂ (5 mM)	130
CoCl ₂	92
NiCl ₂	89
CuCl ₂	73
ZnCl ₂	99
EDTA	40

3.2.6 4-amino-4-deoxyarabinitol の菌体内での蓄積

ナスフラスコ中で 61°C に調整されたお湯 400 mL に、4°C に設定された冷蔵庫内で冷却された *T. discophora* のろ過菌体 100 g を添加し、51°C から 54°C で 70 分間攪拌して代謝物を抽出した。そして氷水でただちに冷却、濾過して酵素反応の進行を抑制した。抽出液中の 4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine に変換するため、抽出液を 4°C に設定された冷蔵庫内で攪拌した。

Nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol を検出するため、evaporative light scattering detection (ELSD)-HPLC を ELSD 検出器モデル 300S (SofTA) と Xbridge BEH HILIC カラム、4.6 × 75 mm、2.5 μm (Waters) (11) を接続した Agilent 1100 HPLC システム (Agilent Technologies) を用いて行った。条件は、移動相:90% CH₃CN/10% H₂O/20 mM CH₃CO₂NH₄、流速:1 mL/min、カラムオープン温度:40°C、スプレーチャンバー:40°C、ドリフトチューブ、オプティカルセル、イグゾーストチューブ:60°C とした。

抽出直後 (Figure 3-6、0 min) は、4-amino-4-deoxyarabinitol が多く存在し、nectrisine は微量であった。よって、nectrisine ではなく 4-amino-4-deoxyarabinitol が *T. discophora* に蓄積されていると示唆された。

抽出液を攪拌すると 4-amino-4-deoxyarabinitol が減少するとともに nectrisine が増加し、40 時間後には 4-amino-4-deoxyarabinitol はほぼ消失した。これは抽出液に含まれる NecC による作用と推測されるので、NecC は菌体水溶液から加熱によって抽出され得ることが示された。

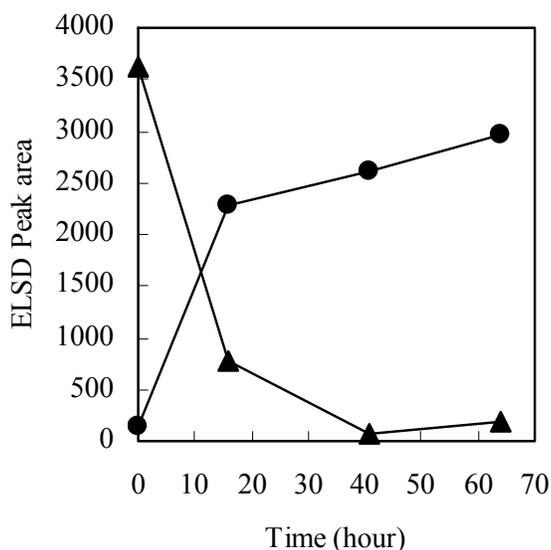


Figure 3-6 Time course of nectrisine (●) and 4-amino-4-deoxyarabinitol (▲) in filtrated *T. discophora* extracts stirred at 4°C.

3.3 考察

3.3.1 NecC の精製

第2章では、 ^{13}C 同位体を用いて、nectrisine の生合成経路として D-xylulose 5-phosphate と 4-amino-4-deoxyarabinitol を経る経路を推定した。また、*T. discophora* から得た菌体抽出液を 4-amino-4-deoxyarabinitol に作用させると nectrisine が生成したことを報告した (1)。そこで本章では、4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine へ変換する酵素 (NecC) を同定しその特性を明らかにすることを目的とした。

NecC の精製では、硫安沈殿の分画が酵素活性の回収率の高い効果的な操作であった。続く陰イオン交換クロマトグラフィーでは SDS-PAGE 上での NecC の純度は向上したが、単位質量あたりの酵素活性は若干低下した。この原因としては、NecC が吸着した陰イオン交換樹脂をバッファーで洗浄した際に、NecC に非共有結合で結合している補因子 (Figure 3-3) が一部脱落した可能性が考えられた。

3.3.2 NecC の会合状態

NecC のアミノ酸配列の一部は、LC-MS/MS 分析で推定され、その配列はフラボ蛋白質である GMC oxidoreductase ファミリー (5) の特徴を有する蛋白質と相同性を示した。一般に、GMC oxidoreductase 類はオリゴマーを形成することが知られている。例えば、2量体を形成する glucose oxidase (12, 13)、8量体を形成する alcohol oxidase (14–18)、4量体を形成する pyranose oxidase (19, 20) などがあり、これらは、天然状態においてそれぞれ単一のサイズのオリゴマーであるといわれている。しかし、NecC は天然状態においていくつかのサイズの異なるオリゴマーを形成した。また、NecC は変性条件下である SDS-PAGE で 60 kDa 付近に 2重のバンドを形成した。NecC のアミノ酸配列には潜在的な N 型糖鎖付加サイトが 3つあることと、大腸菌で生産した NecC は SDS-PAGE で単一のバンドを形成したことより、この糸状菌由来 NecC の SDS-PAGE での 2重バンド形成は、おそらく NecC の部分的な糖鎖付加によるものと推測される。従って、NecC のオリゴマーはアミノ酸配列が単一のサブユニットから成り立っていると考えられる。なお、糖鎖付加は SDS-PAGE においてバンドを移動させ、分子量の決定に影響を与え得ることが知られている (21)。

3.3.3 NecC の反応特性

NecC は nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) などの添加物の非存在下で 4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine に変換する。また、peroxidase を利用した NecC の酵素活性測定条件において ABTS は酸化されることから本酵素反応で H_2O_2 を生じると推測される。これらより、本反応の電子受容体は O_2 であると示唆される。 O_2 が還元され H_2O_2 を生じるのは典型的な GMC oxidase による反応でも同様である (5, 19)。これらより、NecC の反応は Figure 3-7 のように推測される。この反応モデルでは、始めに

4-amino-4-deoxyarabinitol の水酸基が酸化され中間体 **3** を生じる。続いて分子内でアミノ基がカルボニル基に攻撃して環化した化合物 **4** が得られ、化合物 **4** は非酵素的に脱水されて nectrisine を生じる。中間体候補化合物である **3** と **4** は NecC 反応液の LC-MS 分析では検出されなかったため、これらは通常の条件では安定に存在し得ないと考えられる。

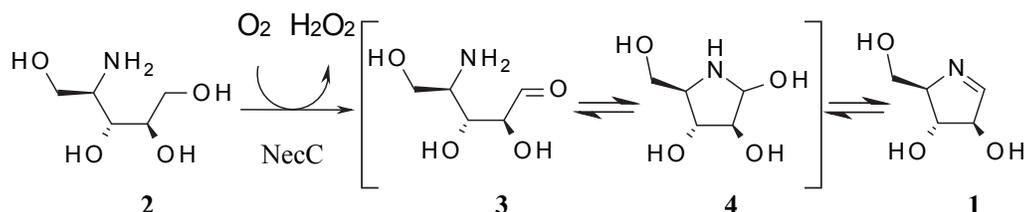


Figure 3-7 Postulated scheme for reaction catalyzed by NecC

Nectrisine と β -pyrone 構造を有する抗生物質である cortalcerone の類似点は、糸状菌により生産される抗生物質で、oxidase がその生合成に関与していることである。Cortalcerone は、いくつかの白色腐朽糸状菌が生産し、NecC と同様に GMC oxidoreductase ファミリーに属する pyranose oxidase が cortalcerone の生合成を触媒する (19, 20, 22, 23)。Cortalcerone はそれを産生する糸状菌を微生物の攻撃から防御する役割を果たしているといわれている (19, 20)。Nectrisine も cortalcerone のように微生物の攻撃から nectrisine を生産する糸状菌を防御する役割を果たしているのかもしれない。

3.3.4 Nectrisine の製法構築への応用

Nectrisine の商用生産プロセスを開発するためには、糸状菌からの nectrisine の抽出機構を解明することは重要である。今回の検討結果より、nectrisine が生成する過程は以下のように描ける：① 4-amino-4-deoxyarabinitol と NecC が加熱処理により抽出される ② 菌体外で 4-amino-4-deoxyarabinitol が NecC により nectrisine に変換される。よって、nectrisine 製造時における抽出工程においては、基質だけでなく NecC も活性を維持した状態で抽出しなければならないであろう。なお、同様の熱による抽出は白色腐朽糸状菌からの pyranose oxidase の抽出でも報告されている (24)。これらの知見は、nectrisine の工業的生産製法を *T. discophora* を用いて構築する上で、特に大スケールの場合に重要となるであろう。

3.4 小括

本章では、4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine へ変換する酵素 (NecC) を精製し、その性質を明らかにすることを目的とした。始めに、nectrisine への変換活性を指標に NecC を精製した。次に、LC-MS/MS 解析で本酵素のアミノ酸配列の一部を推定し、NecC は GMC oxidoreductase ファミリーと相同性があることがわかった。NecC はフラビン骨格を有する補因子を含有し、オリゴマーを形成していることが示された。また至適 pH、至適温度などの反応特性も明らかにした。最後に、4-amino-4-deoxyarabinitol から nectrisine への変換反応は菌体から抽出後に *in vitro* で主に起こることを示して、nectrisine 製造時における抽出工程においては、基質だけでなく NecC も活性を維持した状態で抽出しなければならないことを提言した (25)。

3.5 引用文献

1. **Miyauchi R, Takatsu T, Suzuki T, Ono Y, Shiba Y.** 2015. Biosynthesis of nectrisine in *Thelonectria discophora* SANK 18292. *Phytochemistry* **116**:87–93.
2. **Ishizuka T, Fujimori I, Kato M, Noji-Sakikawa C, Saito M, Yoshigae Y, Kubota K, Kurihara A, Izumi T, Ikeda T, Okazaki O.** 2010. Human carboxymethylenebutenolidase as a bioactivating hydrolase of olmesartan medoxomil in liver and intestine. *J Biol Chem* **285**:11892–11902.
3. **Kubota K, Wakabayashi K, Matsuoka T.** 2003. Proteome analysis of secreted proteins during osteoclast differentiation using two different methods: two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tags analysis with two-dimensional chromatography. *Proteomics* **3**:616–626.
4. **Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH.** 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**:D192–6.
5. **Dijkman WP, de Gonzalo G, Mattevi A, Fraaije MW.** 2013. Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:5177–

5188.

6. **Ghisla S.** 1980. Fluorescence and optical characteristics of reduced flavins and flavoproteins. *Methods Enzymol* **66**:360–373.
7. **Schägger H, Cramer WA, von Jagow G.** 1994. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* **217**:220–230.
8. **Schägger H, von Jagow G.** 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* **199**:223–231.
9. **Klei IJ Van Der, Bystrykh LV, Haeder W.** 1990. Alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha* MIE 4732. *Methods Enzymol* **188**:420–427.
10. **Soldevila AI, Ghabrial SA.** 2001. A novel alcohol oxidase/RNA-binding protein with affinity for mycovirus double-stranded RNA from the filamentous fungus *Helminthosporium (Cochliobolus) victoriae*: molecular and functional characterization. *J Biol Chem* **276**:4652–4661.
11. **Kimura T, Nakagawa K, Saito Y, Yamagishi K, Suzuki M, Yamaki K, Shinmoto H, Miyazawa T.** 2004. Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection. *J Agric Food Chem* **52**:1415–1418.
12. **Frederick KR, Tung J, Emerick RS, Masiarz FR, Chamberlain SH, Vasavada A, Rosenberg S, Chakraborty S, Schopfer LM, Schopfer LM.** 1990. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme. *J Biol Chem* **265**:3793–3802.
13. **Kiess M, Hecht H-J, Kalisz HM.** 1998. Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur J Biochem* **252**:90–99.
14. **Boteva R, Visser AJWG, Filippi B, Vriend G, Veenhuis M, van der Klei IJ.** 1999. Conformational transitions accompanying oligomerization of yeast

-
- alcohol oxidase, a peroxisomal flavoenzyme. *Biochemistry* **38**:5034–5044.
15. **Vonck J, van Bruggen EFJ.** 1990. Electron microscopy and image analysis of two-dimensional crystals and single molecules of alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha*. *Biochim Biophys Acta - Protein Struct Mol Enzymol* **1038**:74–79.
 16. **Kato N, Omori Y, Tani Y, Ogata K.** 1976. Alcohol oxidases of *Kloeckera* sp. and *Hansenula polymorpha*. *Eur J Biochem* **64**:341–350.
 17. **Soldevila AI, Havens WM, Ghabrial SA.** 2000. A cellular protein with an RNA-binding activity co-purifies with viral dsRNA from mycovirus-infected *Helminthosporium victoriae*. *Virology* **272**:183–190.
 18. **Ozimek P, Veenhuis M, van der Klei IJ.** 2005. Alcohol oxidase: a complex peroxisomal, oligomeric flavoprotein. *FEMS Yeast Res* **5**:975–983.
 19. **Wongnate T, Chaiyen P.** 2013. The substrate oxidation mechanism of pyranose 2-oxidase and other related enzymes in the glucose-methanol-choline superfamily. *FEBS J* **280**:3009–3027.
 20. **Giffhorn F.** 2000. Fungal pyranose oxidases: occurrence, properties and biotechnical applications in carbohydrate chemistry. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**:727–740.
 21. **Segrest JP, Jackson RL.** 1972. Molecular weight determination of glycoproteins by polyacrylamide gel electrophoresis in sodium dodecyl sulfate. *Methods Enzymol* **28**:54–63.
 22. **Pazarlioglu NK, Erden E, Ucar MC, Akkaya A, Sariisik AM.** 2012. Batch production of pyranose 2-oxidase from *Trametes versicolor* (ATCC 11235) in medium with a lignocellulosic substrate and enzymatic bleaching of cotton fabrics. *World J Microbiol Biotechnol* **28**:1523–1531.
 23. **Artolozaga MJ, Kubátová E, Volc J, Kalisz HM.** 1997. Pyranose 2-oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* - further biochemical characterisation. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**:508–514.
 24. **Schafer A, Bieg S, Huwig A, Kohring G, Giffhorn F.** 1996. Purification by immunoaffinity chromatography, characterization, and structural analysis of a

thermostable pyranose oxidase from the white rot fungus *Phlebiopsis gigantea*.
Appl Environ Microbiol **62**:2586–2592.

25. **Miyauchi R, Sakurai H, Shiba Y.** 2016. Characterization of a novel oxidase from *Thelonectria discophora* SANK 18292 involved in nectrisine biosynthesis. AMB Express **6**:6.

4. Nectrisine 生合成遺伝子の同定と機能解析

4.1 緒言

イミノ糖である Nectrisine は、3 つの不斉炭素原子を保持しており、例えば D-arabinose や D-serine、butadiene monoepoxide を出発物質として化学合成できる (1-6)。しかし、高純度な医薬品レベルの nectrisine を合成する場合、その合成の収率が低いことと出発物質の原価が高いことなどからその合成コストは高いと見積もられる。原価低減のためには、微生物による nectrisine の直接生産あるいは *in vitro* での酵素反応を用いた合成が魅力的である。しかし、nectrisine の生合成に関与する酵素や遺伝子も知られていなかった。一般に、イミノ糖類は様々な病気の治療に用いることができる可能性を潜在的に有しているものの、それらの生合成遺伝子に関する情報は非常に限られている。そこで、2 章では *T. discophora* における nectrisine の生合成経路を菌体レベルで解析し、4-amino-4-deoxyarabinitol を生合成中間体として同定した (7)。さらに、3 章において 4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine へ変換する酵素 (NecC) を *T. discophora* から精製し、その特性を解析した (8)。また、NecC のアミノ酸配列の一部が LC-MS/MS により推定された。しかし、*necC* 遺伝子についての情報は得られていなかった。また、nectrisine の生合成において *necC* による反応以外の反応ステップを触媒する酵素をコードする遺伝子群も明らかになっていなかった。

そこで本章では nectrisine 生合成遺伝子の全貌を明らかにすることを目的とした。まず、3 章で推定された部分アミノ酸配列を手がかりとして *T. discophora* のゲノム DNA ライブラリーより *necC* 遺伝子全長を取得した。次にゲノム上の *necC* 遺伝子座周辺の遺伝子から nectrisine 生合成遺伝子の候補を選抜した。そして、これらの遺伝子の機能を遺伝子破壊と相補及び大腸菌による発現で検証した。

4.2 実験方法と結果

4.2.1 ヌクレオチドのアクセッション番号

NecA、*necB*、*necC* の各ゲノム DNA 配列は、オープンリーディングフレームを指定して、EMBL/GenBank/DDBJ データベースにそれぞれ LC150594、LC150595、LC056029 として登録された。また、*GabT1*、*yktC1*、*gutB1* は、*Bacillus amyloliquefaciens* のゲノム (アクセッション番号：CP000560) に含まれている。

4.2.2 糸状菌の株と培養条件

本研究では、*T. discophora* SANK 18292 (JCM 30947) を使用した。*T. discophora* の培養は 3.2.1 節と同様に行った。*T. discophora* のコロニーは Potato Dextrose Agar (PDA) (日水製薬) 培地または Yeast Mold Agar (YMA) (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) 培地で培養した。

4.2.3 細菌の株と核酸の取り扱い及び PCR 用プライマー

Escherichia coli JM109 はタカラバイオ社より、*E. coli* XL1-Blue MR はアジレント・テクノロジー社より購入し、プラスミド構築と調製のために使用した。また、*E. coli* BL21 (DE3) (Merck Millipore, Billerica, MA) を用いて組換え蛋白質を生産した。*E. coli* を用いた一般的な組換え DNA 技術や培地、生育条件は標準的な方法を用いた (9)。本章で用いた PCR プライマーを Table 4-1 に示した。

Table 4-1 PCR primers

Name	Sequence (5'-3')
AO1L-f	AAIISICCGAIGGIAAIGARWSIGTITAYGAYGC
AO3L-r	ACITAITAIATRTCRTGRTCCATIARNCC
AO2L-f	TAYGTIGGIGGCCIGTITAYTGYGTIGGNGG
<i>Nde</i> I-AO-f	AGATATACACATATGGATCATCTTCTCCATATCGACA
AO- <i>Sal</i> I-r	ATAGT <u>CGACT</u> TTGAGCGTCGTTTCCAATCTTC
EcoRI-Ppgk1-f	CCCGAATTCATGCCAAGTGAGATGAAG
HindIII-Ppgk2-r	CCCAAGCTT <u>GATTG</u> TTTGTGGAGGAGA
KpnI-dis1-f	ATATGGTACC <u>ACTTCA</u> ACCGCGGAGCGAGCAACTC
BglII-dis2-r	ATATAGATCTAGATCGGTATCGACGACTCCGTCTC
KpnI-ATdis1-f	ATATGGTACC <u>CAACG</u> TAGCCTACTGCCACCCAGGC
BglII-ATdis2-r	ATATAGATCTGCGTAGCCGTCGTACGTGCCCCCG
KpnI-AKdis1-f	CGATATAATGGTACCACCACGCCGAGATTCGCGTCAAGGC
BglII-AKdis2-r	GCATTATATAGATCTAGTAAAAGCCAGGGAAGCCCCGGAA
MluI-AOcomp1-f	ATATACGCGTTGATGGGGGACACGGGAAAGAATGT
AOcomp2-BglII-r	ATATAGATCTAGGTGGATGAATTTGATGGCGGGGA
NotI-ATcomp1-f	ATATGCGGCCGCTGGCCATTGTGACTCGACTCACTCG
ATcomp2-Kpn1-r	ATATGGTACCAGAGGCCAGACCGTTCCAACCAACC
KpnI-AKdis1-f	CGATATAATGGTACCACCACGCCGAGATTCGCGTCAAGGC
BglII-AKdis2-r	GCATTATATAGATCTAGTAAAAGCCAGGGAAGCCCCGGAA
BamHI-AK-f	GCATATAATGGATCCGATGACCGACATCCCGTTCGTGCAGC
AK-HindIII-r	CGATTATATAAGCTTTCACGGGGCTGCCCATCTTTCCTCT
<i>Nde</i> I-AT-f2	CGATATAATCATATGGGTTCCCAAGGTCCAAAGAACA
AT-HisKpnI-r	CGATTATATGGTACCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGAACG GCGCACACCTTGGTAGTCACC
BamHI-AO-f	ATATGGATCCAATGGATCATCTTCTCCATATCGACA
AO-NotI-r	ATATGCGGCCGCTATTGAGCGTCGTTTCCAATCTTC

Underlined texts denote the restriction site sequences.

4.2.4 *necC* 遺伝子のクローニング

3章において、LC-MS/MS分析により *NecC* のアミノ酸配列の一部が推定された。この配列を手がかりに、まず *T. discophora* DNAよりPCRで *necC* DNA断片を得、さらにDNAライブラリーをスクリーニングして *necC* 遺伝子全長の取得を試みた。

4.2.4.1 *necC* 遺伝子断片のクローニング

T. discophora 培養液を遠心し、上清を除いた後、0.9 M NaCl aq. で洗浄した。この菌体を液体窒素で凍結させ乳鉢で粉碎した。この菌体から Dneasy Plant Kits (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。

LC-MS/MS 分析で得られた 9 個の部分アミノ酸配列のうちの 4 個の配列から縮重プライマーを 5 種類作成した。5 組のプライマー対を用いて PCR を行ったところ、3 組で目的のサイズの PCR 産物が検出された。このうちの 1 組の縮重プライマー、AO1L-f と AO3L-r を用いた Polymerase chain reaction (PCR) は、各プライマーを 16 μ M ずつ使用して Expand high fidelityplus PCR system (Roche) を用いて (94°C for 2 min) \times 1、(94°C for 15 sec、52°C for 30 sec、72°C for 75 sec) \times 30、(72°C for 7 min) \times 1 の条件で行った。PCR 産物をアガロースゲル電気泳動し、予想されるサイズ (717 bp) のバンドを切り出して Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen) で精製した。次に、この PCR 産物をテンプレート、縮重プライマーは AO2L-f と AO3L-r を用いて、Expand high fidelity PCR system (Roche) にて、(94°C for 2 min) \times 1、(94°C for 15 sec、54°C for 30 sec、72°C for 45 sec) \times 10、(94°C for 15 sec、54°C for 30 sec、72°C for 45 sec+5 sec/cycle) \times 15、(72°C for 7 min) \times 1 の条件で nested PCR を行った。得られた PCR 産物は精製後、pDrive Cloning Vector (Qiagen PCR Cloning Kit; Qiagen) に組み込み、*E. coli* JM109 に導入した。カルベニシリン 100 mg/L を含む LB 寒天培地に塗布して 37°C で 14-16 時間培養した。得られたコロニーをカルベニシリン 100 mg/L を含む LB 液体培地 2 mL 中に懸濁して 37°C で 14-16 時間培養後、DNA 自動分離装置 (クラボウ) でプラスミドを抽出した。このプラスミドを *Eco*RI (Takara bio) で消化し、電気泳動でインサートの有無を確認した。

インサートが確認できたクローンについて Dye Terminator Cycle Sequencing System with AmpliTaq DNA polymerase (Applied Biosystems) と 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いてシーケンス解析した。得られた塩基配列より演繹されるアミノ酸翻訳配列は、LC-MS/MS 解析によって推定されたアミノ酸配列と一致した。よって、目的の酵素の遺伝子断片が得られたと判断した。

4.2.4.2 *T. discophora* ゲノム DNA ライブラリーの構築とスクリーニング

T. discophora の粉碎菌体から Dneasy Maxi Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出した。ただし、キット付属の QIAshredder は用いず、フェノール/クロロホルム処理を行った。得られたゲノム DNA 100 μ g を 2 Unit の *Mbo*I で 37°C、4 分間部分消化し、calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) で脱リン酸化した。これを、*Xba*I 消化、CIAP を用いた脱リン酸化処理後 *Bam*HI 消化したコスミドベクター (Supercos1; Stratagene) に組み込んだ。Gigapack III Gold packaging extract (Stratagene) を用いてこれらの DNA をメーカーの説明に従ってパッケージングした。この組み換えファージを *E. coli* XL1-Blue MR (Agilent Technologies) に感染させた。

本ゲノムライブラリーから約 50000 コロニーを Amersham Hybond-N+ メンブレンフィルター (GE healthcare) にブロットした。そして、Dig High Prime (Roche) を用いて digoxigenin (DIG) 標識した *necC* DNA 断片と Dig easy hyb (Roche) 溶液中で 43°C で 14-16 時間置くことでハイブリダイゼーションさせた。このメンブレンは 0.5×SSC、0.1% SDS で 55°C にて洗浄し、CDP-Star (Roche) で DIG に起因するシグナルを検出した。この陽性コスミド、RB185 は、*EcoRI* と *BamHI* で個別に消化後、pUC118 *EcoRI*/BAP ベクターまたは pUC118 *BamHI*/BAP ベクター (Takara bio) に組み込みサブクローニングした。この DNA 断片のシーケンスを解析して得られた配列を Genetyx ソフトウェア (Genetyx) で元の DNA 配列に再構成した。

データベース検索によりコスミド RB185 に含まれる *necC* 遺伝子全長配列を推定した。また、*necC* のゲノム DNA と cDNA を比較することによりイントロンを推定した (Figure 4-1 小文字部)。イントロンは全長遺伝子中に一つ挿入されており、その長さは 50 bp であった。このイントロンは糸状菌の 5'-splice 部位及び 3'-splice 部位のコンセンサス配列 (5'-GTDHSY 及び 5'-YAG。ここで D=A, G, or T; H=A, C, or T; S=C or G; Y=C or T) (10) に一致した。本タンパク質のアミノ酸残基数は 558 であり、等電点計算値は 5.5、推定分子量は 61303 で、SDS-PAGE で観測された分子量に近かった。また、潜在的 N 型糖付加サイトである (Asn-X-Ser/Thr) 配列 (11) を 3 箇所、Asn-62、-79、-547 に保持していた。

NecC アミノ酸配列について EMBL/GenBank/DDBJ データベースを BLAST プログラム (12) で検索したところ、推定 fungal glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductase と 65% の相同性を示した。構造が実験的に決定されたタンパク質中には、NecC に高い相同性を示す配列は見られなかった。NCBI の conserved domain database (13) で NecC に含まれる保存されたドメイン配列を検索したところ、Adenosine diphosphate (ADP) 結合ドメイン (pfam13450) が特異的にヒットした。ADP 結合 $\beta\alpha\beta$ -フォールドモチーフである N 末端付近の GXGXXG 配列は GMC oxidoreductase のような FAD 結合タンパク質に保存されている (14-16)。NecC においては、27 から 32 番のアミノ酸残基である GSGFGG 中にこの保存された 3 つのグリシン残基を認めた。

```

1  ATGGATCATCTTCCATATCGACATTGACGTCGTGAGCTACCTGACCAAGCTGAACGCCATGACTACATCATCGTAGGCAGTGGCTTC   90
   M D H L L H I D I D V V S Y L T K L N A Y D Y I I V G S G F

91  GCGGAGGTCCTTTCGCGAAGTCTCGCTCAGAGGAAGAAGGTCCTGTTGATCGAGCGCGGAGGCGTCATCTTCTCCAGCAGCTC   180
   G G G P L A E V L A Q R K K K V L L I E R G G V I F S T H V

181 CTCAACACGTCGCGACCTTACTTCAACCGGAGCGAGCAACTCGCCGAGGGCAACGAGAGCGTCTACGATGCCGTCAAGGCCAAGGTG   270
   L N T S R P Y F N R G A S N S P E G N E S V Y D A V K A K V

271 CAGACCACCGAGGGCTCCGAGTCTACATTGGAGGCCCGCTACTGCGTCGCGCGCCGATCCAACCTCTGGGGCATCTGGACCCCCAG   360
   Q T T E G S E S Y I G G P V Y C V G G R S N L W G I W T P Q

361 GTCAGCGAGGGCACCCCTGAACAAGTACTACCTCCCGAGATTGCTCGTTCCTCCGCGAGGGCGAGGGCTACCGGACCGCTTCAACTTC   450
   V S E G T L N K Y Y P P E I A S F L R E G E G Y R T A F N F

451 CTCACCACAGCTCTCAGCAGGATGCCATCTATCTCTCGAGAGCGGCCAGATCACGGCCACGAGATCGACGAGTCAAGGCCAAGCTT   540
   L T D S S Q Q D A I Y P L E S G Q I T A N E I D E V K A K L

541 CACGCGCGCGTGGGCGTCACGTTTATCTCATGCCCCTGGCGGCCAGTTCACGCCCCCGCCCTACCAGTTCCTCCAGGGCGCCCTAC   630
   H A A V G V T F D L M P V A A Q F N A P A P Y Q F P Q G A Y

631 AGCACCACGCTGAACCTGATGAACCGCATGTACGCCAACGACCCGCTACTTACCGTTCTCCTCAACACCGAGGTCGTGGCCTTGGACCA   720
   S T T L N L M N R M Y A N D R Y L T V L L N T E V V A L D C

721 ACCGAGAGCAGCACCTTgtgagttcccactgctgtttcacacacaaatgctgactgacccctgaccagCCGCGAGGCGTGAATGCTCTCA   810
   T E S S T F                               R R S V N A L K

811 AGGTCGAGACGTC AAGGACCGGAGATCAAGAAGCTCGACGTCGGCAACGCCAAGGTCATTCTCTCGCGCGAACCATTGGCACCGCCT   900
   V R D V K D R E I K K L D V G N A K V I L S A G T I G T A S

901 CCATTGCCCTGACCAAGTGGTCTCCAGCACCTCAACCCGCTCGTCCGCGGAGGCATCATGGACCACGACATTACTACGTCGCTTCGGCA   990
   I A L T S G L Q H L N P L V G R G I M D H D I Y Y V R F G I

991 TCGAGCAGCTCCCCGACATCACTCGCAAGCCGTTGAACCTCAAGAGCGTCATCGAGATTGAGGGCGAGACGGTTCCTGACCGTGACCG   1080
   E Q L P D I T R K P L N L K S V I E I E G E T V L L T V T V

1081 TCAACGCCAACTTCTTCTCGTGGCAGCTCGGCCTCGTCCGACCCAGCAGTACTACCTCCGAAACGGTGAAGTCTCTCCCCAAGA   1170
   N A N F F L A G S S A S L P T T Q Y Y L R N G E L L S P K K

1171 AGGGTTCGAGAACCAGGAGAACTTTGACACCGTCTGCTGCTGTTTCGAGTTTGTCCGAAGACTCGACGACCCGCAACGAGGTGGTCAACC   1260
   G F E N Q E N F D T V C V L F E F V G R L D D R N E V V N L

1261 TCCCCGGATGACCCGGTCCCTCAGCATCCAGCAGCCCCCGTCAAGCAGGTCGTCATGTCTGGCATGGAAGACATCATCCGCAAGGTTA   1350
   P G M D P V L S I Q R P P V K Q V V M S G M E D I I R K V R

1351 GGAACATCTTCTGTTGAGGATGTCAACACGTCGCCAGTACGACCCCTCTGCCCCAGCACATGGGCTTCGGAGTCTTCTCTCACG   1440
   N I F V F E D V N H V A Q Y G P P L P Q H M G F G V F S H E

1441 AGGCCGGAACCATGCGCATGGACAACCCCAACGGAGACGGAGTCTCGATACCGATCTCCGGTCAAGGGCTTCGACAACCTGTGGGCT   1530
   A G T M R M D N P N G D G V V D T D L R V K G F D N L W A C

1531 GTGACATGTCGCTTCTCCCGTCCAGCCCCGAGGCCAACCCGCTCTCACTCTCGCCGCTTGTCACTGCGACTGGCCGACCACTGTGCG   1620
   D M S V F P V S P E A N P A L T L A A L S L R L A D H L S P

1621 CCCCCGAGCCGAGATCCAGCCTTTGGTCCAGCAGGACATCCCCATCCTCAAGACCATCAATGGGAAGAATGGAACCGGCGAGAAGATTG   1710
   P E P E I Q P L V Q Q D I P I L K T I N G K N G T G E K I G

1711 GRAACGACGCTCAATAG   1727
   N D A Q *

```

Figure 4-1 The sequence of necC from *T. discophora*.

Coding DNA sequence and introns are shown in capital letters and lowercase letters, respectively. The deduced amino acid sequence is indicated below the coding sequence. Potential N-linked glycosylation sites of the conserved sequence, NX (S/T), are underlined.

4.2.5 *necC* 遺伝子の大腸菌発現による機能検証

同定した *NecC* 配列が正しいか検証するため、大腸菌にて *NecC* を生産し、得られた *NecC* の酵素活性を確認した。

4.2.5.1 *necC* 遺伝子の大腸菌による生産と精製

T. discophora の全 RNA を、上述のように凍結して乳鉢ですりつぶした細胞から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) と RNase-Free DNase Set (Qiagen) を用いて抽出した。この RNA を ReverTraAce- α - と Oligo (dT) 20 プライマー (Toyobo) を用いてメーカーの説明書に従って逆転写した。そして、2 種類のプライマー、*NdeI*-AO-f と AO-*SalI*-r、及び Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) を用いて (98°C for 30 sec) \times 1, (98°C for 10 sec, 60°C for 20 sec, 72°C for 60 sec) \times 30 cycles, (72°C for 7 min) \times 1 の条件で *necC* cDNA を PCR 増幅した。この PCR 産物を *NdeI* と *SalI* で消化し、同じく *NdeI* と *SalI* で消化した pET21b ベクター (Merck) に組み込んだ。得られたプラスミドは pET21b*necC* と名付けた。これを *E coli* BL21 (DE3) (Merck) に導入し、100 mg/L のアンプシリンを添加した 2 \times YT 培地 (Life Technologies) 中、OD₆₀₀ が 1.0 になるまで 37°C、170 rpm で培養後、isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG) を終濃度が 0.4 mM になるように添加して *necC* 遺伝子の発現を誘導し、さらに 16°C、170 rpm で 21 時間培養した。遠心して細胞を回収し、100 mM リン酸ナトリウム、300 mM NaCl、pH 7.8 に再懸濁した。凍結融解後、氷上で超音波により細胞を破碎し、遠心して得た上清にグリセロールを 5% 添加した。これを 20 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl、30 mM imidazole、pH 7.4 (バッファーA) で 10 倍希釈し、流速 5 mL/min で AKTAexplorer 10S クロマトグラフィーシステム (GE Healthcare) を用いて Ni sepharose カラム (HisTrap HP、GE ヘルスケア) に添加した。吸着したタンパク質は 20 mM リン酸ナトリウム、500 mM NaCl 500 mM imidazole、pH 7.4 (バッファーB) のグラジエント溶出、0 \rightarrow 100% B for 20 column volumes (CV)、で溶出させた。得られたタンパク質は phosphate buffered saline (PBS) (Takara Bio) に透析した。

4.2.5.2 Nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol の LC-MS 分析

Nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol を HPLC で検出、分離するため、サンプルを 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) (Dojindo Laboratories) (17, 18) で標識した。菌体抽出液 20 μ L に 10 μ L の NaBH₄ 水溶液 (1 mg/mL) を添加し、nectrisine を 1、4-Dideoxy-1、4-imino-D-arabinitol (DAB) へ変換した。これに 2 g/L NBD-F-メタノール溶液を 60 μ L と 100 mM ホウ酸バッファー、pH 8.2 を 10 μ L 加え、60°C で 2 分間加熱後、ただちに室温へ冷却し、0.5 M HCl 水溶液を 10 μ L 添加した。

LC-photo diode array-positive electrospray ionization-mass spectrometry (LC-PDA-ESIMS) は Acquity UPLC システムと Synapt G2-S 質量分析器 (Waters) で行った。NBD 標識した

サンプルを Unison UK C18 4.6 × 150 mm カラム (Imtakt) に流速 1 mL/min、オープン温度 30°C で注入した。移動相 A は 10 mM NH₄CO₂H/2.2 mM HCO₂H 水溶液、移動相 B は 2.2 mM HCO₂H/CH₃CN 溶液で、10% B for 8 min、10→90% B for 20 min、90% B for 2 min のプログラムでグラジエント溶出した (8)。

4.2.5.3 *necC* 遺伝子の大腸菌発現による機能検証

遺伝子組換え大腸菌で生産した His タグ融合 NecC (NecC-His) は SDS-PAGE で単一のバンドを与えた。その分子量は分子量マーカーとの比較により 62 kDa と推定され、この値は分子量の計算値と一致した。4-amino-4-deoxyarabinitol 水溶液に NecC-His を添加して 15°C で 12.5 時間置くと、nectrisine が増加した (Figure 4-2)。一方、この酵素を添加しなかった場合は、nectrisine は増加しなかった。ここで、nectrisine は LC-PDA-ESIMS 分析により保持時間と分子量で同定した。以上より、大腸菌で生産した NecC はカビの NecC と同様に 4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine へ変換活性を有しており、組換え大腸菌に導入した *necC* 遺伝子が正しい配列であることが示された。

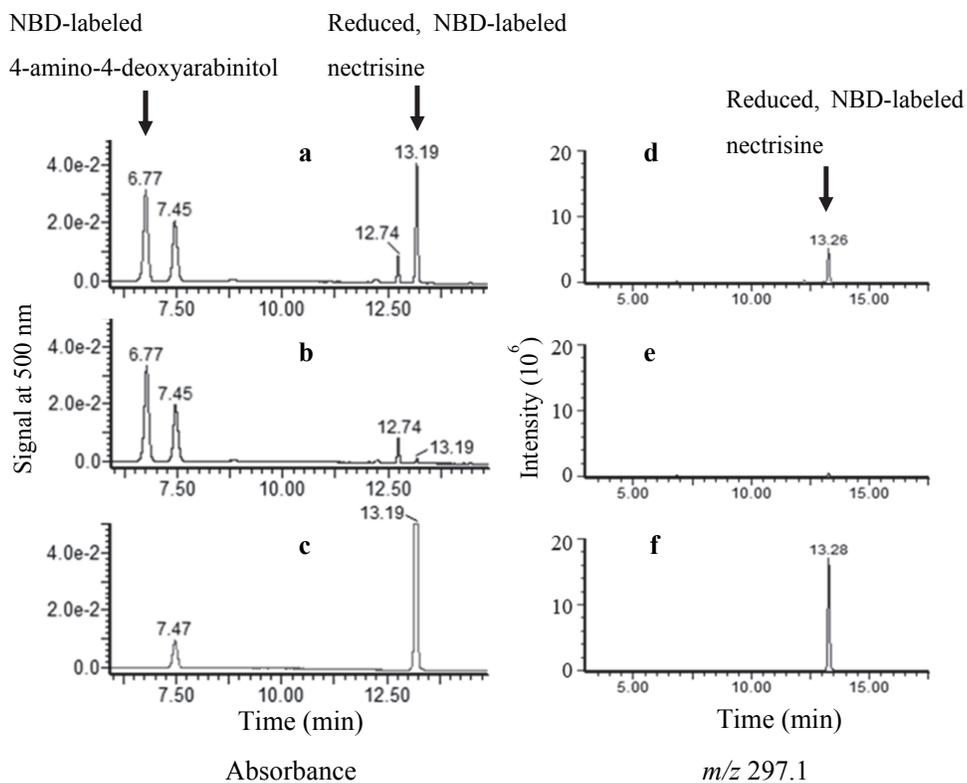


Figure 4-2 Conversion of 4-amino-4-deoxyarabinitol to nectrisine with His-tagged NecC expressed by recombinant *E. coli*.

a, b, and c, Absorbance chromatograms; **d, e, and f**, the extracted MS chromatograms for m/z 297.1 which is the $[M+H]^+$ ion for reduced and NBD-labeled nectrisine. Conversions of 4-amino-4-arabinitol in the presence (**a and d**) or absence (**b and e**) of the recombinant NecC are shown. For reference, chromatograms of reduced and NBD-labeled nectrisine which is equal to NBD-labeled 1,4-Dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol are depicted in **c and f**

4.2.6 *necC* 周辺のゲノム DNA 配列の解析

イミノ糖である deoxynojirimycin や多くの糸状菌由来 2 次代謝産物の生合成遺伝子はクラスター化していることから (19–24)、necrisine 生合成遺伝子群もクラスター化していると推測した。よって、necrisine 生合成遺伝子は、*necC* 周辺に存在すると考え、*necC* 周辺のゲノム DNA を調査することとした。

ここで、*necC* はコスミド RB185 の 3'末端付近に存在していたため、NecC の 3'末端以降の配列が不明であった。そこで、この部分の配列を得るため、プラスミドを用いた *T. discophora* のゲノム DNA ライブラリーも以下に示すように構築した。*Hind*III 消化されたゲノム DNA をアガロースゲル電気泳動し、正に帯電したナイロンメンブレン (Roche Diagnostics) にブロットした。DIG 標識したコスミド RB185 の 3'末端領域断片 (199 bp) とこのブロット上の DNA とのハイブリダイゼーションによりアガロースゲル上での陽性の DNA の位置を確認した。次に検出した陽性バンドをアガロースゲルより回収して *Hind*III/BAP ベクターへ組み込み、それらが大腸菌に導入した。そして上記のプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションにより *necC* の 3'末端以降の DNA 配列を含むプラスミドをスクリーニングした。

得られたコスミド RB185 と RB246 及びプラスミド RB237 は *necC* 遺伝子を含むひと続きのゲノム DNA を形成した (Figure 4-3)。データベース検索の結果、5 つの open reading frame (ORF) が *necC* 近傍に見出され、それらは、糸状菌に特異的な転写因子 (ORF1)、aminotransferase (ORF2)、phosphotransferase (ORF3)、transporter (ORF4) と推定された (Table 4-2)。ここで、アミノ酸配列の相同性と類似性は Discovery Studio ソフトウェア ver. 4.0 (Dassault Systemes Biovia) で計算した。ORF5 は oxidase をコードする *necC* と一致した。ORF5 の下流に位置する ORF6 と ORF7 は、データベースに登録されているアミノ酸配列と高い相同性を示さなかったため、それらの機能は推定できなかった。Aminotransferase は Pfam database (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) においてシーケンスのマルチプルアライメントに基づいて 5 つのサブグループに分けられている (25)。*necA* は、class III aminotransferase と相同性が高かった。Class III aminotransferase には、acetylornithine aminotransferase、ornithine aminotransferase、 ω -amino acid aminotransferase、4-aminobutyrate aminotransferase などが属している。ORF3 は choline/ethanol amine kinase と相同性を示した。

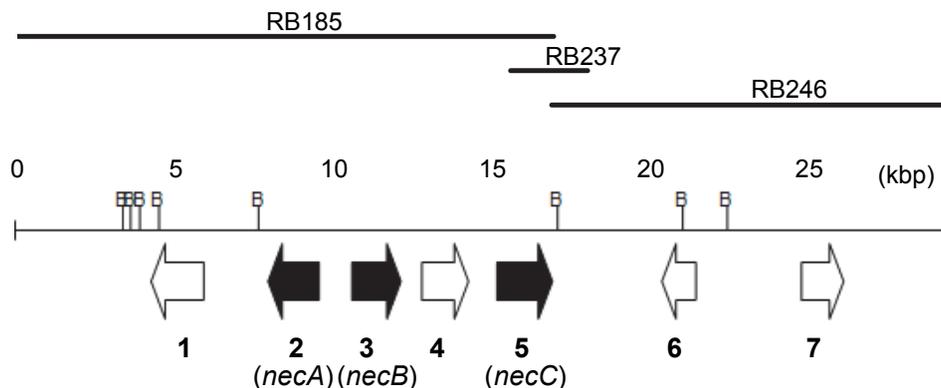


Figure 4-3 The nectrisine biosynthetic gene cluster.

The restriction endonuclease map, inserted positions of cosmid RB185, cosmid RB246 and plasmid RB237, and localization of genes are shown. The *arrows* indicate the putative direction of transcription based on sequence analysis and homology searches. Abbreviation: B, *Bam*HI.

Table 4-2 Deduced function of enzymes encoded in the nectrisine biosynthetic cluster

Gene	Homologous protein (protein, origin, accession no.)	Putative function	No. of amino acids	% Identity/ Similarity
ORF1	FVEG_12058, <i>Fusarium verticillioides</i> (EWG53678)	Transcription factor	-	-
ORF2 (<i>necA</i>)	FPSE_08018, <i>Fusarium pseudograminearum</i> (XP_009259411)	aminotransferase	487	72/86
ORF3 (<i>necB</i>)	AOL_s00078g295, <i>Arthrobotrys oligospora</i> (XP_011121860)	phosphotransfer ase	382	48/69
ORF4	Predicted protein, <i>Nectria haematococca</i> (XP_003042865)	MFS transporter	-	-
ORF5 (<i>necC</i>)	FVEG_12711, <i>Fusarium verticillioides</i> (EWG54502)	Oxidase	559	65/80

第2章での生合成経路の解析により、nectrisine 生合成反応には NecC による酸化の他にアミノ化と脱リン酸化反応が含まれていると示唆されていた (7)。よって、ORF5 (*necC*) に加えて ORF2 (*necA*) と ORF3 (*necB*) が nectrisine 生合成遺伝子の候補であると考えた。

NecA タンパク質のアミノ酸残基数は 487 で、分子量は 52583 Da、NecB タンパク質のアミノ酸残基数は 381 で、分子量は 42600 Da であるとそれぞれの cDNA 配列より推定された。また、cDNA とゲノム DNA との比較によりイントロンを同定した。NecA のコード領域には 2 つのイントロンが挿入されており、その長さは 66 bp と 63 bp であった。一つ目のイントロンは、糸状菌の 5'-splice 部位及び 3'-splice 部位のコンセンサス配列 (5'-GTDHSY 及び 5'-YAG ; ここで、D=A、G または T ; H=A、C、または T ; S=C または G ; Y=C または T) (10) のうち一塩基を除いて一致した。2 つ目のイントロンは上記のコンセンサス配列に完全に一致した。

NecB のコード領域には 5 つのイントロンが挿入されており、それぞれの長さは、64 bp、52 bp、63 bp、66 bp、139 bp であった。糸状菌の 5'-splice 部位及び 3'-splice 部位のコンセンサス配列と各イントロンの配列の違いは、1 つ目のイントロンが 1 塩基、2 つ目が 1 塩基、3 つ目が 2 塩基、4 つ目が 1 塩基であり、5 つ目は完全に一致した。

4.2.7 *T. discophora* 形質転換系の確立

4.2.7.1 遺伝子破壊・相補のための基本ベクターの構築

プラスミド pSAK2000 (26) のマルチクローニングサイトが逆向きに構成されたプラスミドである pSAK451 を馬場悟史博士 (第一三共株式会社) より頂き、このプラスミドから遺伝子破壊・相補用のプラスミド pNEC001 を作製した。*T. discophora* の phosphoglycerol kinase (*pgk*) 遺伝子のプロモーター領域をまずクローニングした。この配列を *T. discophora* DNA より Expand High Fidelity PCR System (ロシュ・ダイアグノスティックス社)、EcoRI-Ppgk1-f プライマー、HindIII-Ppgk2-r プライマーを用いて PCR により増幅した。PCR の条件は、(94°C for 2 min; 10 cycles of 94°C for 15 s, 50°C for 30 s, 72°C for 55 s; 15 cycles of 94°C for 15 s, 50°C for 30 s, 72°C for 55 s + 5 s per cycle; 72°C for 7 min) とした。この PCR 産物を EcoRI と HindIII で切断し、pSAK451 のプロモーター領域と置換して得られたプラスミドを pNEC001 と名付けた。このプラスミドは neomycin phosphotransferase 遺伝子を Geneticin/G418 耐性のために保持している。次に、ハイグロマイシン B 耐性を付与するため、pNEC001 の neomycin phosphotransferase 遺伝子を pSAK1000 (27) より得た大腸菌由来 hygromycin B phosphotransferase 遺伝子と置換した。得られたプラスミドを pNEC002 と名付けた。

4.2.7.2 形質転換系の検討

G418 またはハイグロマイシン B による形質転換体の選別が可能か確認するため、*T.*

discophora を G418 またはハイグロマイシン B を終濃度で 10 mg/L 含む PDA 培地で 23°C 6 日間培養した。*T. discophora* の生育は認められなかったため、*T. discophora* は G418 またはハイグロマイシン B に感受性であると判断した。

次に、等張成分の影響を確認した。G418 またはハイグロマイシン B を終濃度で 100 mg/L 含む YMA 培地に等張成分として 0.6 M KCl/50 mM CaCl₂ を加えた場合、*T. discophora* は生育した。よって、0.6 M KCl/50 mM CaCl₂ 存在下では、G418 又はハイグロマイシン B の抗菌活性が F-10058 株に対して発揮されないと示唆された。

そこで、他の等張成分として 1.2 M sorbitol、1 M glucose、0.6 M sucrose、1 M sucrose をそれぞれ単独で用いた場合を検討した。いずれの場合も、*T. discophora* は G418、ハイグロマイシン B に感受性であり、これらの等張成分は *T. discophora* 形質転換体の選別で使用できることが示された。

Yatalase 処理によって得た *T. discophora* のプロトプラストに pNEC001 を導入して G418 耐性遺伝子を保持する形質転換体を得、上記の 1.2 M sorbitol または 1 M glucose、0.6 M sucrose、1 M sucrose、及び G418 を添加した培地で培養したところ、1 M sucrose を用いた場合にプロトプラストからの再生率が良好であった。また、ハイグロマイシン B 耐性遺伝子を有する pNEC002 が導入されたプロトプラストも 1 M sucrose を等張成分としたハイグロマイシン B 入りの培地で良好に再生した。よって、プロトプラストから再生する際に用いる培地に添加する等張成分として 1 M sucrose を選択した。

4.2.8 遺伝子破壊と相補による *necA*、*B*、*C* 遺伝子の機能検証

4.2.8.1 遺伝子破壊ベクターの構築

NecC DNA 断片 (1.3 kbp) と *necA* DNA 断片 (1.2 kbp)、*necB* DNA 断片 (1.1 kbp) をプライマーセット、*KpnI*-dis1-f/*BgIII*-dis2-r、*KpnI*-ATdis1-f/*BgIII*-ATdis2-r、*KpnI*-AKdis1-f/*BgIII*-AKdis2-r、をそれぞれ用いて PCR にて増幅した。得られた PCR 産物を *KpnI* と *BgIII* で切断し、pNEC001 の *KpnI*-*BgIII* サイトにそれぞれ導入して pNEC001dis*necC* と pNEC001dis*necA*、pNEC001dis*necB* を得た。そして得られたプラスミドを *XhoI* で切断し直鎖状にした。

4.2.8.2 遺伝子相補ベクターの構築

necC 遺伝子全長を含む 3.6 kbp の DNA 配列を *MluI*-AOcomp1-f と AOcomp2-*BgIII*-r のプライマー及び Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs、東京都) を用いて PCR にて増幅した。PCR の条件は (98°C for 30 s; 30 cycles of 98°C for 10 s, 66°C for 20 s, 72°C for 2 min; 72°C for 7 min) とした。得られた PCR 産物を *MluI* と *BgIII* で切断し、pNEC002 の *MluI*-*BgIII* サイトにそれぞれ導入して pNEC002comp*necC* を得た。そして得られたプラスミドを *NheI* で切断し直鎖状にした。*necA* 遺伝子全長を含む 3.1 kbp の DNA 配列を *NotI*-ATcomp1-f と ATcomp2-*KpnI*-r のプライマー及び Phusion High-Fidelity

DNA Polymerase (New England BioLabs、東京都) を用いて PCR にて増幅した。PCR の条件は (98°C for 30 s; 30 cycles of 98°C for 10 s, 66°C for 20 s, 72°C for 2 min; 72°C for 7 min) とした。得られた PCR 産物を *NotI* と *KpnII* で切断し、pNEC002 の *NotI-KpnII* サイトにそれぞれ導入して pNEC002comp*necA* を得た。そして得られたプラスミドを *XhoI* で切断し直鎖状にした。

4.2.8.3 プロトプラストの調製と PEG を用いた形質転換

T. discophora の孢子、 6×10^7 個を GY 培地 (5% glycerol/1.6% yeast extract) 中で 23°C、16 時間、210 rpm で培養後、濾過して若い菌糸を回収し、浸透圧を調整した KC バッファー (1 M KCl/50 mM CaCl₂) で洗浄した。回収した菌糸 0.5~1.0 g を 30 mL の 2% yatalase (Takara Bio)/KC バッファーに添加し、30°C で 1 時間、50 rpm で攪拌した。これを 3GP160 ガラスフィルター (柴田科学) で濾過し、10 mL の KC バッファーで固形分を洗浄してプロトプラストを回収し、遠心して上清を除いて 100 µL に調整した。これに 15 µg (7.5 µL) のベクターを添加し穏やかに攪拌後、氷上で 10 分間置いた。これに 100 µL の PEG 液 (5% PEG3350/50 mM CaCl₂/10 mM Tris-HCl、pH 8.0) を添加しさらに氷上で 20 分間置いた後、500 µL の PEG 液を添加し室温で 10 分間置いた (28)。このプロトプラストを 5 mL の SCT バッファー (1 M sucrose/50 mM CaCl₂/10 mM Tris-HCl、pH 8.0) で洗浄後、1 mL の SCT バッファーに再懸濁させた。これを 42°C に調整された 5 mL の YMA-Soft (yeast mold (YM) broth/0.6% agar/1 M sucrose) に添加し、YMA (yeast mold (YM) broth/2% agar/1 M sucrose) プレートに重層後、23°C で 16 時間置いて菌糸を再生させた。このプレートに、80 mg/L の G418 またはハイグロマイシン B が添加された YMA-soft を 5 mL 重層し (G418 またはハイグロマイシン B の終濃度は 20 mg/L)、23°C で 3 日間培養した。

4.2.8.4 サザンハイブリダイゼーション

形質転換された *T. discophora* の DNA を *BglII*、*SphI*、*BamHI*、あるいは *HindIII* でそれぞれ切断し、1xTAE バッファーを用いてアガロースゲル電気泳動を行い、正に帯電したナイロンメンブレン (Roche Diagnostics) にブロットした。そしてこのブロット上の DNA と DIG 標識した *necC*、*necA*、*necB* とを DIG システム (Roche Diagnostics) を用いてメーカーの説明に従ってハイブリダイゼーションさせ DIG のシグナルを CDP-Star (Roche Diagnostics) で検出した。

4.2.8.5 代謝産物の抽出と LC-MS 分析

T. discophora 菌体を凍結融解後、60°C で 10 分間加熱して *T. discophora* の代謝産物を抽出した。この操作は 2 回繰り返した。得られた抽出液を遠心して上清を回収し濾過した。この抽出液中の 4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine に変換するため、抽出液を純

水で 10 倍希釈後、3 時間室温で置いた。次に陽イオン交換固相抽出カラム (OASIS MCX Plus Short Cartridge, 225 mg, Waters) を以下に示すように用いて *T. discophora* または組換え大腸菌の抽出液から Nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol を抽出した。サンプルに 0.02 mL のギ酸を添加して酸性にした後、メーカーの説明に従って平衡化した固相抽出カラムに添加した。0.2% ギ酸水溶液と 4 mL のメタノールで洗浄後、3 mL の 2% アンモニア水/メタノールを添加して代謝物をカラムより溶出させ、減圧乾燥して乾固し、0.2 mL の純水で再溶解した。

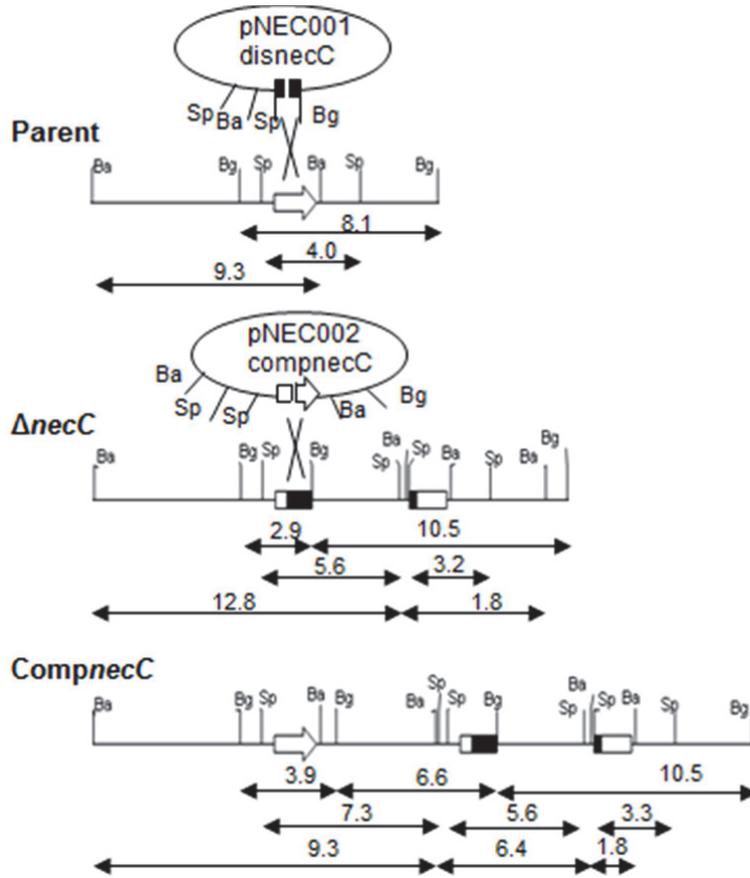
代謝物の LC-MS 分析は上記と同様に行った (8)。サンプルと nectrisine スタンダードの波長 500 nm のシグナルを比較してサンプル中の nectrisine 濃度を算出した。

4.2.8.6 *necC* 遺伝子の破壊と相補による機能検証

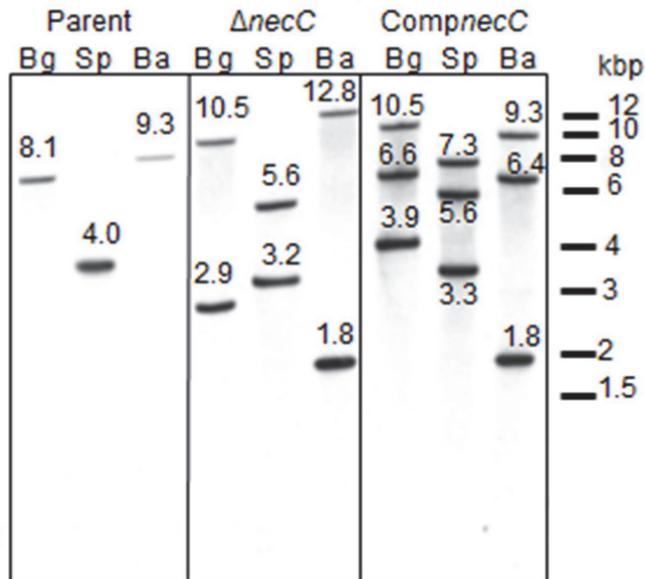
pNEC001dis*necC* プラスミドを *T. discophora* に相同組換えにより導入して *necC* を破壊した。サザンハイブリダイゼーションにより確認された *Bgl*III、*Sph*I または *Bam*HI によるゲノム DNA の切断パターンは、pNEC001*necC* が一つ挿入された場合と一致した (Figure 4-4A、B)。次に、*necC* 遺伝子全長を含んでいる pNEC002comp*necC* プラスミドを *necC* 破壊株に相同組換えにより導入して、*necC* を相補した。サザンハイブリダイゼーションにより確認された *Bgl*III、*Sph*I または *Bam*HI による *T. discophora* ゲノム DNA の切断パターンは、pNEC002*necC* が一つ挿入された場合と一致した (Figure 4-4A、B)。

T. discophora から抽出した代謝産物は、還元後 NBD 化して LC-PDA-ESIMS 分析した。*NecC* の破壊により nectrisine は生産されなくなるとともに、多量の 4-amino-4-deoxyarabinitol が生産されたことが NBD 由来のシグナルで確認された (Figure 4-4C)。この nectrisine の非生産は、抽出イオンクロマトグラム (NBD-nectrisine : m/z 297.08, [M+H]⁺、NBD-4-amino-4-deoxyarabinitol : m/z 315.09, [M+H]⁺) でも確認された (Figure S1)。次に、*necC* 破壊株に *necC* を相補すると nectrisine の生産が回復し、4-amino-4-deoxyarabinitol の生産は大きく減少した。破壊株、相補株により生産された nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol のピークは HPLC の保持時間とポジティブ ESI-MS スペクトルにより同定された (Figure 4-4C)。これらより、4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine に変換する *necC* は nectrisine の生合成に関与していることが示された。

A



B



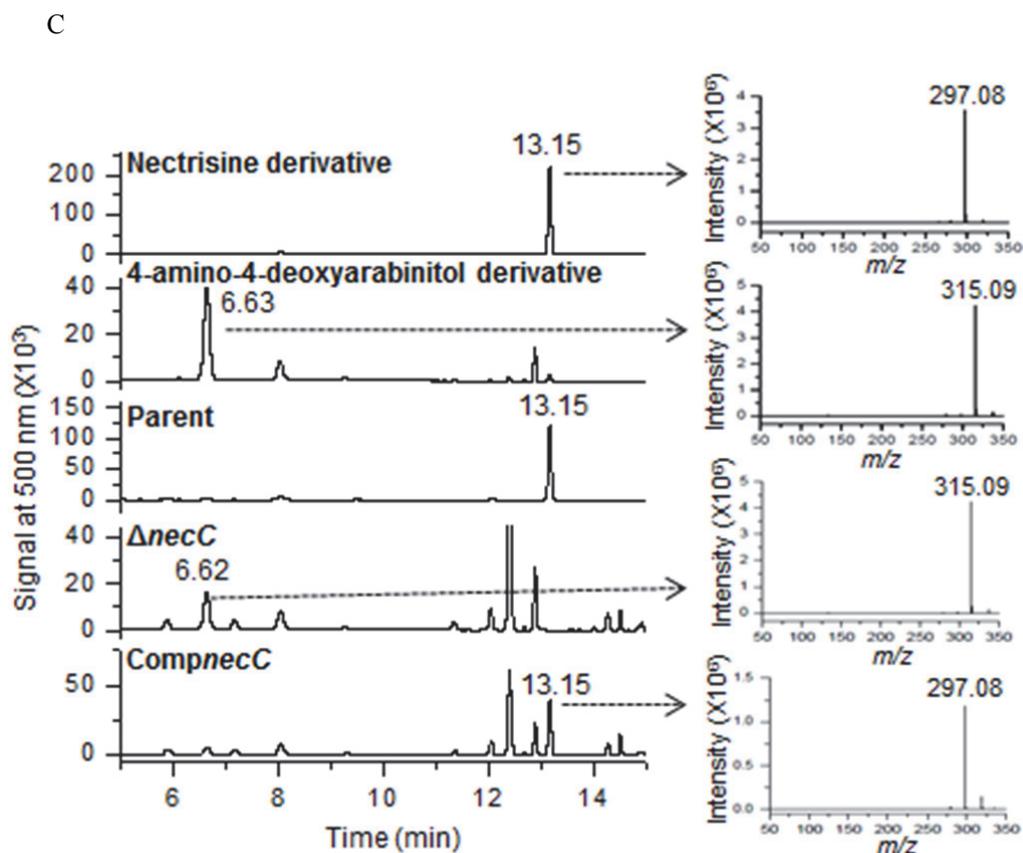


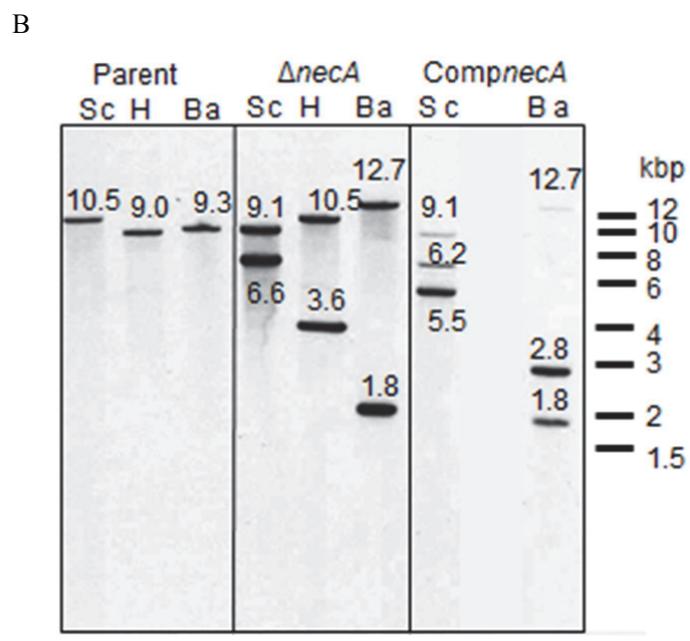
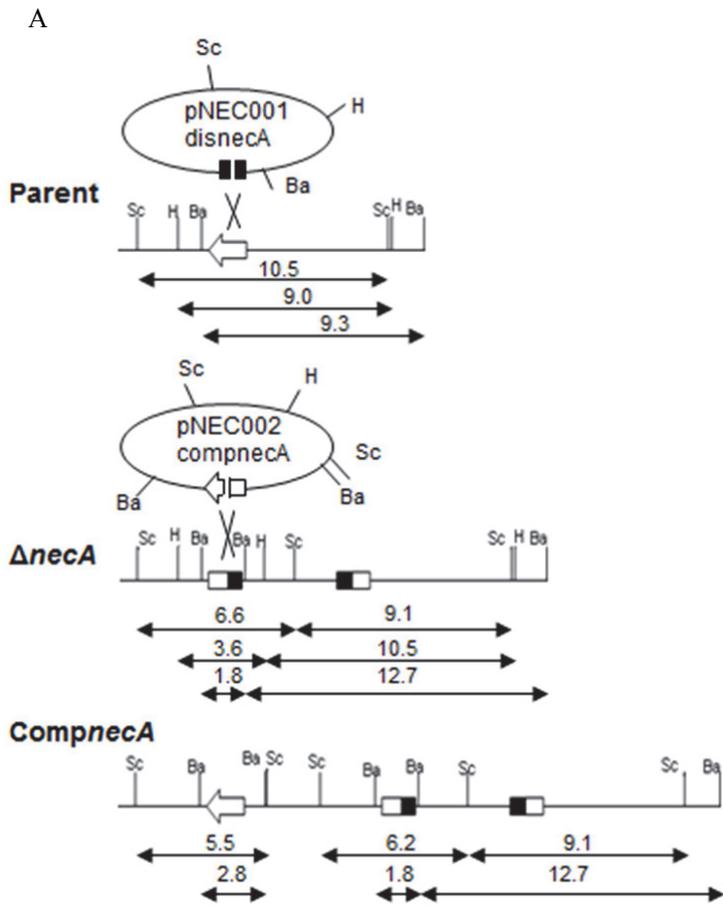
Figure 4-4 Disruption and complementation of *necC*.

(A) The predicted disruption and complementation events caused by homologous recombination with *xhoI*-digested plasmids, pNEC001dis*necC* and pNEC002comp*necC*. The deduced restriction patterns of genomic DNA of parent strain (top), *necC* disruptant (Δ *necC*, middle) and *necC*-complemented mutant (Comp*necC*, bottom) are shown. Bg, *Bgl*II; Sp, *Sph*I; Ba, *Bam*HI. (B) Genomic southern hybridization patterns with DIG-labeled *necC* for genomic DNAs of the parent strain, Δ *necC* and Comp*necC* digested with the indicated enzymes. (C) HPLC chromatograms and ESI-mass spectra of reduced and NBD-labeled authentic nectrisine, authentic 4-amino-4-deoxyarabinitol, and metabolites produced by parent strain, Δ *necC* and Comp*necC*.

4.2.8.7 *necA* 遺伝子の破壊と相補による機能検証

pNEC001dis*necA* が導入された *T. discophora* 形質転換株の *ScaI*、*HindIII* または *BamHI* によるゲノム DNA の切断パターンは、pNEC001*necA* が一つ *necA* 遺伝子座に相同組換えで挿入された場合と一致した (Figure 4-5A、B)。続いて、*necA* 遺伝子全長を含んでいる pNEC002comp*necA* を *necA* 破壊株に導入し、その導入様式をサザンハイブリダイゼーションで確認した。*ScaI* または *BamHI* による *T. discophora* ゲノム DNA の切断パターンは、pNEC002*necA* が一つ挿入された場合と一致した (Figure 4-5A、B)。

T. discophora から抽出した代謝産物は、還元後 NBD 化して LC-PDA-ESIMS 分析した。*necA* 破壊株の抽出液の分析において、nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol の NBD 由来のシグナル (Figure 4-5C) は検出されず、抽出イオンクロマトグラム (Figure S1) でも両者ともに検出されなかった。よって、*necA* 破壊株は nectrisine と 4-amino-4-deoxyarabinitol を生産しないことが示された。この *necA* 破壊株に *necA* を相補すると nectrisine の生産が回復した。相補株により生産された nectrisine は HPLC の保持時間とポジティブ ESI-マススペクトルにより同定された (Figure 4-5C)。これらより、*necA* は 4-amino-4-deoxyarabinitol の生合成に関与していることが示された。



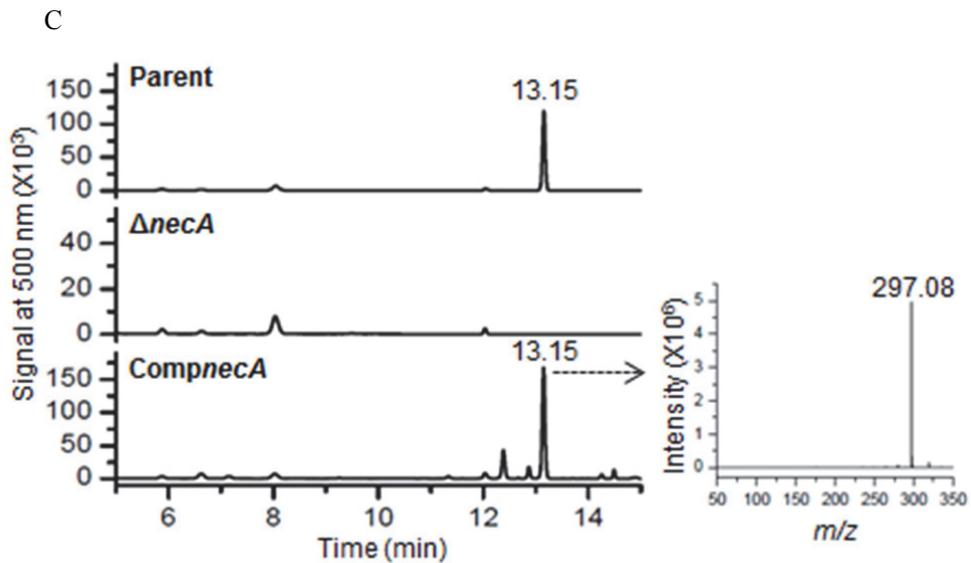


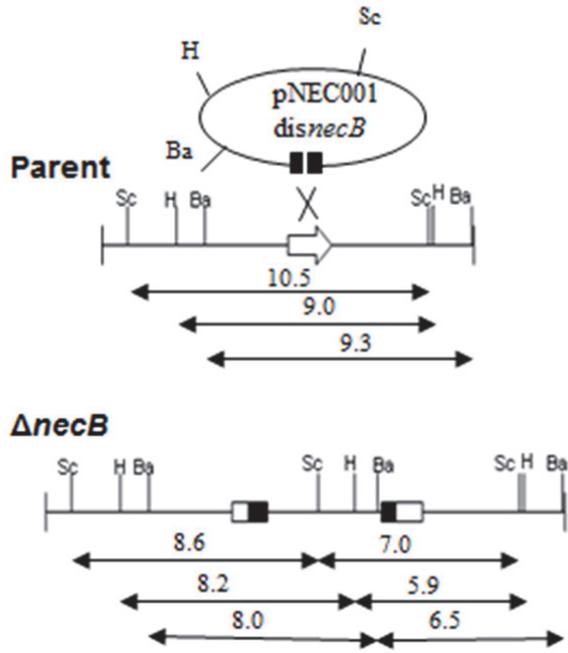
Figure 4-5 Disruption and complementation of *necA*.

(A) The predicted disruption and complementation events caused by homologous recombination with *xhoI*-digested plasmids, pNEC001dis*necA* and pNEC002comp*necA*. The deduced restriction patterns of genomic DNA of parent strain (top), *necA* disruptant ($\Delta necA$, middle) and *necA*-complemented mutant (Comp*necA*, bottom) are shown. Sc, *ScaI*; H, *HindIII*; Ba, *BamHI*. (B) Genomic southern hybridization patterns with DIG-labeled *necA* for genomic DNAs of the parent strain, $\Delta necA$ and Comp*necA* digested with the indicated enzymes. (C) HPLC chromatograms and ESI-mass spectrum of reduced and NBD-labeled metabolites produced by parent strain, $\Delta necA$ and Comp*necA*.

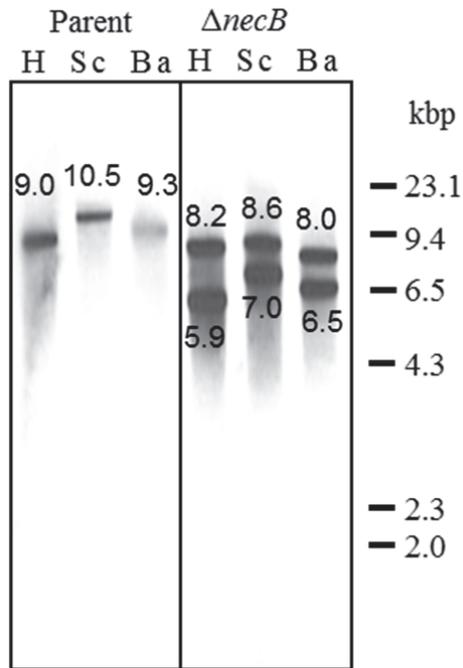
4.2.8.8 *necB* 遺伝子の破壊による機能検証

遺伝子破壊ベクターpNEC001dis*necB*による形質転換で少なくとも8つの形質転換株が得られた。*Hind*III消化したゲノムDNAのサザン解析により、このうちの6つはこのベクターが1つ導入されており、2つはこのベクターが2つ連なって導入されていることが示唆された。この遺伝子導入様式をさらに確認するため、ベクターが1つ導入されたと示唆された一つの株について、Figure 4-6A、Bに示すように3つの制限酵素を用いてサザン解析したところ、これらのDNA切断パターンはやはり相同組換えでpNEC001dis*necB*が*necB*遺伝子座に導入された場合と一致した。この*necB*破壊株のnectrisine生産量は親株の24%に減少したことを1回の実験で確認した。*necB*破壊株により生産されたnectrisineはHPLCの保持時間とポジティブESI-MSスペクトルにより同定された (Figure 4-6C)。

A



B



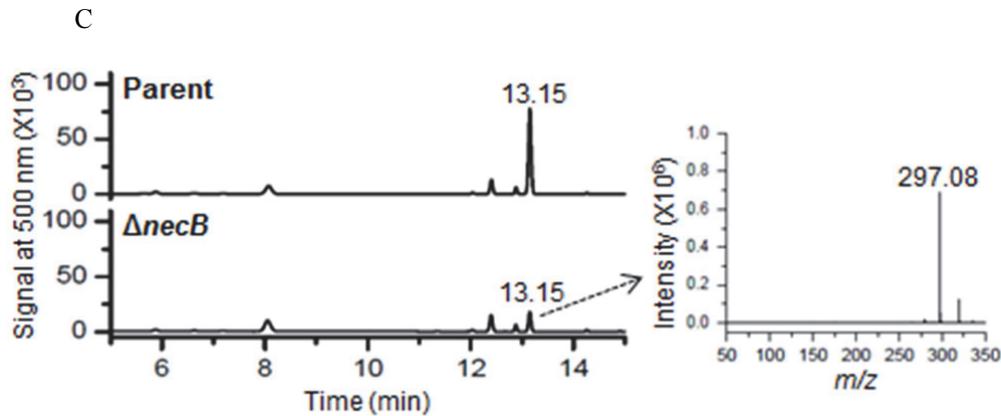


Figure 4-6 Disruption of *necB*.

(A) The predicted disruption events caused by homologous recombination with *xhoI*-digested plasmids, pNEC001dis*necB*. The deduced restriction patterns of genomic DNA of parent strain (top), *necB* disruptant (Δ *necB*, middle) are shown. H, *Hind*III; Sc, *Sca*I; Ba, *Bam*HI. (B) Genomic southern hybridization patterns with DIG-labeled *necB* for genomic DNAs of the parent strain, Δ *necB* digested with the indicated enzymes. (C) HPLC chromatograms and ESI-mass spectrum of reduced and NBD-labeled metabolites produced by parent strain and Δ *necB*.

4.2.9 *necA*、*necB*、*necC* の大腸菌での共発現

necB が nectrisine の生合成に関与しているかどうか確認するため、*necA* と *necC*、または *necA* と *necB*、*necC* を大腸菌でそれぞれ共発現させた。

4.2.9.1 方法

上記と同様に調製した *T. discophora* cDNA から *necB* cDNA を *Bam*HI-AK-f プライマーと AK-*Hind*III-r プライマーを用いて PCR にて増幅した。得られた PCR 産物をゲルで精製後、*Bam*HI と *Hind*III で切断し、P15A レプリコンとクロラムフェニコール耐性遺伝子を保持している pACYCDuet-1 ベクター (メルク) の *Bam*HI-*Hind*III サイトに導入した。得られたプラスミドを pACYCDuet*necB* と名付けた。次に、ColE1 レプリコンとアンピシリン耐性遺伝子、T7 promoter/lac オペレーターの支配下にある 2 つの multiple cloning site (MCS) を保持している pETDuet-1 ベクター (メルク) を用いて *necA* と *necC* の共発現用のベクターを以下のように構築した。*necA* と *necC* をプライマーセット、

BamHI-AO-f/AO-NotI-r と NdeI-AT-f2/AT-HisKpnI-r、を用いて PCR にて増幅した。得られた PCR 産物をゲルで精製後、*Bam*HI と *Not*I で切断し、pETDuet-1 ベクターの MCS1 にある *Bam*HI-*Not*I サイトに導入した。得られたベクターは pETDuet*necC* と名付けた。次に、*necA* PCR 産物を *Nde*I と *Kpn*I で切断し、pETDuet*necC* ベクターの MCS2 にある *Nde*I-*Kpn*I サイトに導入した。得られたベクターは pETDuet*necCnecA* と名付けた。*NecA*、*necB*、*necC* の共発現のため、*E. coli* BL21 (DE3) を pACYCDuet*necB* と pETDuet*necCnecA* にて形質転換した。細胞は 1 g/L の D-ribose と 100 mg/L の carbenicillin、30 mg/L の chloramphenicol を添加した LB 培地 (和光純薬) 中で OD₆₀₀ が 0.6~1.0 になるまで 37°C で振盪培養した後、冷却し、isopropyl beta-D-thiogalactoside (IPTG) を最終濃度 0.3 mM になるように加え、18°C で 36 時間、210 rpm で培養した。次に細胞を遠心してペレット化し 100 mM NaH₂PO₄/300 mM NaCl pH 7.8 で再懸濁した。超音波で細胞を破壊した後、遠心して可溶性画分を回収し、還元 SDS-PAGE を行った。ゲルを Coomassie Brilliant Blue R250 で染色またはウエスタンブロット用にメンブレンに転写した。His-tag 標識されたこれらの蛋白質を Penta-His HRP Conjugate (Qiagen) と ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE ヘルスケア) を用いて検出した。

4.2.9.2 結果

necA/necC 共発現株及び *necA/necB/necC* 共発現株の抽出液から得られた可溶性画分をウエスタンブロットで分析した結果、それぞれのタンパク質の生産が確認できた (Figure 4-7A)。*necA*、*necB*、*necC* を個別に *E. coli* で発現させた場合との比較により、Figure 4-7A 中の上、中、下のバンドはそれぞれ *NecC*、*NecA*、*NecB* に対応することがわかった。また、SDS-PAGE において分子量マーカールとの比較により見積もった分子量と配列から計算した分子量は、いずれの His-tag 融合タンパク質とも一致した。次に、各培養液の上清を LC-PDA-ESIMS 分析した (7)。*necA/necB/necC* 導入株のみならず *necB* を導入せず *necA* と *necC* のみ導入した株からも nectrisine を検出した (Figure 4-7B)。なお、Nectrisine のピークは保持時間と MS スペクトルで同定した。以上より、*NecB* は nectrisine の生合成に関与していると推測されるが、*NecB* の反応を触媒する他の酵素が存在することが示された。

第 2 章において、D-ribose は nectrisine の生合成中間体と考えられ、D-ribose を培地に添加すると *T. discophora* による nectrisine 生産量が増加したことを報告した (7)。そこで、*necA*、*necB*、*necC* を導入した組換え *E. coli* に D-ribose を添加して培養したところ、nectrisine の生産量が 1 mg/L から 3 mg/L に予想どおり増大したことが 1 回の実験で示された。

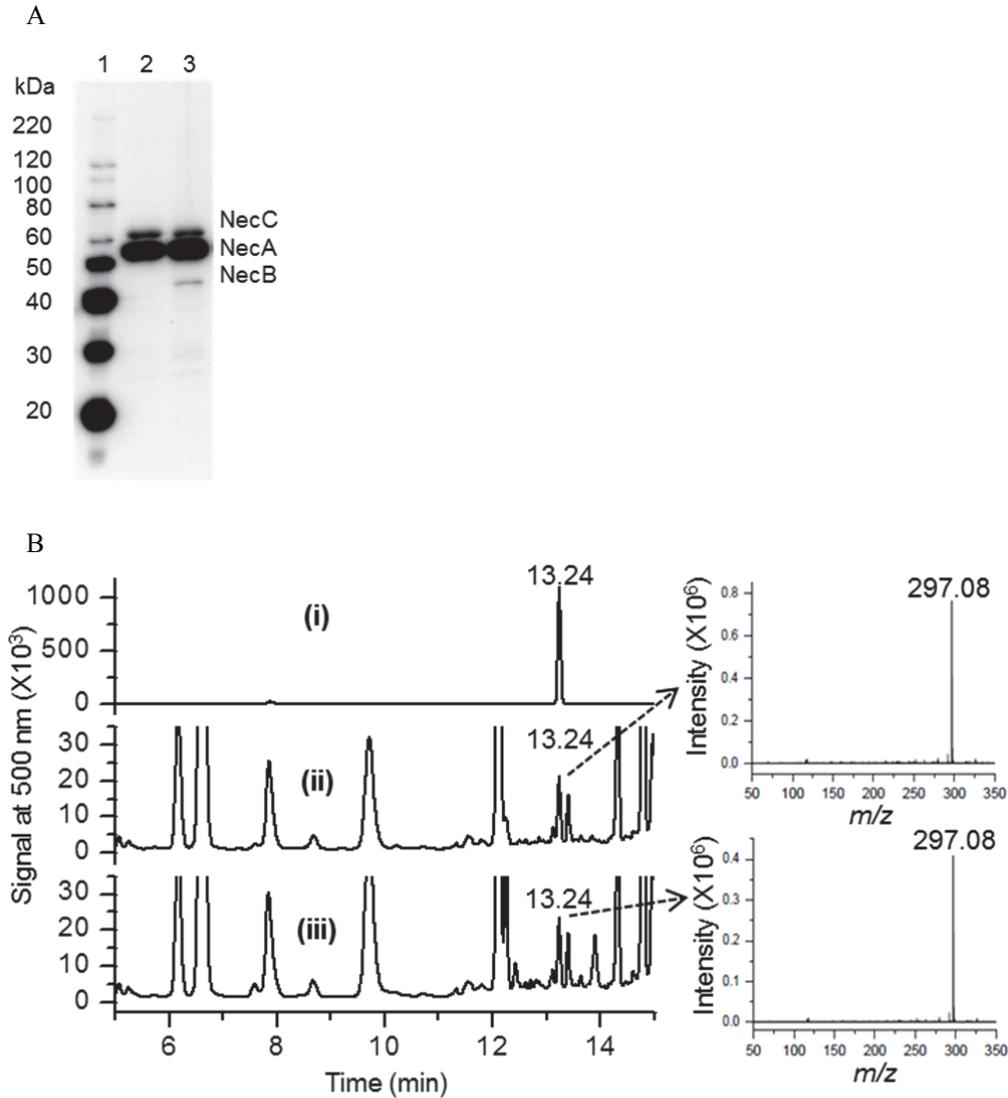


Figure 4-7 Co-expression of *necA*, *necB* and *necC* by recombinant *E.coli*.

(A) western blot probed with anti-His antibodies. Lane 1, molecular weight marker proteins; Lane 2, *necA/necC* expressing strain harboring plasmid pETDuet*necCnecA*; Lanes 3, *necA/necB/necC* expressing strains harboring plasmids, pETDuet*necCnecA* and pACYCDuet*necB*. (B) HPLC chromatograms and ESI mass spectra of reduced and NBD-labeled supernatants of the *E. coli* culture. (i) reduced and NBD-labeled authentic nectrisine whose calculated molecular mass ($[M+H]$) is 297.08, (ii) *necA/necC* expressing strain harboring plasmid pETDuet*necCnecA*, (iii) *necA/necB/necC* expressing strains harboring plasmids, pETDuet*necCnecA* and pACYCDuet*necB*.

4.3 考察

4.3.1 Nectrisine の推定生合成経路

本章では、*T. discophora* の nectrisine 生合成に関与する遺伝子を同定した。これらの結果より、nectrisine の推定生合成経路は Figure 4-8 のように描ける。*necC* の破壊・相補実験により、NecC は 4-amino-4-deoxyarabinitol (2) を nectrisine (1) に変換する反応を触媒しており、nectrisine の生合成に関与していることが示された。NecC は alcohol oxidase であるので、4-amino-4-deoxyarabinitol はまずアルデヒド 3 に変換され、そしてアミノ基がカルボニル基に分子内で反応して環状化合物 4 が生成し、続いて非酵素的に脱水されて nectrisine が得られると推測される (8)。Aminotransferase をコードする *necA* は、今回の検討結果より、4-amino-4-deoxyarabinitol の生合成に関与していることが示された。*NecB* に関しては、予想に反して *necB* 遺伝子の破壊により nectrisine の生産を完全には抑えられなかった。よって、*necB* は 4-amino-4-deoxyarabinitol の生合成に必須ではないことが示唆された。これは、*necB* の *E. coli* による異種発現でも確かめられた。すなわち、*necA/necC* 共発現株は *necB* を発現することなしに nectrisine を生産することができた。しかし、*T. discophora* の *necB* 破壊株の nectrisine 生産は顕著に低下したことより、*necB* は 4-amino-4-deoxyarabinitol の生産に必須ではないが、関与していると推測される。4-amino-4-deoxyarabinitol は NecA と NecB により生合成されるのが妥当と考えられるため、NecB は D-xylulose 5-phosphate (5) の脱リン酸化 (経路 1) または 4-amino-4-deoxyarabinitol phosphate (7) の脱リン酸化 (経路 2) を触媒すると考えられる。ペントースリン酸経路より供給される D-xylulose 5-phosphate は nectrisine の推定生合成中間体である (7)。Choline/ethanolamine kinase ファミリーの一員と推定される *necB* の基質としては、D-xylulose 5-phosphate (5) より alcoholamine 7 が適していると推測されるため、経路 2 が経路 1 より妥当であろう。また、経路 2 は 6 員環のイミノ糖である deoxynojirimycin の *Bacillus amyloliquefaciens* における推定生合成経路とも似ている。この推定経路では、アミノ化、脱リン酸化、酸化の各反応が経路 2 と同じ順番で起こる (20)。

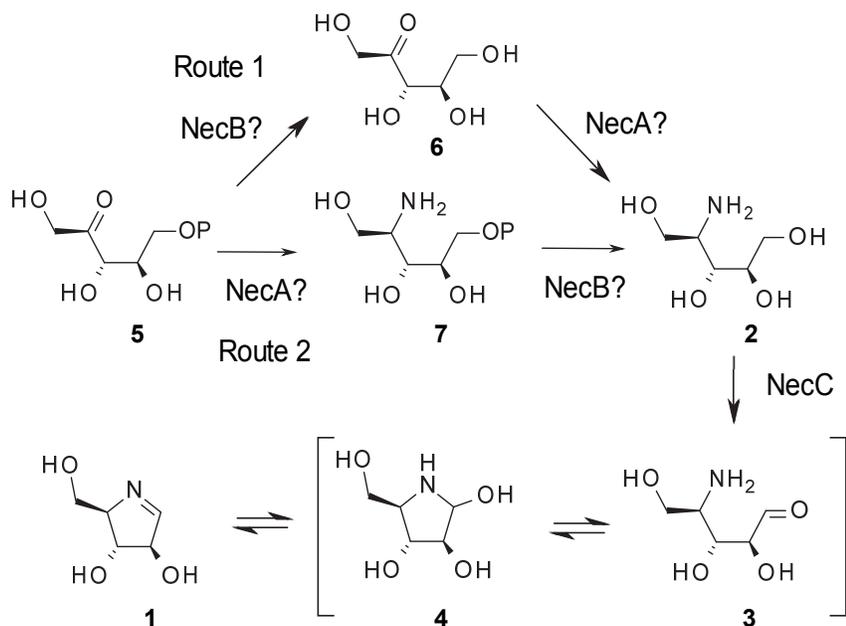


Figure 4-8 Proposed pathway for nectrisine biosynthesis in *T. discophora*.

4.3.2 Nectrisine 生合成遺伝子クラスター

イミノ糖の生合成遺伝子クラスターは、deoxynojirimycin のもの以外は知られていない。Deoxynojirimycin の生合成遺伝子クラスターは *gabT1* と *yktC1*、*gutB1* を含み、それぞれ推定 aminotransferase、phosphatase、dehydrogenase をコードしており (19, 20)、nectrisine の生合成における *necA*、*necB*、*necC* に対応しているように見える。しかし、*Bacillus amyloliquefaciens* 由来の *GabT1*、*YktC1*、*GutB1* に対する *NecA*、*NecB*、*NecC* アミノ酸配列の相同性はそれぞれ 25%、14%、17%で、類似性はそれぞれ 48%、31%、33%であり、いずれも低かった。

T. discophora の *necB* 破壊株や *necB* を発現していない組換え *E. coli* による nectrisine の生産は、choline kinase のように広い基質選択性を持つ他の酵素が *NecB* 反応を代替したために起きたと考えられる。多くの choline kinase は choline と ethanolamine を基質として利用できることが知られている (29–31)。*necB* のような必須ではない生合成遺伝子が生合成遺伝子クラスター内に存在し得ることは報告されている。例えば aminotransferase をコードする *tdiD* 遺伝子は *Aspergillus nidulans* における bis-indolyquinone 生合成のために必須ではないと示されている (32)。この報告において、*A. nidulans* ゲノム中に *tdiD* に類似した遺伝子が見つかったことから、*TdiD* の反応を代替する酵素の存在が考えられた。これは、*NecB* の場合と同様である。さらに、*E. coli* の代謝に関するゲノムスケールモデルの解析で、37%の酵素が複数の基質に作用し得る

との報告もある (33)。このことから *NecB* 代替酵素が存在し得ると考えられる。

ORF1 は、様々な糸状菌に見られる典型的な正の転写制御因子である GAL-4 タイプのジンクフィンガータンパク質 (34, 35) の一員であると推定された。よって、ORF1 は *nectrisine* 生合成の転写制御因子である可能性がある。この点は、今後明らかにすべきであろう。

4.4 異種発現による *nectrisine* の生産

医薬品を商用生産するには、安価で大量に再現性良く製造できる堅牢性の高いプロセスが求められる。このような商用生産を想定した場合、遺伝子組換え *E. coli* による物質生産は糸状菌による物質生産より魅力的であろう。なぜならば、糸状菌による生産では、菌の生育と形態の不十分な制御や生育の遅さに起因する低い生産性や、高い粘度のために濾過や抽出工程で扱いが難しいなどのスケールアップに関する問題にしばしば出くわすためである (36–40)。今回明らかになった *nectrisine* 生合成遺伝子クラスターの情報には *nectrisine* やさらには 4-amino-4-deoxyarabinitol などの *nectrisine* 中間体の *E. coli* やその他ホストによる生産系の構築に資するであろう。

4.5 小括

本章では、nectrisine 生合成遺伝子の全貌を明らかにすることを目的とした。*NecC* 近傍の *T. discophora* ゲノム DNA 配列から nectrisine 生合成遺伝子候補を選抜し、それらの機能を遺伝子破壊と相補、及び大腸菌による発現で検証した結果、*necA*、*necB*、*necC* が nectrisine 生合成遺伝子であり、それらは nectrisine の生合成においてアミノ化、脱リン酸化、酸化を触媒していると推定された。また、大腸菌によるこれら 3 つの遺伝子の共発現により、nectrisine が生成することを示した。これらの知見により、nectrisine の異種発現による生産が可能となり、nectrisine またはその中間体の高効率生産プロセス開発に向けた基盤が構築できた。

4.6 引用文献

1. **Bosco M, Bisseret P, Bouix-Peter C, Eustache J.** 2001. A new concise synthesis of nectrisine and its facile conversion to phosphonoazasugars. *Tetrahedron Lett* **42**:7949–7952.
2. **Ribes C, Falomir E, Carda M, Marco JA.** 2008. Short, stereoselective synthesis of the naturally occurring pyrrolidine radicamine B and a formal synthesis of nectrisine. *J Org Chem* **73**:7779–7782.
3. **Kayakiri H, Nakamura K, Takase S, Setoi H, Uchida I, Terano H, Hashimoto M, Tada T, Koda S.** 1991. Structure and synthesis of nectrisine, a new immunomodulator isolated from a fungus. *Chem Pharm Bull* **39**:2807–2812.
4. **Soriano S, Azzouz M, Llaveria J, Marcé P, Matheu MI, Díaz Y, Castellón S.** 2016. Enantioselective formal synthesis of nectrisine using a palladium-catalyzed asymmetric allylic amination and cross-metathesis as key steps. *J Org Chem* **81**:5217–5221.
5. **Hulme AN, Montgomery CH.** 2003. Stereoselective synthesis of the α -glucosidase inhibitor nectrisine. *Tetrahedron Lett* **44**:7649–7653.
6. **Merino P, Delso I, Tejero T, Cardona F, Marradi M, Faggi E, Parmeggiani C, Goti A.** 2008. Nucleophilic additions to cyclic nitrones en route to iminocyclitols – total syntheses of DMDP, 6-deoxy-DMDP, DAB-1, CYB-3, nectrisine, and radicamine B. *European J Org Chem* **2008**:2929–2947.

-
7. **Miyauchi R, Takatsu T, Suzuki T, Ono Y, Shiba Y.** 2015. Biosynthesis of nectrisine in *Thelonectria discophora* SANK 18292. *Phytochemistry* **116**:87–93.
 8. **Miyauchi R, Sakurai H, Shiba Y.** 2016. Characterization of a novel oxidase from *Thelonectria discophora* SANK 18292 involved in nectrisine biosynthesis. *AMB Express* **6**:6.
 9. **Sambrook JF, Russell DW.** 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 10. **Ballance DJ.** 1986. Sequences important for gene expression in filamentous fungi. *Yeast* **2**:229–236.
 11. **Kukuruzinska MA, Bergh ML, Jackson BJ.** 1987. Protein glycosylation in yeast. *Annu Rev Biochem* **56**:915–944.
 12. **Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389–3402.
 13. **Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH.** 2005. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* **33**:D192–6.
 14. **Kiess M, Hecht H-J, Kalisz HM.** 1998. Glucose oxidase from *Penicillium amagasakiense*. Primary structure and comparison with other glucose-methanol-choline (GMC) oxidoreductases. *Eur J Biochem* **252**:90–99.
 15. **Dijkman WP, de Gonzalo G, Mattevi A, Fraaije MW.** 2013. Flavoprotein oxidases: classification and applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **97**:5177–5188.
 16. **Wierenga RK, Terpstra P, Hol WG.** 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding beta alpha beta-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol* **187**:101–107.

-
17. **Watanabe Y, Imai K.** 1981. High-performance liquid chromatography and sensitive detection of amino acids derivatized with 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal Biochem* **116**:471–472.
 18. **Imai K, Watanabe Y.** 1981. Fluorimetric determination of secondary amino acids by 7-fluoro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole. *Anal Chim Acta* **130**:377–383.
 19. **Kang K-D, Cho YS, Song JH, Park YS, Lee JY, Hwang KY, Rhee SK, Chung JH, Kwon O, Seong S-I.** 2011. Identification of the genes involved in 1-deoxynojirimycin synthesis in *Bacillus subtilis* MORI 3K-85. *J Microbiol* **49**:431–440.
 20. **Clark LF, Johnson J V, Horenstein NA.** 2011. Identification of a gene cluster that initiates azasugar biosynthesis in *Bacillus amyloliquefaciens*. *Chembiochem* **12**:2147–2150.
 21. **Martin JF, Liras P.** 1989. Organization and expression of genes involved in the biosynthesis of antibiotics and other secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* **43**:173–206.
 22. **Keller NP, Turner G, Bennett JW.** 2005. Fungal secondary metabolism - from biochemistry to genomics. *Nat Rev Microbiol* **3**:937–947.
 23. **Zhang Y, Keller N, Tsitsigiannis D, Wilkinson H.** 2005. Secondary metabolite gene clusters, p. 355–385. *In* An, Z (ed.), *Handbook of industrial mycology*. Marcel Dekker, New York.
 24. **Brakhage AA, Schroeckh V.** 2011. Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal Genet Biol* **48**:15–22.
 25. **Finn RD, Coggill P, Eberhardt RY, Eddy SR, Mistry J, Mitchell AL, Potter SC, Punta M, Qureshi M, Sangrador-Vegas A, Salazar G a, Tate J, Bateman A.** 2015. The Pfam protein families database: towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res* **44**:D279–D285.
 26. **Baba S, Abe Y, Suzuki T, Ono C, Iwamoto K, Nihira T, Hosobuchi M.** 2009. Improvement of compactin (ML-236B) production by genetic engineering in compactin high-producing *Penicillium citrinum*. *Appl Microbiol*

-
- Biotechnol **83**:697–704.
27. **Baba S, Nihira T, Hosobuchi M.** 2008. Identification of the specific sequence recognized by *Penicillium citrinum* MlcR, a GAL4-type transcriptional activator of ML-236B (compactin) biosynthetic genes. *Fungal Genet Biol* **45**:1277–1283.
 28. **Hamada W, Reignault P, Bompeix G, Boccara M.** 1994. Transformation of *Botrytis cinerea* with the hygromycin B resistance gene, hph. *Curr Genet* **26**:251–255.
 29. **Peisach D, Gee P, Kent C, Xu Z.** 2003. The crystal structure of choline kinase reveals a eukaryotic protein kinase fold. *Structure* **11**:703–713.
 30. **Aoyama C, Yamazaki N, Terada H, Ishidate K.** 2000. Structure and characterization of the genes for murine choline / ethanolamine kinase isozymes α and β . *J Lipid Res* **41**:452–464.
 31. **Clary GL, Tsai C-F, Guynn RW.** 1987. Substrate specificity of choline kinase. *Arch Biochem Biophys* **254**:214–221.
 32. **Schneider P, Weber M, Rosenberger K, Hoffmeister D.** 2007. A one-pot chemoenzymatic synthesis for the universal precursor of antidiabetes and antiviral bis-indolylquinones. *Chem Biol* **14**:635–644.
 33. **Nam H, Lewis NE, Lerman JA, Lee D, Chang RL, Kim D, Palsson BO.** 2012. Network context and selection in the evolution to enzyme specificity. *Science* **337**:1101–1104.
 34. **Schjerling P, Holmberg S.** 1996. Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. *Nucleic Acids Res* **24**:4599–4607.
 35. **MacPherson S, Laroche M, Turcotte B.** 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**:583–604.
 36. **Papagianni M.** 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* **22**:189–259.
 37. **Krull R, Wucherpfennig T, Esfandabadi ME, Walisko R, Melzer G,**

-
- Hempel DC, Kampen I, Kwade A, Wittmann C.** 2013. Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *J Biotechnol* **163**:112–23.
38. **Kaup B, Ehrich K, Pescheck M, Schrader J.** 2008. Microparticle-enhanced cultivation of filamentous microorganisms: Increased chloroperoxidase formation by *Caldariomyces fumago* as an example. *Biotechnol Bioeng* **99**:491–498.
39. **Zhang ZY, Jin B, Kelly JM.** 2007. Effects of cultivation parameters on the morphology of *Rhizopus arrhizus* and the lactic acid production in a bubble column reactor. *Eng Life Sci* **7**:490–496.
40. **Gibbs PA, Seviour RJ, Schmid F.** 2000. Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Crit Rev Biotechnol* **20**:17–48.

4.7 補遺

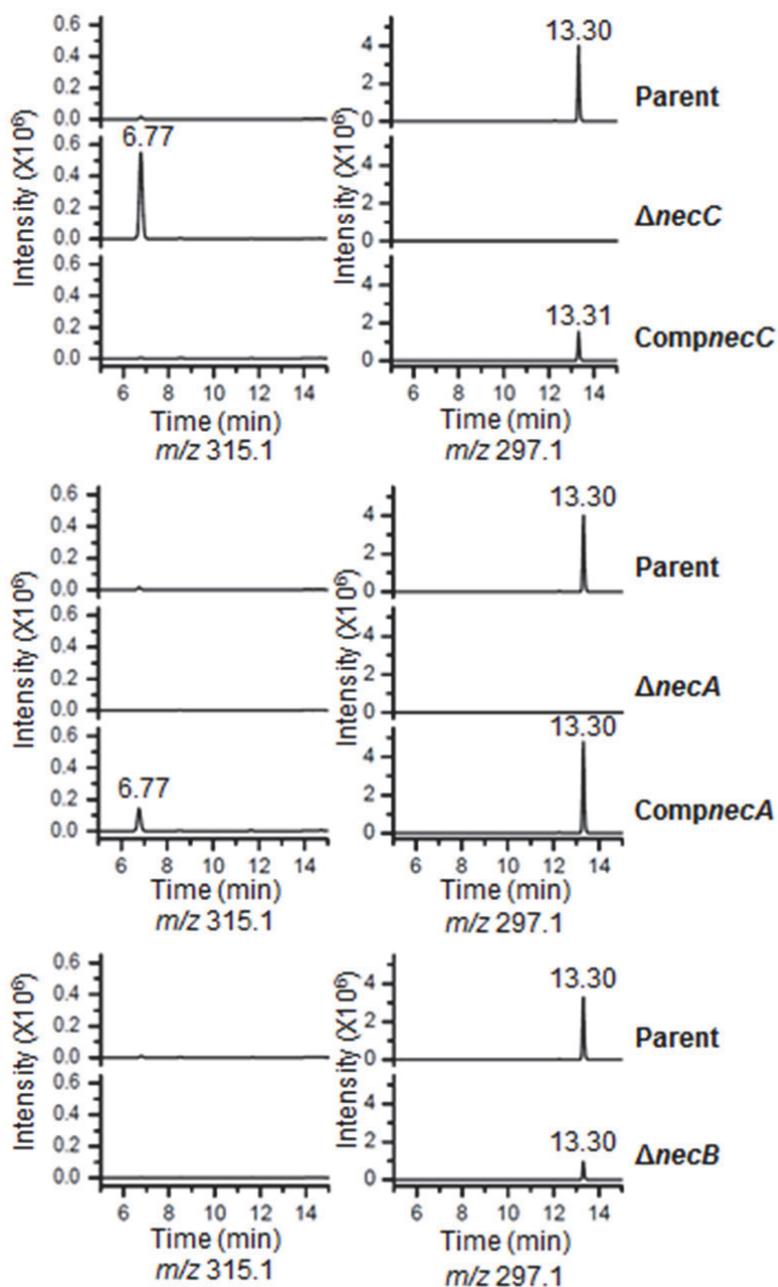


Figure S1 Extracted ion chromatograms of reduced and NBD-labeled metabolites produced by parent strain, *necC* disruptant ($\Delta necC$), *necC*-complemented mutant (CompnecC), *necA* disruptant ($\Delta necA$), *necA*-complemented mutant (CompnecA) and *necB* disruptant ($\Delta necB$).

5. 結論と今後の展望

5.1 結論

本論文では、glycosidase 阻害活性を有するイミノ糖である nectrisine の生合成機構を解明し、製法構築へ応用することを目的とした。

第2章では、nectrisine の生合成経路を菌体レベルで解析し、以下の知見を得た。

- ・ D-xylose と D-ribose は nectrisine の中間体であることを各種 ^{13}C 同位体添加実験により示した。また、その同位体の nectrisine への濃縮パターンはペントースリン酸回路で矛盾なく説明できた。
- ・ *T. discophora* 菌体抽出液中に 4-amino-4-deoxyarabinitol が含まれていることを精製物の X 線結晶構造解析により明らかにした。
- ・ 4-amino-4-deoxyarabinitol と菌体抽出液の反応により本化合物が nectrisine の前駆体であることが示された。

以上より、nectrisine の *T. discophora* における推定生合成経路を提案した。

第3章では、第2章でその存在が示唆された nectrisine 合成酵素を菌体抽出液より精製し、その特性を解析した。そして以下の知見を得た。

- ・ 菌体抽出液より 4-amino-4-deoxyarabinitol を nectrisine へ変換する酵素 (NecC) を硫酸沈殿と陰イオン交換クロマトグラフィーにより精製した。
- ・ NecC の部分アミノ酸配列を LC-MS/MS により推定した。NecC はフラボ蛋白質である GMC oxidoreductase ファミリーと相同性が高いことがデータベース検索により示唆された。
- ・ NecC はフラビン骨格を有する補因子を含有し、オリゴマーを形成していることが示された。
- ・ NecC 活性の至適 pH は 7.0、至適温度は 30°C であり、EDTA により阻害され、 MnCl_2 により若干上昇した。また、NecC の変性中点温度は 57°C であった。
- ・ 4-amino-4-deoxyarabinitol から nectrisine への変換反応は菌体から抽出後に *in vitro* で主に起こることを示した。そして、nectrisine の発酵生産にあたっては、基質だけでなく NecC も活性を維持した状態で抽出されなければならないことを提言した。

第4章では、第3章で得られた酵素の部分アミノ酸配列を手がかりとして、nectrisine の生合成遺伝子群を同定、機能解析し、以下の知見を得た。

-
- ・ NecC 部分アミノ酸配列から設計した縮重プライマーで *necC* 遺伝子断片を取得、クローニングし、さらに *T. discophora* のゲノムライブラリーをスクリーニングすることで *necC* 遺伝子全長のクローニングに成功した。
 - ・ ゲノム上の *necC* 遺伝子座周辺の遺伝子を解析した結果、aminotransferase と choline kinase に相同性を示す配列 (*necA* と *necB*) が見つかった。
 - ・ *necA*、*necB*、*necC* の機能を遺伝子破壊と相補、及び大腸菌による発現により検証した結果、*necA*、*necB*、*necC* が nectrisine 生合成遺伝子であり、NecA、NecB により 4-amino-4-deoxyarabinitol が生じ、NecC により nectrisine が生じると推定された。また、*necB* は nectrisine の生合成に関係しているが必須ではないと示唆された。
 - ・ *necA/necB/necC* または *necA/necC* の各共発現ベクターを導入した組み換え大腸菌は、nectrisine を生産できることを示した。
 - ・ 得られた知見より、アミノ化、脱リン酸化、酸化の各反応を含む nectrisine の推定生合成経路を提案した。

5.2 今後の展望

5.2.1 生合成遺伝子と酵素の解析

NecC は物理面では会合体を形成すること、機能面では基質特異性や基質阻害など興味深い知見が得られた。今後は結晶構造解析によって会合の様式や基質認識機構、補因子などを明らかにするとともに、基質特異性についてさらに詳細に調べるべきであろう。

NecA や NecB は、今回の検討の結果、遺伝子が同定され、組換え大腸菌で生産することも確認された。今後は酵素レベルで推定された反応を検証するとともに、これらの酵素の性質を明らかにするべきであろう。これにより、*in vitro* での酵素反応による nectrisine やその中間体の生産も可能になると考えられる。

5.2.2 異種発現による nectrisine 生産

Nectrisine の生合成遺伝子の情報を用いて実際に遺伝子組み換え大腸菌による異種発現で nectrisine を生産できた。しかし、その生産量は非常に少なかったため、工業利用する場合は生産性の向上が必須である。生産量増加のために、生合成遺伝子の転写因子を利用できる場合がある (1-4)。例えば、compactin (ML-236B) 生合成遺伝子の転写因子として見出された *mlcR* を ML-236B 生産菌に導入して発現を強化することで、ML-236B 生産量が増加したとの報告がある (3, 4)。*T. discophora* ゲノム DNA 上で nectrisine 生合成遺伝子群の近傍に存在している ORF1 は、様々な糸状菌に見られる典型的な正の転写制御因子である GAL-4 タイプのジンクフィンガータンパク質 (5, 6) の一員で、nectrisine 生合成遺伝子群を制御している可能性がある。よって ORF1 を nectrisine 生産菌のゲノム DNA に組み込み発現を強化することで nectrisine 生産量の増加が期待さ

れる。そして、代謝工学 (7-11) の手法を適用して、代謝経路の分析とそれに基づく遺伝子改変を行うことでさらなる生産性向上が期待される。

5.2.3 元菌による nectrisine の大量生産

5.2.3.1 CS-1036 の製法への応用

2 型糖尿病の治療薬として当社にて創製された化合物である CS-1036 は、はじめに全合成法が確立されたが、1 章で触れたようにイミノ糖である C ユニットの製造コストが高いことが課題となっていた。Nectrisine は C ユニットと絶対配置が同じであり、その生産性を向上させ CS-1036 の合成パートに組み込むことができれば、コスト低減が期待できる。検討の結果、*T. discophora* の発酵生産により nectrisine を得、それを還元して相対的に安定な 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol に導き、さらなる有機合成によって CS-1036 に導くルートが確立された (Figure 5-1) (12)。

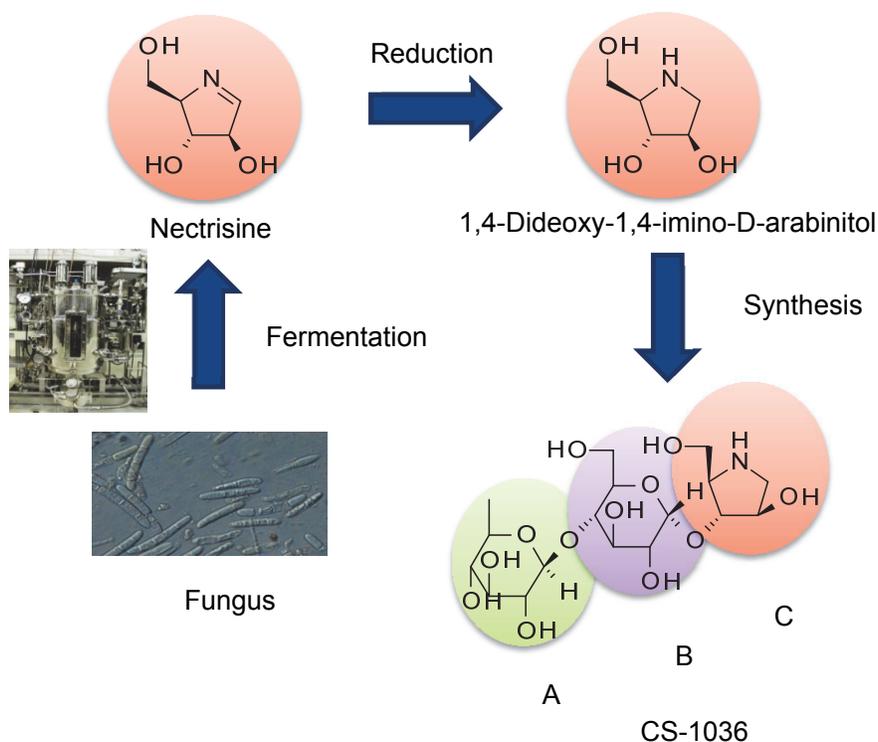


Figure 5-1 Synthesis of CS-1036 using nectrisine produced by *T. discophora* as a starting material.

5.2.3.2 *T. discophora* による nectrisine の大量生産法の開発

しかし、*T. discophora* を工業的に利用する場合、元株の nectrisine 生産性が非常に低か

ったことから、高生産株の育種と培地改良を平行して検討した。*N*-methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidine (NTG)、Ethylmethane sulfonate (EMS)、紫外線による変異処理株や glucose アナログである 2-deoxy-D-glucose 耐性株を総計で約 19000 株スクリーニングした。また、培地成分中の炭素源や窒素源、pH 安定化剤を nectrisine 生産性と培地原料の価格、入手性の観点から詳細に検討した。そして、元株の約 65 倍の nectrisine 生産性を示す菌株の取得に成功した。培養のスケールアップにあたっては、培養液の粘度を考慮して培地を選択し、培養温度及び溶存酸素濃度を最適化した。その結果、ラボスケール (30 L 醗酵槽) と同等の醗酵生産をパイロットスケール(6 kL 醗酵槽)において達成できた (12)。

Nectrisine を *T. discophora* より抽出する際は、NecC 酵素も活性を維持した状態で抽出されなければならない (13) ことを踏まえて抽出条件を検討した結果、抽出溶媒として水を選択した。また、至適抽出温度は 51-54°C 付近で、48°C や 60°C では大きく収率が低下した。このように、良好な収率を与える抽出温度の領域が非常に狭いことから、パイロットスケールでは、その温度制御が課題となった。50 L タンクを用いた実験では、抽出工程の収率は 55% に低下した。これは、至適温度に到達するための時間が大幅に増加したことが一因と考えられた。そこで、60°C に加温した水に冷蔵保存した湿菌体を投入して直ちに至適温度に到達させるとともに、タンクのジャケット温度を 55°C 付近とした温度制御方法に変更したところ、収率は 81% に向上した。この温度制御方法を適用したことにより、パイロットスケール (6 kL タンク) において堅牢性の高い抽出操作をラボスケールと同様の収率で達成できた (12)。

5.2.4 他のイミノ糖の生合成遺伝子の取得

イミノ糖の生合成遺伝子に関する知見は報告が非常に少ない。本研究で得られた遺伝子をプローブとして天然物またはデータベース上の遺伝子を探索することで、他のイミノ糖の生合成機構の解明にも役立つのではないかと期待している。

5.3 引用文献

1. **Payne GA, Carolina N.** 1997. Overexpression of *aflR* leads to upregulation of pathway gene transcription and increased aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol* **63**:3995–4000.
2. **Chang P, Ehrlich KC, Yu J, Bhatnagar D, Cleveland TE.** 1995. Increased expression of *Aspergillus parasiticus aflR*, encoding a sequence-specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Appl*

-
- Environ Microbiol **61**:2372–2377.
3. **Abe Y, Ono C, Hosobuchi M, Yoshikawa H.** 2002. Functional analysis of *mlcR*, a regulatory gene for ML-236B (compactin) biosynthesis in *Penicillium citrinum*. Mol Genet Genomics **268**:352–361.
 4. **Baba S, Abe Y, Suzuki T, Ono C, Iwamoto K, Nihira T, Hosobuchi M.** 2009. Improvement of compactin (ML-236B) production by genetic engineering in compactin high-producing *Penicillium citrinum*. Appl Microbiol Biotechnol **83**:697–704.
 5. **Schjerling P, Holmberg S.** 1996. Comparative amino acid sequence analysis of the C6 zinc cluster family of transcriptional regulators. Nucleic Acids Res **24**:4599–4607.
 6. **MacPherson S, Laroche M, Turcotte B.** 2006. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. Microbiol Mol Biol Rev **70**:583–604.
 7. **Verpoorte R, Heijden, van der R., ten Hoopen H et al.** 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnol Lett **21**:467–479.
 8. **Stephanopoulos G, Aristidou AA, Nielsen J.** 1998. Metabolic engineering: principles and methodologies. Academic Press.
 9. **Bailey J.** 1991. Toward a science of metabolic engineering. Science (80-) **252**:1668–1675.
 10. **Woolston BM, Edgar S, Stephanopoulos G.** 2013. Metabolic engineering: past and future. Annu Rev Chem Biomol Eng **4**:259–288.
 11. **Lee JW, Na D, Park JM, Lee J, Choi S, Lee SY.** 2012. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. Nat Chem Biol.
 12. **Ikeuchi Y, Hayashi M, Ueda T, Hara M, Shiba Y, Miyauchi R.** 2014. Development of hybrid process for antidiabetic agent, CS-1036. J Synth Org Chem Japan **72**:557–566.
 13. **Miyauchi R, Sakurai H, Shiba Y.** 2016. Characterization of a novel oxidase from *Thelonectria discophora* SANK 18292 involved in nectrisine biosynthesis. AMB Express **6**:6

研究業績

学位論文の主たる部分を公表した論文

1. **Miyauchi R, Shiba Y.** Elucidation of nectrisine biosynthesis pathway in a fungus. *Kagaku to seibutsu*, in press.
2. **Miyauchi R, Takatsu T, Suzuki T, Ono Y, Shiba Y.** 2015. Biosynthesis of nectrisine in *Thelonectria discophora* SANK 18292. *Phytochemistry* **116**:87–93.
3. **Miyauchi R, Sakurai H, Shiba Y.** 2016. Characterization of a novel oxidase from *Thelonectria discophora* SANK 18292 involved in nectrisine biosynthesis. *AMB Express* **6**:6.
4. **Miyauchi R, Ono C, Ohnuki T, Shiba Y.** 2016. Nectrisine biosynthesis genes in *Thelonectria discophora* SANK 18292: identification and functional analysis. *Appl Environ Microbiol* **82**:6414–6422.
5. **Ikeuchi Y, Hayashi M, Ueda T, Hara M, Shiba Y, Miyauchi R.** 2014. Development of hybrid process for antidiabetic agent, CS-1036. *J Synth Org Chem Japan* **72**:557–566.

参考論文

1. **Tsuneda S, Miyauchi R, Ohno T, Hirata A.** 2005. Characterization of denitrifying polyphosphate-accumulating organisms in activated sludge based on nitrite reductase gene. *J Biosci Bioeng* **99**:403–407.
2. **Miyauchi R, Oki K, Aoi Y, Tsuneda S.** 2007. Diversity of nitrite reductase genes in “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*”-dominated cultures enriched by flow-cytometric sorting. *Appl Environ Microbiol* **73**:5331–5337.

学会発表

1. 複合微生物系における脱窒性リン蓄積細菌の亜硝酸還元酵素遺伝子の探索
宮内 隆記、大野 高史、吉江 幸子、常田 聡、平田 彰、稲森 悠平
日本生物工学会大会 (2003) 3J11-1、2003 年 8 月 25 日
2. 機能遺伝子に基づいた脱窒性リン蓄積細菌のキャラクタリゼーション
宮内 隆記、大野 高史、常田 聡、平田 彰
日本微生物生態学会大会 (2004)、B-36、2004 年 11 月 21 日
3. Nitrite reductase (nirS) genes in an enhanced biological phosphorus removal process
Satoshi Tsuneda, Ryuki Miyauchi, Takashi Ohno and Akira Hirata
4th activated sludge population dynamics specialist conference-Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment, 17-20 July 2005
4. セルソーティングと分子生態学的手法による脱窒性リン蓄積細菌の分取および機能解析
大木 一真、宮内 隆記、副島 孝一、青井 義輝、常田 聡
日本微生物生態学会大会 (2006)、B-18、2006 年 10 月 27 日
5. ネクトリシン生合成経路の解析
宮内 隆記、柴 陽一郎
2009 年度日本農芸化学会大会 (2010)、3XDp19、2010 年 3 月 5 日
6. Developability risk mitigation by acidic surface charge patch removal from a monoclonal antibody A
Ryuki Miyauchi, Nobumi Nagaoka, Masato Amano, Jun Hasegawa and Tatsuji Matsuoka
2016 Workshop on Protein Aggregation and Immunogenicity, 2, August 2016

謝辞

本論文を作成するにあたり、終始温かい御指導と御鞭撻を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科分子生命開発学講座 三本木至宏教授に心より厚く御礼申し上げます。また、博士論文を審査いただき、ご助言を賜りました広島大学大学院生物圏科学研究科 島本整教授、太田伸二教授、船戸耕一准教授、大村尚准教授、近畿大学工学部 仲宗根薫教授に心より感謝致します。

研究を開始する機会を与えて頂いた宮寺彰彦博士と細渕雅彦博士、研究を進める上で多大なご支援、ご配慮を賜りました第一三共株式会社 古賀淳一研究開発本部長、モダリティ研究所 高橋亘所長、長谷川淳グループ長に心より感謝を申し上げます。

研究計画の立案から日々の直接のご指導、ご鞭撻を賜りました第一三共株式会社 CMC 企画部 柴陽一郎博士、本研究における菌株の培養や評価にご協力頂いた第一三共ケミカルファーマ株式会社 小野千穂氏、岩本光治氏、西郡秀明氏、糸状菌用プラスミドをご提供いただいたバイオ医薬研究所 馬場悟史博士をはじめ、ネクトリシンプロジェクトで苦楽を共にした旧小名浜事業所バイオ工学グループの皆様に、心より感謝を申し上げます。

蛋白質の LC-MS/MS 解析をご担当頂いた第一三共 RD ノバーレ株式会社 桜井秀敬氏と第一三共株式会社 トランスレーショナルメディシン部 小坂俊幸博士、NMR 測定でご協力、ご助言頂いた第一三共 RD ノバーレ株式会社 高津敏夫博士と第一三共株式会社プロセス技術研究所 武田斉大博士、X 線結晶構造解析をご担当頂いた分析評価研究所 鈴木徹也博士、菌株の同定や登録でご協力を頂いた第一三共 RD ノバーレ株式会社 小野泰典氏、天然物の LC-MS 分析でご協力頂いた第一三共 RD ノバーレ株式会社 大貫貴史博士、元素分析や各種スペクトルを測定いただいた第一三共 RD ノバーレ株式会社分析グループの皆様に、心より感謝を申し上げます。

東日本大震災の影響や異動など研究遂行が困難な状況に直面しましたが、志の高い研究員の皆様との交流や励ましがあきらめずに最後まで研究をやり遂げる原動力となりました。心より感謝いたします。

最後に、家族に感謝いたします。