

# Lucilactaene 生産系状菌における 二次代謝産物の生合成遺伝子と 代謝産物の解析

埼玉大学大学院理工学研究科（博士課程後期）

理工学専攻(指導教員 長田裕之)

学籍番号 16DB054

氏名 加藤 翔

2020年3月

## 略語一覧

- DNA . . . Deoxyribo Nucleic Acid  
Luc1 . . . Lucilactaene biosynthetic gene 1  
Luc2~8 も同様  
NMR . . . Nuclear Magnetic Resonance  
COSY . . . Correlation Spectroscopy  
Fus9 . . . Fusarin C biosynthetic gene 9  
HRESITOFMS . . . High Resolution Electrospray Ionization Time of Flight Mass Spectrometer  
calc'd . . . calculated  
MeOH . . . Methanol  
IR . . . Infrared Spectroscopy  
ATR . . . Attenuated Total Reflection  
DEPT . . . Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer  
HSQC . . . Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy  
HMBC . . . Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy  
PacC . . . Plasma membrane complex C  
AreA . . . Ammonium repressible A  
CreA . . . Carbon catabolite repression A  
cAMP . . . cyclic AMP  
HOG . . . High osmolarity glycerol  
Tor . . . Target of rapamycin  
HDAC . . . Histone Deacetylase  
PKS-NRPS . . . Polyketide synthase-Non ribosomal peptide synthetase  
DH . . . dehydrogenase  
P450 . . . P450 monooxygenase  
MT . . . Methyltransferase  
MIC . . . Minimum Inhibitory Concentration  
HPLC . . . High Performance Liquid Chromatography  
PDA . . . Potato Dextrose Agar  
FUSS . . . fusarin C biosynthesis PKS-NRPS  
ATMT 法 . . . *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation 法  
UPLC/MS . . . Ultra Pressure Liquid Chlomatography / Mass Spectram  
HRMS . . . High Resolution Mass Spectrometer  
EtOAc . . . ethyl acetate

MeCN · · · acetonitrile  
fr · · · fraction  
YSA · · · Yeast Sucrose Agar  
DMSO · · · Dimethyl Sulfoxide  
ROS · · · Reactive oxygen species  
UV · · · Ultraviolet  
LaeA · · · Loss of *afIR* expression A  
Lae1 · · · Loss of *afIR* expression 1  
UPR · · · Unfolded Protein Response  
RNA-seq · · · Ribonucleic acid-sequencing  
BLAST · · · Basic Local Alignment Search Tool  
US · · · Upstream Sequence  
DS · · · Downstream Sequence  
TF · · · Transcriptional Factor  
Km50 · · · kanamycin 50  $\mu$ g/ml  
*hph* · · · hygromycin phosphotransferase  
*gen<sup>r</sup>* · · · geneticin resistance gene  
hyg · · · hygromycin B  
hyg500 · · · hygromycin B 500  $\mu$ g/ml  
HMG-CoA · · · 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A  
PCR · · · Polymerase chain Reaction  
ORF · · · Open Reading Frame  
gDNA · · · genome DNA  
KS · · · ketosynthase  
AT · · · acyltransferase  
DH · · · dehydrogenase  
ER · · · enoylreductase  
KR · · · ketoreductase  
cMT · · · c-Methyltransferase  
Myb · · · myeloblastosis  
TPM · · · Transcripts Per Kilobase Million  
LB 培地 · · · Luria-Bertani 培地  
TE · · · Tris-EDTA  
SOC · · · Super Optimal broth with Catabolite repression  
OD · · · Optical density  
IM · · · Induction medium

CCM . . . co-cultivation medium  
As500 . . . Acetosyringone 500 µg/ml  
Carb . . . Carbenicillin 500 µg/ml  
MES . . . 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid  
PDB . . . Potato Dextrose Broth  
OM . . . Oatmeal  
CPC . . . Centrifugal Partition Chromatography  
FBS . . . Fetal Bovine Serum  
DMEM . . . Dulbecco's Modified Eagle's Medium  
RPMI . . . Roswell Park Memorial Institute medium  
HEPES . . . 4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid  
LDH . . . Lactate Dehydrogenase  
Tris . . . Tris(hydroxymethyl)aminomethane

# 目次

## 序章 序論

## 第1章 Lucilactaene の生物活性の解析

- 第1節 研究の目的と背景
- 第2節 Lucilactaene、NG-391、peak 3 の精製
- 第3節 Peak 3 の構造決定
- 第4節 lucilactaene 類縁体の生物活性評価
- 第5節 考察

## 第2章 タンパク質合成阻害剤 hygromycin B 処理による二次代謝産物生産誘導の解析

- 第1節 研究の背景と目的
- 第2節 タンパク質合成阻害剤 hygromycin B による二次代謝産物の生産誘導
- 第3節 Hygromycin B 処理時の生育阻害試験
- 第4節 Hygromycin B 処理したプレートの代謝物解析
- 第5節 赤色色素の解析
- 第6節 1233A と 1233B の同定
- 第7節 生産誘導された二次代謝産物の生物活性
- 第8節 考察

## 第3章 生産誘導される化合物の生合成遺伝子クラスターの解析

- 第1節 研究の背景と目的
- 第2節 RNA-seq を用いた hygromycin B 処理による二次代謝産物生合成遺伝子群の解析
- 第3節 Fusarubin 生合成遺伝子クラスターの解析
- 第4節 1233A 生合成遺伝子クラスターの解析
- 第5節 HMG-CoA 合成酵素の解析
- 第6節 考察

## 第4章 実験方法

## 第5章 参考文献

## 第6章 謝辞

## 序章 序論

微生物の生産する二次代謝産物は様々な構造を有し、その生理活性は長きにわたり新薬の探索源となっている。Statin や penicillin などが有名で幅広く人類に貢献し、さらに生命現象を解き明かすためのバイオプローブとしてケミカルバイオロジー研究に用いられてきた<sup>1</sup>。近年、ゲノム情報が解析されたことにより、微生物は想像以上に多くの二次代謝産物生産に必要な遺伝子を持つことが明らかとなってきた<sup>2</sup>。しかし、実験室環境下で利用できる二次代謝産物はごく一部であり、多くの二次代謝産物生合成遺伝子は休眠状態である。そのため活用されていない二次代謝産物は多く残されている<sup>3</sup>。これまでに様々な二次代謝の活性化手法が報告されているが、これらを駆使したとしてもすべての二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの代謝産物が生産されるようになるわけではない。今でもなお、二次代謝産物の活性化手法は求められている。本手法を発展させるためには、新たな二次代謝の活性化手法が必要不可欠である。

*Fusarium* 属は糸状菌の一種であり土壌環境中で分解者として働いているだけではなく、植物病害を引き起こし、感染過程の途中にカビ毒を生産し、病気やアレルギー性疾患などの原因となる。*Fusarium* 属の生産する二次代謝産物は gibberellins<sup>4</sup>、fusarisetine<sup>5</sup>、fusaric acid<sup>6</sup>、bikaverin<sup>7</sup>、fujikurins<sup>8</sup>、acoreno<sup>9</sup>などが明らかとなっている。解析が進んでいる生物種のうち *Fusarium fujikuroi* では全二次代謝生合成遺伝子クラスター中の 6 割が生産物と生合成遺伝子が紐づいている<sup>10</sup>。

糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 は理化学研究所の長田抗生物質研究室により、長崎県稲佐山にて採取された糸状菌である。変異型温度感受性 tsp53 を導入したヒト非小細胞肺癌 H1299 細胞 (H1299/tsp53 細胞) に対して細胞周期を G1 期で停止させる活性を示す抗がんリード化合物 lucilactaene (1) を生産する<sup>11</sup>。同時に NG-391 (2) という生合成中間体が生産されることが明らかとなっている。ドラフトゲノム解析によると、二次代謝産物生合成遺伝子クラスターは 42 個存在していることから、未利用の二次代謝産物が多く残されていることが示唆されていた。本菌の二次代謝産物と生合成遺伝子クラスターを詳細に解析することは、未知の二次代謝産物の発見や、新たな生合成遺伝子クラスターの同定に繋がる可能性がある。本研究では lucilactaene のさらなる生理活性の解析を行った。また lucilactaene 生産菌において hygromycin B による二次代謝産物の生産誘導の現象を見出し、生産誘導されてきた二次代謝産物の詳細な解析を行った

## 第1章 Lucilactaene の生物活性の解析

### 1-1 研究の目的と背景

発がんの過程で高頻度に変異が認められるがん抑制遺伝子である p53 は、発がんの抑制に重要な役割を果たし、DNA 損傷、熱ショック、低酸素状態などさまざまなストレスやがん遺伝子の活性化などの刺激により誘導される<sup>12,13</sup>。誘導された p53 は、DNA 配列特異的な転写調整因子として働き、細胞周期停止や、DNA 修復、アポトーシスを引き起こす。p53 は多くのヒトがん細胞において欠損あるいは変異している。そのため、p53 の欠損あるいは変異したがん細胞において変異型 p53 を正常型へと機能回復させる化合物や、p53 非依存的に p53 の下流因子を活性化させて細胞周期停止やアポトーシスを誘導する化合物は、抗がん剤のリード化合物になりうると思われる<sup>14,15</sup>。

Lucilactaene (1) は、理化学研究所の長田抗生物質研究室により、長崎県稲佐山にて採取された糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 の培養液から、変異型温度感受性 p53 を導入したヒト非小細胞肺癌 H1299 細胞 (H1299/tsp53 細胞) において p53 非依存的に細胞周期を G1 期で停止させる活性を指標に見出された低分子化合物である<sup>11</sup>。また、lucilactaene の類縁体である NG-391 (2) は神経成長因子産生促進作用及び神経栄養因子作用を有することが報告されている<sup>16</sup>。しかしながら、lucilactaene (1) 及び NG-391 (2) の微生物やほかのがん細胞種への活性や機能について未知の部分が多く残されている。

そこで、lucilactaene 生合成遺伝子クラスターを単離し、遺伝子破壊株を作製し生合成中間体を取得することと、lucilactaene (1) と NG-391 (2) と生合成中間体を用いて生理活性を解析し構造活性相関により活性に重要な部位を明らかにすることを目的とした。

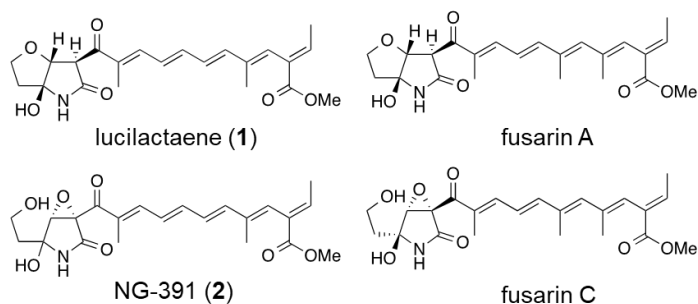


Fig. 1-1 Lucilactaene、NG-391、fuserin A、fuserin C の化学構造

## 1-2. Lucilactaene、NG-391、peak 3 の精製

微生物やほかのがん細胞種への活性については検討されていないことから、その生物活性を更に解析するために、lucilactaene (1) と NG-391 (2) を精製した。

Lucilactaene 生産菌 *Fusarium* sp. RK97-94 株を 2 L の FDY 培地で培養し、エキスから lucilactaene (1) を 2 mg、NG-391 (2) を 20 mg 取得した (Fig. 1-2)。

Lucilactaene (1) の生合成遺伝子の解析より、Luc1 がメチル基転移酵素と機能予測されていた。 $\Delta luc1$  株の代謝物解析により、新たなピークが生じ、lucilactaene (1) のカルボン酸部分が脱メチル化された代謝物であることが予想された (Fig. 1-3)。 $\Delta luc1$  株を用いて培養し、lucilactaene 脱メチル化体と推定される peak 3 を 2 mg 取得した (Fig. 1-4)。

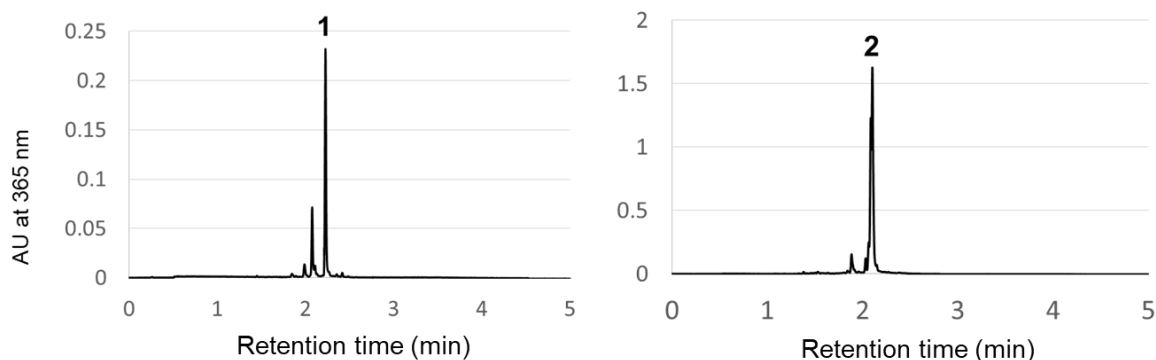


Fig. 1-2 精製した lucilactaene (1) と NG-391 (2) の UPLC クロマトグラム

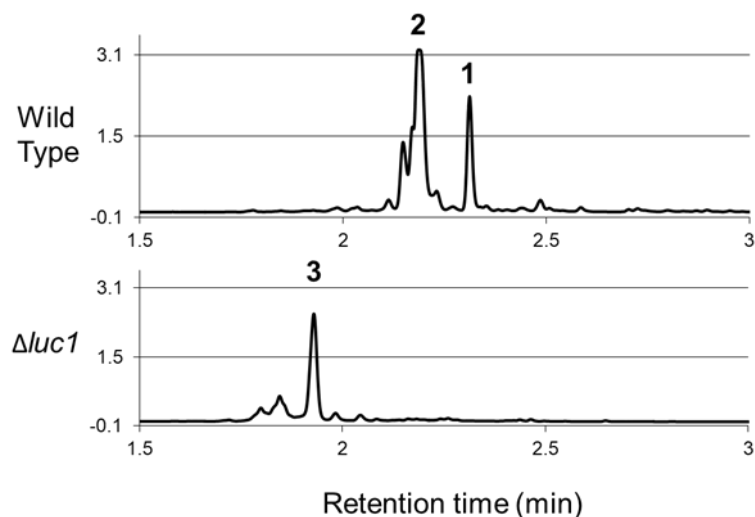


Fig. 1-3 野生型株と  $\Delta luc1$  株の代謝物分析



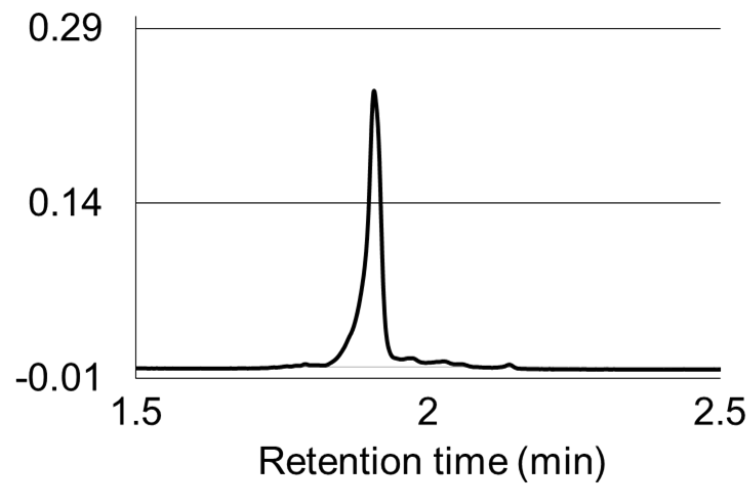


Fig. 1-4 精製した peak 3 の UPLC クロマトグラム

### 1-3. Peak 3 の構造決定

Peak 3 は高分解能エレクトロスプレーイオン化飛行時間型MS (HRMS) を用いて分子式が  $C_{21}H_{25}NO_6$  であると決定された (実測値  $m/z$ : 386.1599 [M-H]<sup>-</sup>、 $C_{21}H_{25}NO_6$  について計算値 386.1609)。Peak 3 の物理化学的性質を Table 1-1 にまとめた。次に、NMR 解析により化学構造を決定した (Fig. 1-5~9)。その結果、peak 3 が demethylucilactaene と (8Z) demethylucilactaene との混合物であることが明らかになった (Fig. 1-10)。これら 2 つの構造は <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY によって区別された (Table 1-2)。(8Z) demethylucilactaene は、C8 および C9 のプロトンカップリング定数が 11 であるため、シス型であることが明らかとなった。また、ucilactaene (1) とケミカルシフトを比較したところ、2 つのシグナルを除いて demethylucilactaene (3, 4) のケミカルシフトは ucilactaene (1) のものと一致した。Demethylucilactaene (3, 4) においては C21 位のシグナルは観察されず、C 20 位のケミカルシフト値はより低い値に変化していた。

以上の結果から、 $\Delta luc1$  株が demethylucilactaene を蓄積していることが示され、Luc1 が demethylucilactaene (3, 4) のカルボキシル基をメチル化する酵素であることが明らかになった。このメチル化は、fusarin C (Fig. 1-1) 生合成の最終工程と対応する<sup>11</sup>。Fusarin C の場合、メチル基転移酵素 (Fus9) は、カルボキシル基のメチル化を担う。我々のデータは Luc1 が Fus9 のオルソログであることを示している。

Appearance	Pale yellow amorphous solid
Molecular formula	C <sub>21</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>6</sub>
HRESITOFMS ( <i>m/z</i> )	found: 386.1599 [M-H] <sup>-</sup> , calc'd for C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>6</sub> : 386.1609
UV λ <sub>max</sub> nm (ε in MeOH)	282 (9400), 362 (28600)
IR(ATR) ν (cm <sup>-1</sup> )	3234, 1700, 16437 1569, 1384, 1363, 1238, 1052, 995

Table1-1 Peak 3 の物理化学的性質

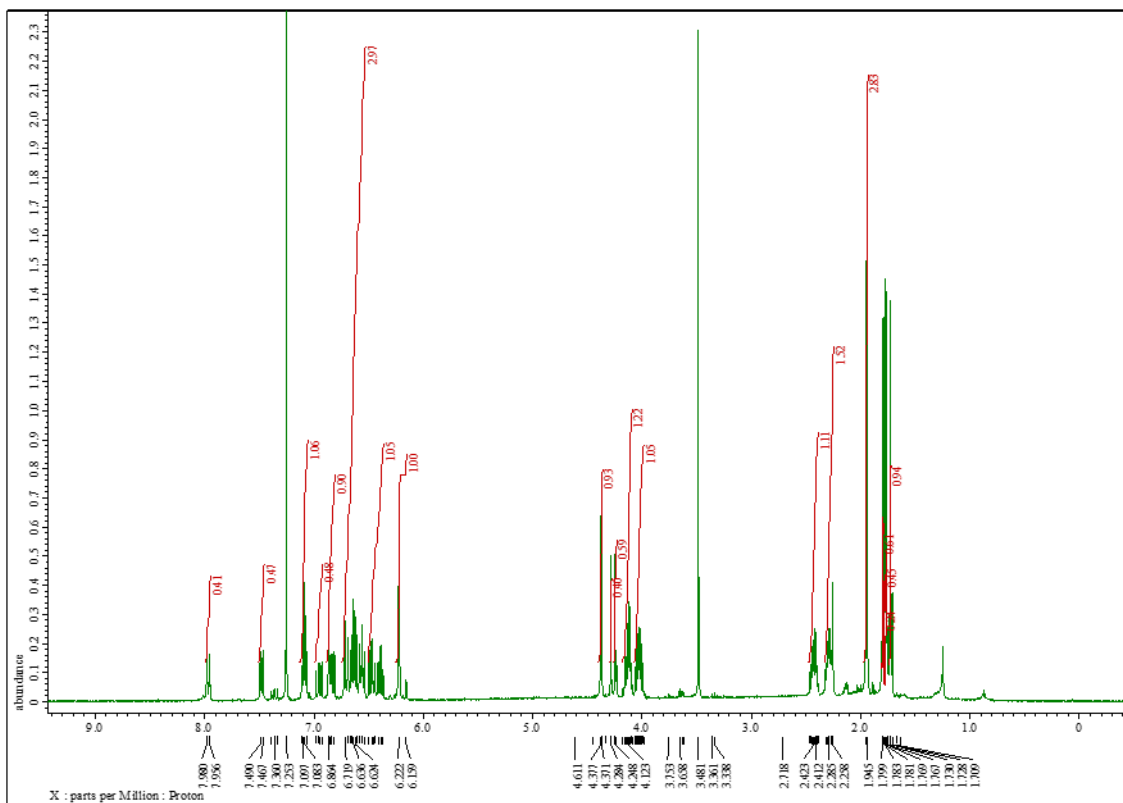


Fig. 1-5 Peak 3 の <sup>1</sup>H-NMR

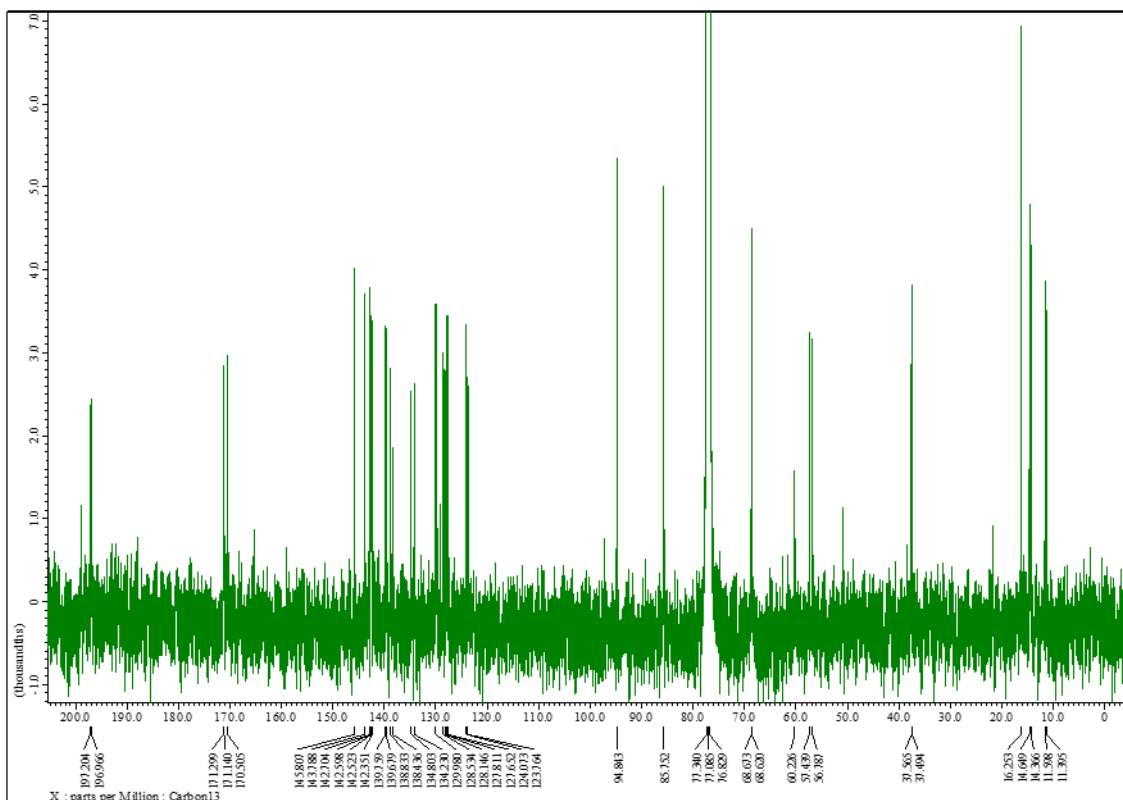


Fig. 1-6 Peak 3 の <sup>13</sup>C-NMR

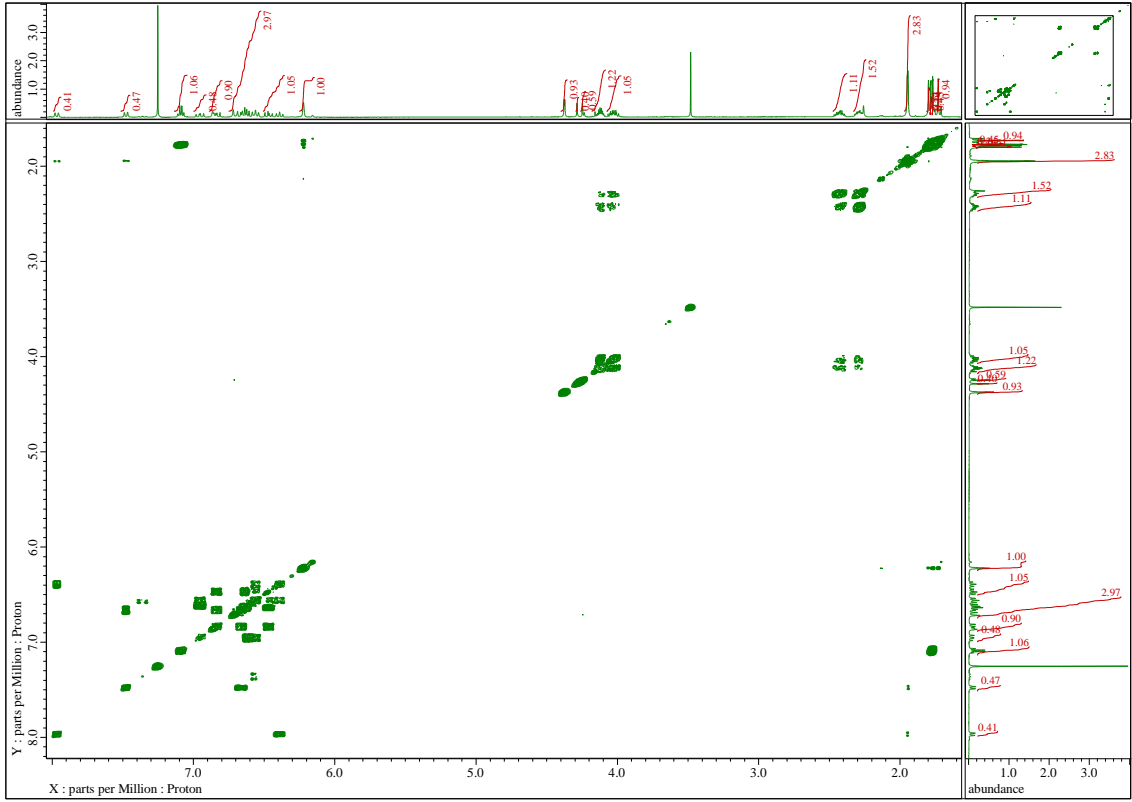


Fig. 1-7 Peak 3 の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

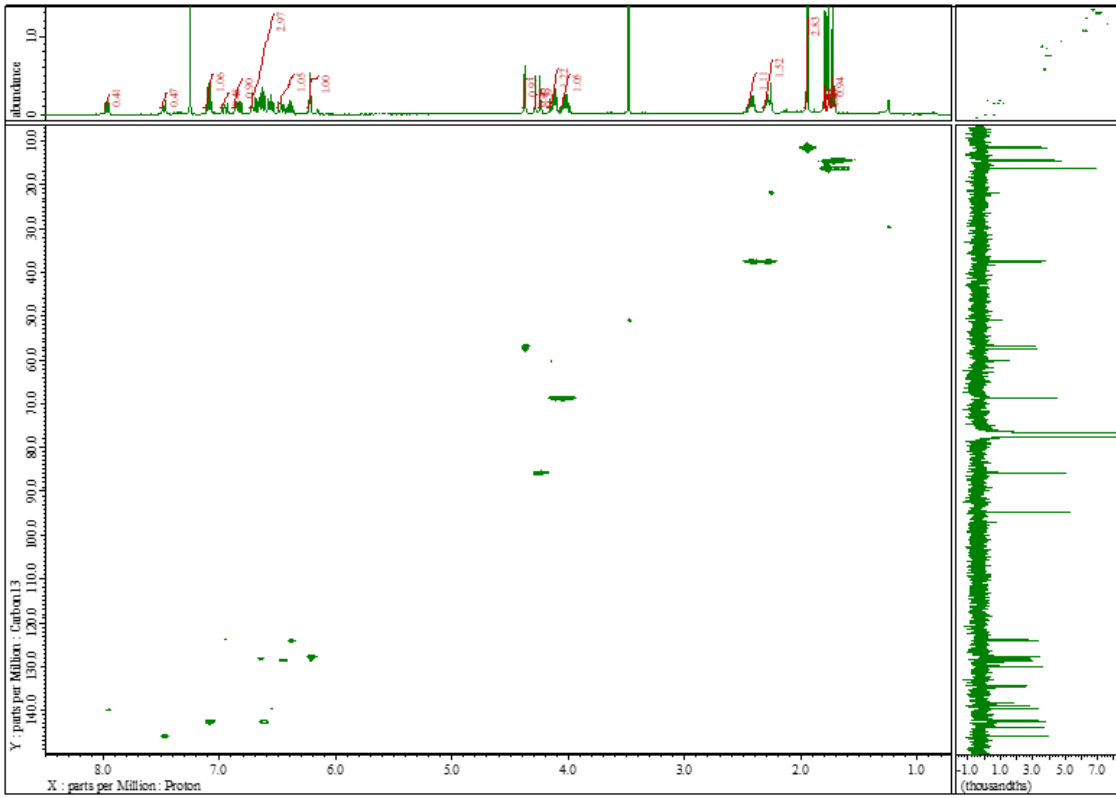


Fig. 1-8 Peak 3 の HSQC

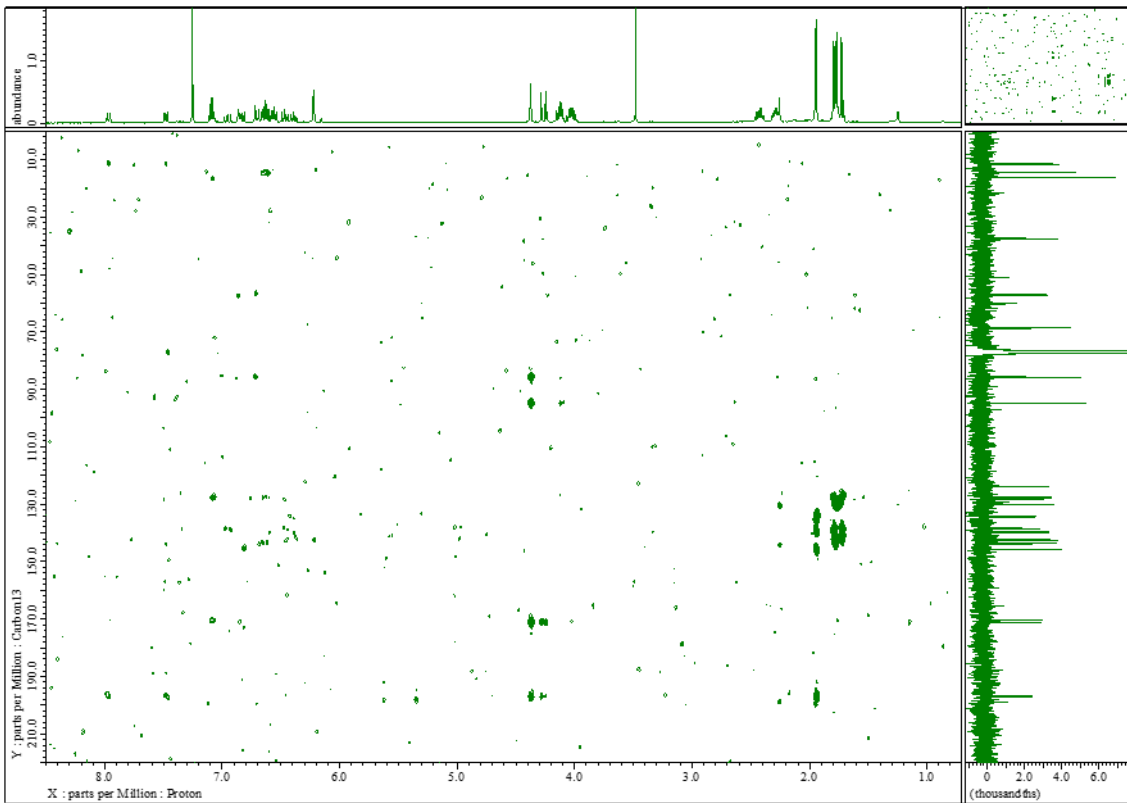


Fig. 1-9 Peak 3 の HMBC

position	lucilactaene (1)			demethylucilactaene (3)			(8Z)-demethylucilactaene (4)		
	C ( $\delta_C$ )	H ( $\delta_H$ )	Multi ( $J$ in Hz)	C ( $\delta_C$ )	H ( $\delta_H$ )	Multi ( $J$ in Hz)	C ( $\delta_C$ )	H ( $\delta_H$ )	Multi ( $J$ in Hz)
1	15.9	1.75	dd (1.4, 7)	16.2	1.77	d (7)	16.2	1.77	d (7)
2	140.6	7.01	qd (0.9, 7)	142.6* <sup>1</sup>	7.08	q (7)	142.5* <sup>1</sup>	7.08	q (7)
3	130.3			129.9			129.9		
4	128.1	6.24	s	127.7* <sup>2</sup>	6.22	s	127.6* <sup>2</sup>	6.22	s
5	138.0			138.7* <sup>3</sup>			138.4* <sup>3</sup>		
6	142.3	6.64	d (15.1)	142.4* <sup>4</sup>	6.63	d (15)	142.3* <sup>4</sup>	6.63	d (15)
7	128.3	6.47	dd (11, 15.1)	128.5	6.46	dd (11, 15)	123.7	6.94	dd (11, 15)
8	143.7	6.85	dd (11, 14.7)	143.7	6.83	dd (11, 14)	139.6	6.55	t (10)
9	128.0	6.68	dd (11.5, 14.7)	128.1	6.65	dd (12, 15)	124.0	6.38	t (11)
10	145.6	7.48	d (11.5)	145.7	7.46	d (11)	139.7	7.96	d (12)
11	134.2			134.1			134.7		
12	197.0			197.1* <sup>5</sup>			196.9* <sup>5</sup>		
13	56.6	4.36	s	57.4* <sup>6</sup>	4.36	s	56.7* <sup>6</sup>	4.36	s
14	85.7	4.25	d (0.9)	85.7	4.24	s	85.7	4.28	s
15	94.4			94.8			94.8		
17	170.5			171.2* <sup>7</sup>			171.1* <sup>7</sup>		
18	37.5	2.28, 2.43	multi	37.4* <sup>8</sup>	2.27, 2.41	multi	37.5* <sup>8</sup>	2.27, 2.41	multi
19	68.5	4.03, 4.13	multi	68.5* <sup>9</sup>	4.01, 4.11	multi	68.6* <sup>9</sup>	4.01, 4.11	multi
20	167.5			170.4			170.4		
21	52.0	3.75	s	-			-		
22	14.3	1.72	d (1.4)	14.6* <sup>10</sup>	1.79* <sup>11</sup>	s	14.3* <sup>10</sup>	1.72* <sup>11</sup>	s
23	11.6	1.96	s	11.5	1.94	s	11.3	1.95	s

Table 1-2 Lucilactaene と peak 3 のケミカルシフトの比較

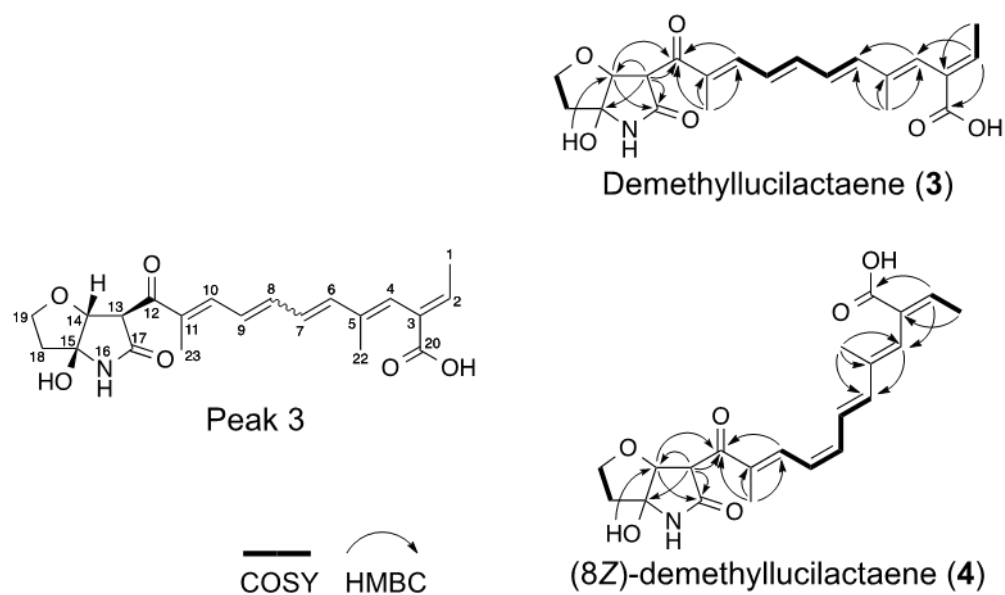


Fig. 1-10 Peak 3 の化学構造

#### 1-4. Lucilactaene、NG-391、demethylucilactaene の生物活性評価

Lucilactaene 微生物やほかのがん細胞種への活性や機能を解析するために、3化合物の生物活性評価を依頼した。その結果、lucilactaene (1) と NG-391 (2) はがん細胞とマラリア原虫に対して増殖阻害活性が認められたが、抗菌及び抗真菌活性は示さなかった (Table 1-3)。

一方、demethylucilactaene (3, 4) では lucilactaene (1) が示していた活性が著しく低下した。これらの結果より、lucilactaene (1) の活性にはエーテル環の形成とカルボキシル基のメチル化が重要であることが明らかとなった。

生物種	名称	IC <sub>50</sub> (µg/ml)		
		lucilactaene	NG-391	Peak 3 (3+4)
動物	HeLa	10	5.9	> 30
動物	HL60	7.0	6.6	> 30
グラム陽性細菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	> 30	> 30	> 30
グラム陰性細菌	<i>Escherichia coli</i>	> 30	> 30	> 30
糸状菌	<i>Aspergillus fumigatus</i>	> 30	> 30	> 30
糸状菌	<i>Pyricularia oryzae</i>	> 30	> 30	> 30
糸状菌	<i>Candida albicans</i>	> 30	> 30	> 30
原虫	<i>Plasmodium falciparum</i>	0.063	0.75	17

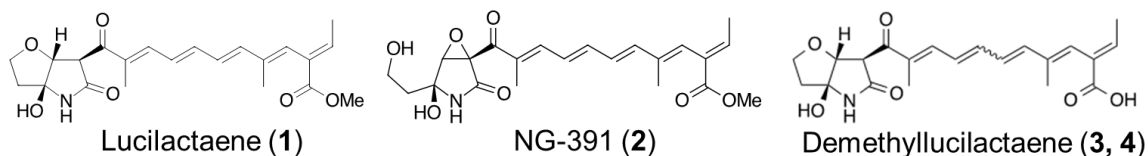


Table. 1-3 Lucilactaene (1)、NG-391 (2)、demethylucilactaene (3, 4)の生物活性評価



## 1-5. 考察

本章では lucilactaene (1) の生理活性を調べるべく、lucilactaene (1)、NG-391 (2)、demethylucilactaene (3) を精製し生物活性を評価した。その結果、lucilactaene (1) と NG-391 (2) は動物細胞とマラリア原虫に対して増殖阻害活性を示したのに対し、demethylucilactaene (3) は活性を示さなかった。これらの結果から、カルボキシル基のメチル化が活性に必要であることが示唆された。また、lucilactaene (1) は 0.056 µg/ml という低濃度で抗マラリア活性を示すのに対し、エーテル環の開環した NG-391 (2) では活性が低くなることから、lucilactaene (1) のエーテル環がマラリア原虫に対する活性には重要であることが示唆された。特筆すべき点として、全ての化合物は細菌や真菌に対して活性を示さなかった。また、fusarin C はカビ毒として知られている<sup>17</sup>。Fusarin C のアナログである fusarin A (Fig. 1-1) は lucilactaene と類似した構造を持ち、変異原性を持たないことが報告されている<sup>18</sup>。Fusarin A は lucilactaene (1) と似た活性を持つことが考えられる。

## 第 2 章タンパク質合成阻害剤 hygromycin B 処理による二次代謝産物生産誘導の解析

### 2-1. 背景と目的

真菌は栄養源や pH、温度などの外部環境の変化に対応して二次代謝産物を生合成することが知られている<sup>19</sup>。環境要因と転写因子の関係性は現在まで幅広く研究されており、PacC と pH<sup>20</sup>、CCAAT-binding complex (CBC) と鉄イオン<sup>21</sup>、AreA と窒素<sup>22</sup>、velvet 複合体と光<sup>23</sup>、CreA と炭素源<sup>24</sup>が報告されている。これらの転写因子が二次代謝の生合成遺伝子クラスターの発現を制御している。*Aspergillus* 属では更にシグナル伝達経路について研究されている。外部刺激に応答する経路は Tor 経路、Ca<sup>2+</sup>経路、cAMP 経路、HOG 経路が保存されていることが知られている<sup>19</sup>。二次代謝産物生合成遺伝子はグローバルな制御因子 LaeA によって制御されていることも報告されている<sup>25, 26, 27</sup>。また、二次代謝産物生合成遺伝子はヒストンの修飾が変化することで、発現するようになり、二次代謝産物が生産されるようになる。例えば HDAC 阻害剤であるニコチンアミドの添加によりヒストンアセチル化を上昇させることにより、二次代謝産物を誘導することができることが知られている<sup>28, 29</sup>。しかし、これらを駆使したとしてもすべての二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの代謝産物が生産されるようになるわけではない。今でもなお、二次代謝産物の活性化手法は求められている。

本章ではタンパク質合成阻害剤である hygromycin B が二次代謝を活性化させることを見出している。lucilactaene 生産菌において hygromycin B 処理により生産誘導される二次代謝産物を同定し、生理活性を明らかにすることを目的とした。

## 2-2. タンパク質合成阻害剤 hygromycin B 処理による二次代謝産物の誘導

各 lucilactaene 生合成遺伝子破壊株の作製に hygromycin B 耐性遺伝子マーカー *hph* を用い、選択培地に hygromycin B を添加することで形質転換体を取得していた。Hygromycin B を処理していたところ、いくつかの形質転換体で色素生産誘導が確認され、二次代謝産物生産が誘導されている可能性が考えられた (Fig. 2-1)。そこで、野生型株に対し 24 穴プレート上での培養を行い hyg500 (hygromycin B 終濃度 500  $\mu\text{g/ml}$ ) 添加し、本培養開始から 7 日目に代謝物をエタノール抽出し、UPLC/MS を用いて分析した。野生型株において hygromycin B 未処理の培地に比べ、処理した培地では菌体の黒色化が確認された (Fig. 2-2)。培養液を分析したところ NG-391 と lucilactaene とともに生産量が 5 倍程度上昇していた (Fig. 2-3)。この結果より、hygromycin B 処理により lucilactaene (1) と NG-391 (2) の生産誘導が引き起こされることが明らかとなった。

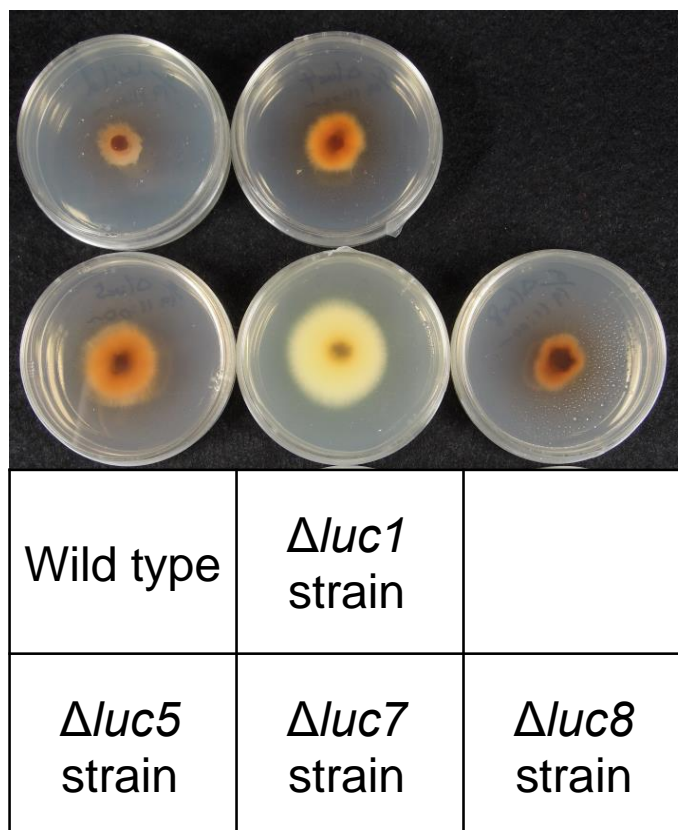
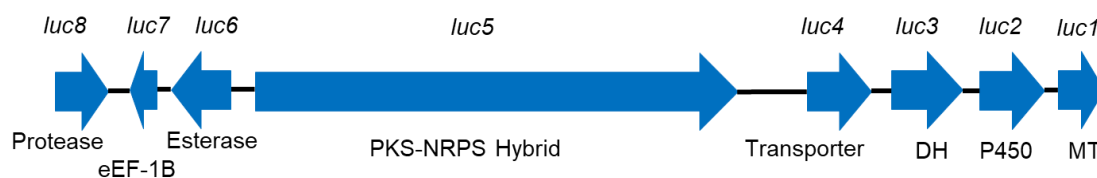


Fig. 2-1 野生型株と lucilactaene 生合成遺伝子破壊株に対して 7 日間 hygromycin B を 100  $\mu\text{g/ml}$  処理した菌体

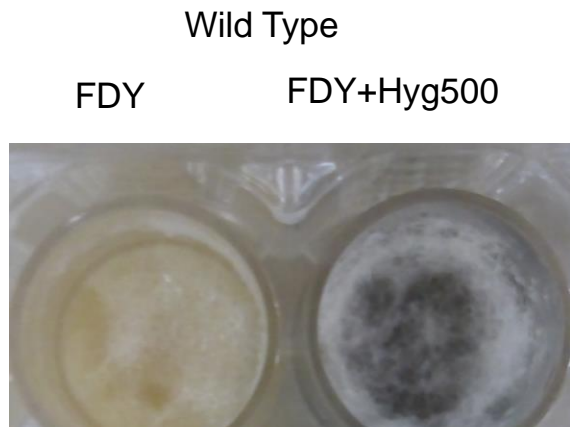


Fig. 2-2 野生型株を FDY 液体培地中で 24 穴プレートで 7 日間静置培養し、  
hygromycin B を 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  処理した菌体

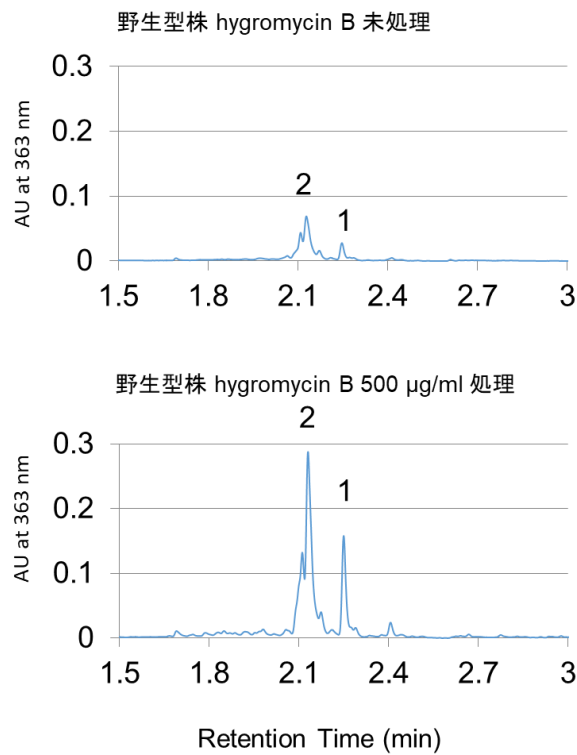


Fig. 2-3 Hygromycin B 処理と未処理の培地中に含まれる lucilactaene (1) 、NG-391 (2)  
の比較

### 2-3. Hygromycin B 処理時の生育阻害試験

*Fusarium* sp. RK97-94 の野生型株に対し、各 hygromycin B 濃度 (50, 100, 200, 300  $\mu\text{g/ml}$ ) を加えた PDA プレート上で菌体を 1 mm 角程度播種した。28°C 暗所で培養後、7 日目に観察した (Fig. 2-4)。50  $\mu\text{g/ml}$  以上の濃度において、本菌の生育したプレートは赤くなり菌体は黒色化していた。そして、hygromycin B 濃度が上昇すればするほど赤色を呈したままコロニーは小さくなっていった。さらに 300  $\mu\text{g/ml}$  では生育が完全に阻害された。

以上の結果から、hygromycin B 濃度が MIC 以下のプレートでは生育阻害されながらも、赤色色素を生産していることが明らかとなった。また、野生型株は hygromycin B に対して感受性があり、耐性株ではないことが明らかとなった。

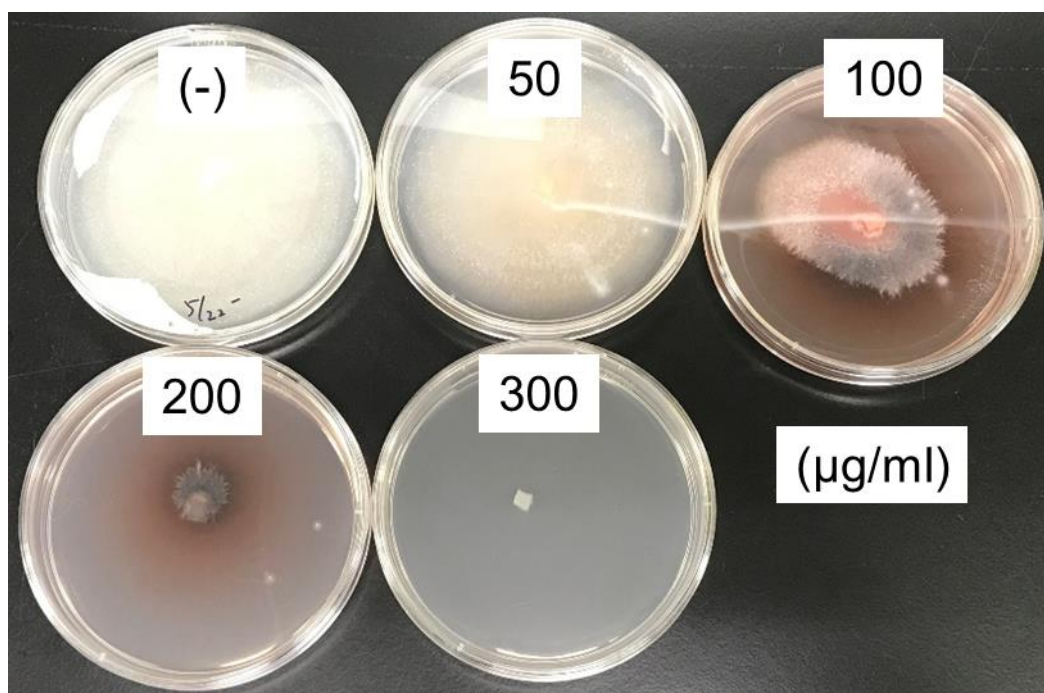


Fig. 2-4 野生型株と lucilactaene 生合成遺伝子破壊株に対して 7 日間 hygromycin B を処理した菌体

#### 2-4. Hygromycin B 処理したプレートの代謝物解析

次に hygromycin B 処理による代謝物の変化を解析するために、hygromycin B 濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  で処理した際のプレートの代謝物を分析した (Fig. 2-5)。

その結果、本菌の二次代謝産物である lucilactaene (1) と NG-391 (2) の生産量が未処理と比較して上昇していることが明らかになった。また、500 nm 付近の波長において吸収極大を持つ代謝物のピーク (5) が新たに確認された。これらの結果から本菌に対し、hygromycin B が二次代謝産物の生産を誘導することが示唆された。

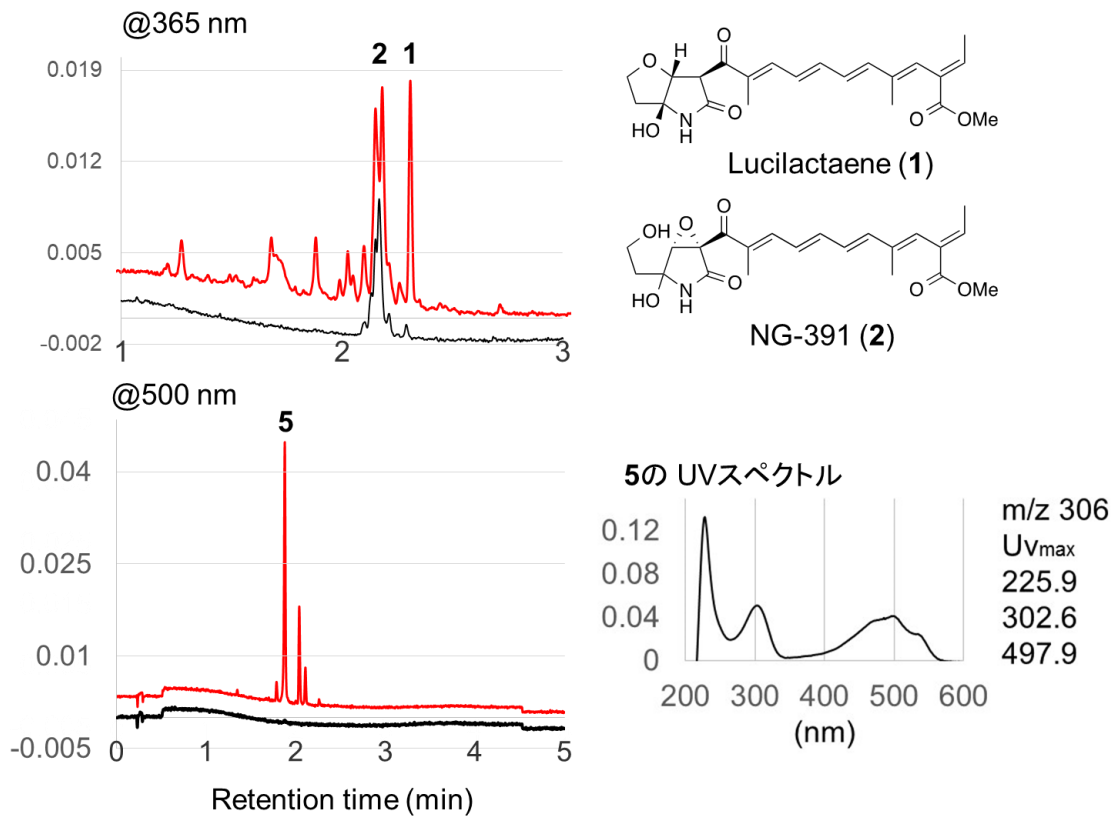


Fig. 2-5 野生型株と lucilactaene 生合成遺伝子破壊株に対して 7 日間 hygromycin B を 100  $\mu\text{g/ml}$  処理した菌体の培養物分析

## 2-5. 赤色色素の解析

野生型株を使用すると lucilactaene (1) と NG-391 (2) のピークが、取得しようとした 5 のピークに重なってしまい、精製が困難になることが考えられた。そこで、同様の効果の確認できる lucilactaene 生合成遺伝子 *luc5* を破壊した  $\Delta$ *luc5* 株を使用した。

$\Delta$ *luc5* 株を PDA 培地にて生育させ、500 nm 付近に極大吸収を持つ赤色色素のピークを Fig. 2-6 に示す方法で精製した。HPLC 分取したピークと対応するようにフラクションの色が赤くなっていたことから、このフラクションの代謝物が赤色色素であると考えた。fr 28 は Fig. 2-5 に示すような UV スペクトルを有し、分子量が 306 であることが確認された。NMR と HRMS の解析による化合物の構造決定を試みた (Fig. 2-7~12)。HRMS を用いて分子式が  $C_{15}H_{14}O_7$  であると決定された (実測値  $m/z$  305.0663 [M-H]<sup>-</sup>、 $C_{15}H_{14}O_7$  の計算値 305.0667)。そして、これらの情報をもとに化合物検索を行ったところ、fusarubin (5) という *Fusarium* 属が生産する二次代謝産物であることを同定した (Table. 2-1、Fig. 2-13)。Fusarubin (5) は *Fusarium solani* が生産する赤色色素として報告されている<sup>30</sup>。また様々な *Fusarium* 属に幅広く生産される<sup>31</sup>。

次に fusarubin (5) の生物活性を調べるために生物活性評価を依頼した。その結果、fusarubin (5) はいくつかのがん細胞種とグラム陽性細菌と真菌とマラリア原虫に対し増殖阻害活性を示した (Table 2-2)。

PDA Plate × 30 plates  
 $\Delta luc5$ 株  
(hygromycin B: 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )  
28°C 7days  
↓  
MeOH:acetone=1:1  
抽出 (20 ml)  
↓  
EtOAc抽出 (40 mg)  
↓  
HPLC (H<sub>2</sub>O:MeCN gradient)  
↓  
fr 28 (18.2 mg)  
↓  
NMR  
HRMS

Fig. 2-6 赤色色素の精製スキーム



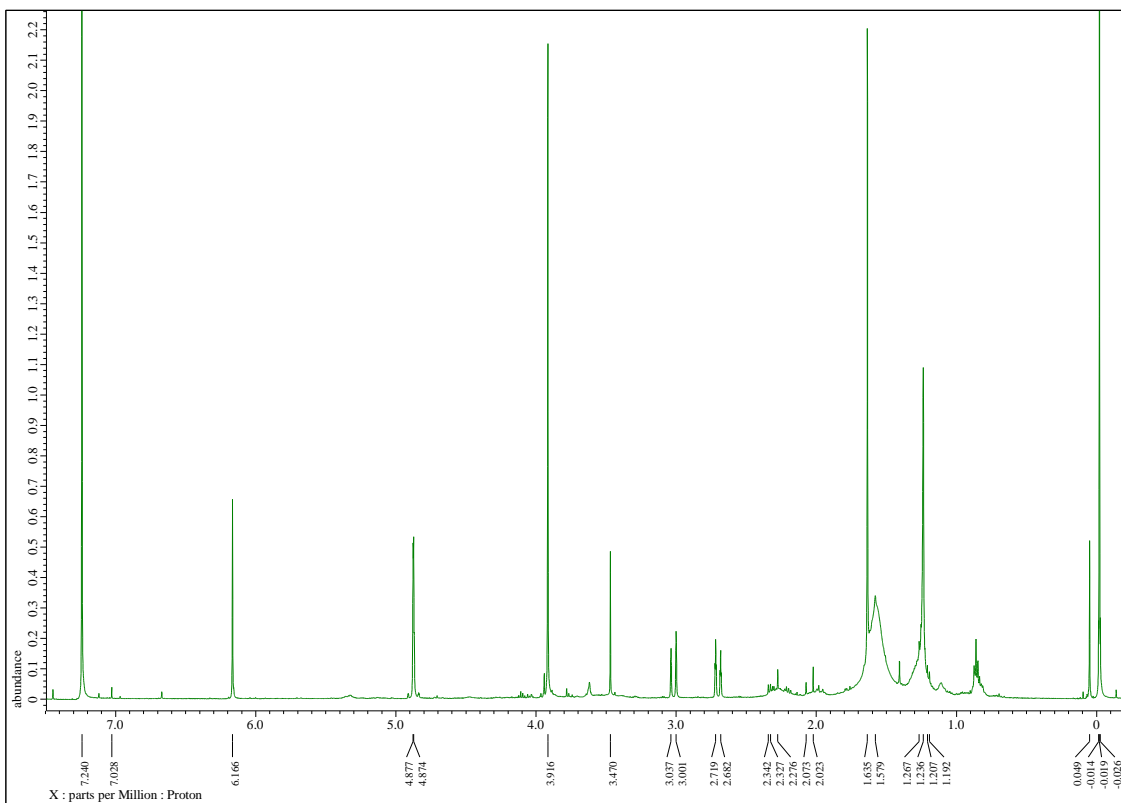


Fig. 2-7 Fusarubin の  $^1\text{H}$ -NMR

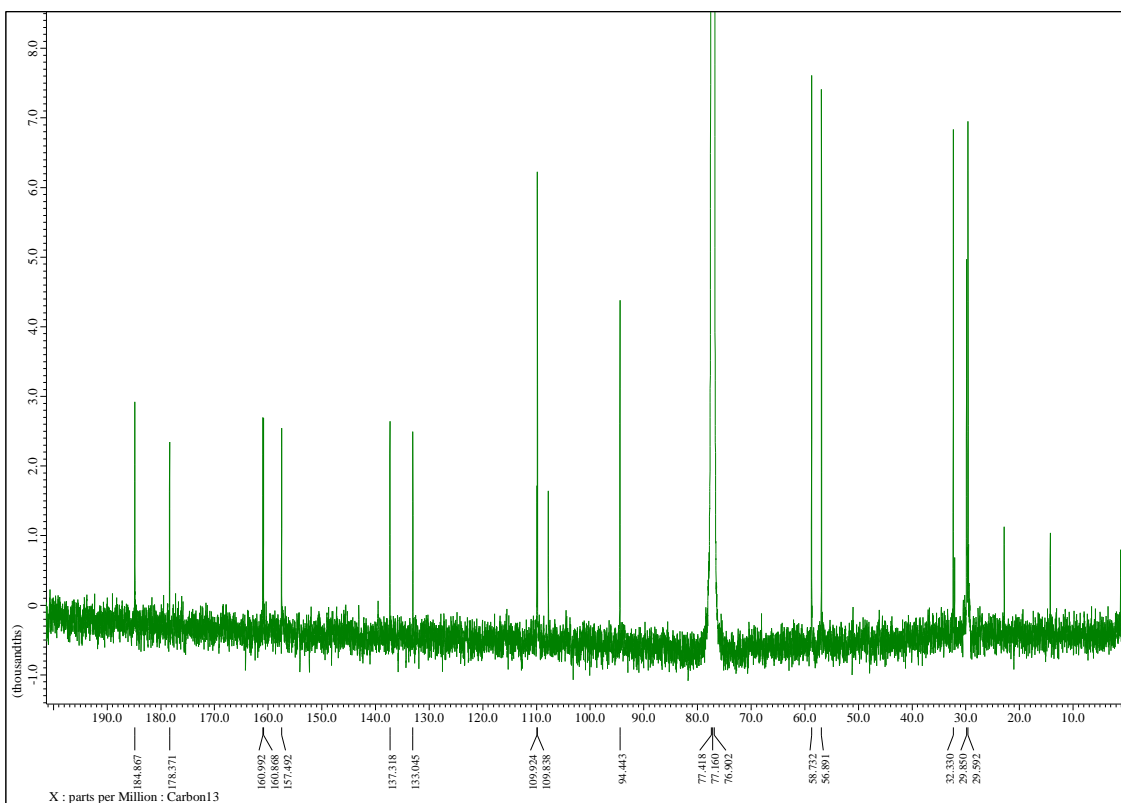


Fig. 2-8 Fusarubin の  $^{13}\text{C}$ -NMR

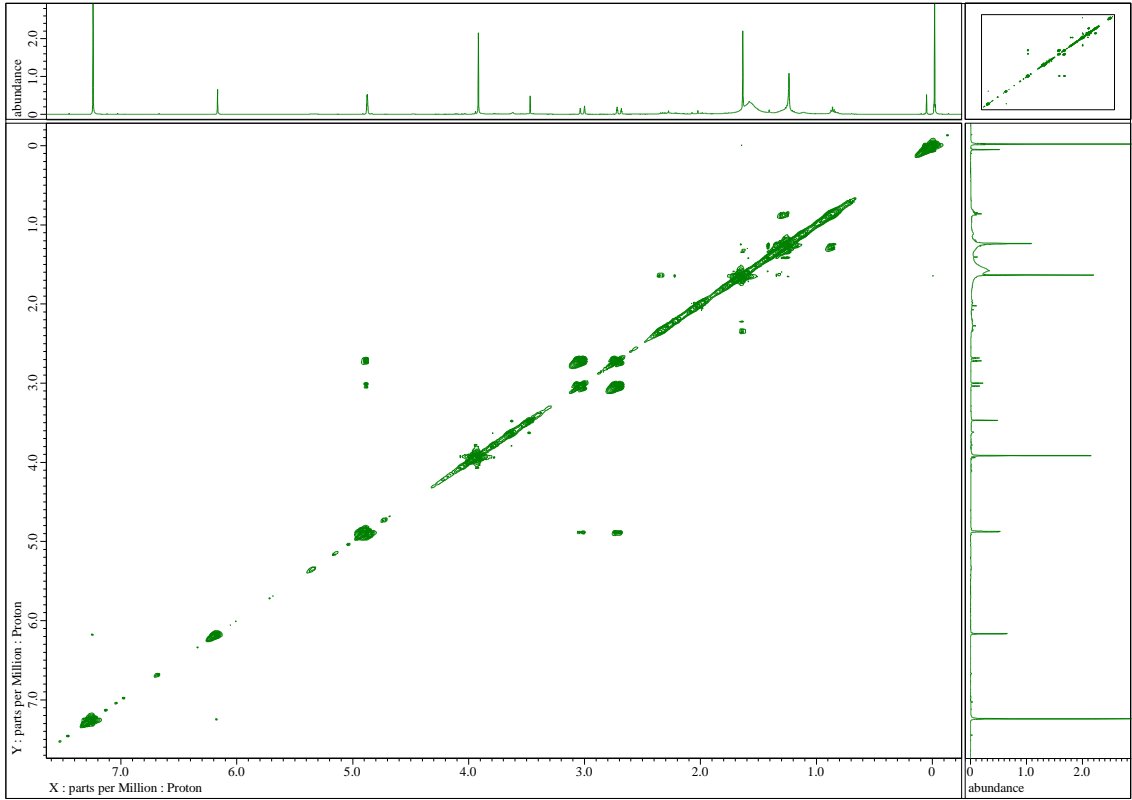


Fig. 2-9 Fusarubin の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

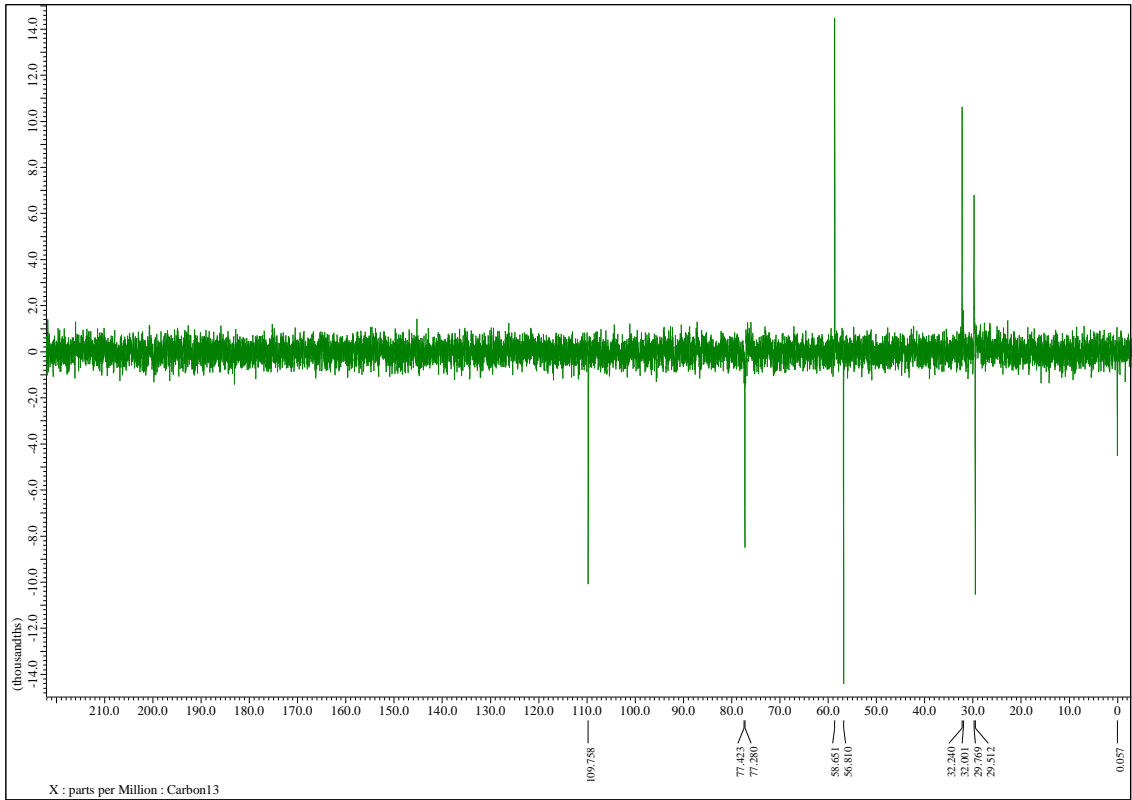


Fig. 2-10 Fusarubin の DEPT

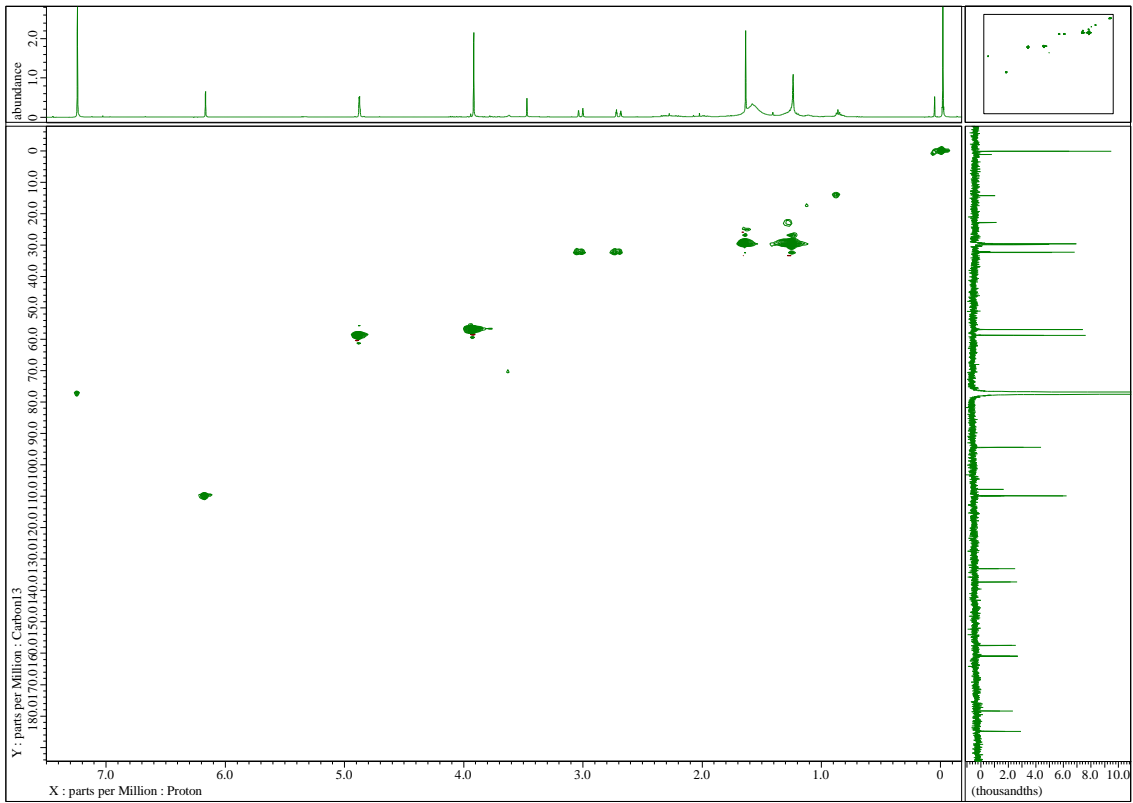


Fig. 2-11 Fusarubin の HSQC

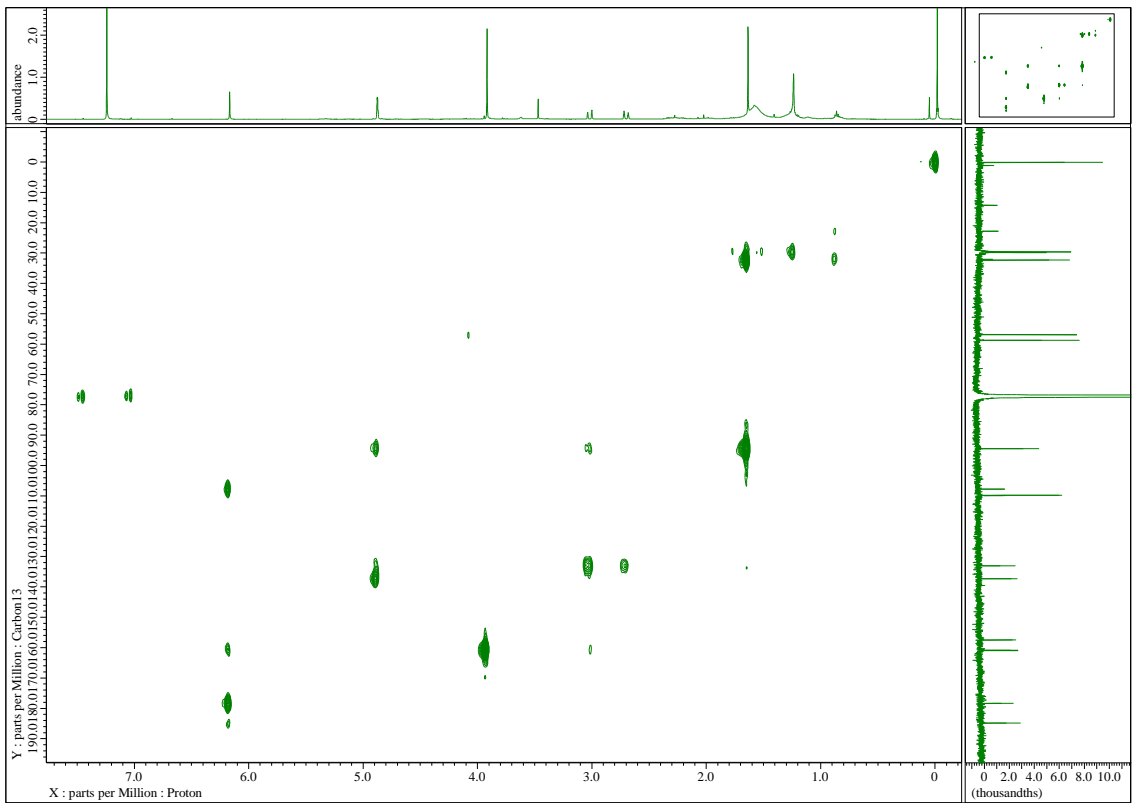


Fig. 2-12 Fusarubin の HMBC

position	$\delta_c$	$\delta H$ , mult. ( $J$ in Hz)	HMBC
1	58.6	4.88, d (1.5)	13, 14
2	-		
3	94.4		
4	32.2	3.037, dt (18, 2)	3, 13
5	184.9		
6	160.9		
7	109.7	6.18, s	6, 7, 8
8	178.3		
9	157.4	12.9, s	9, 12, 13
10	160.9	12.7, s	10, 11, 14
11	109.8		
12	107.7		
13	137.2		
14	132.9		
15	29.5	1.28, s	3
16	56.8	3.92, s	6

Table 2-1 Fusarubin (5) のケミカルシフト

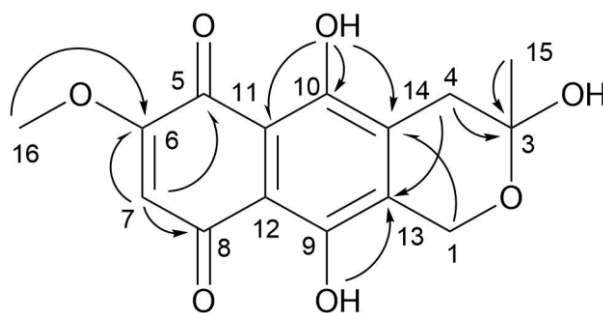


Fig. 2-13 Fusarubin (5) の化学構造

IC<sub>50</sub> (μg/ml)

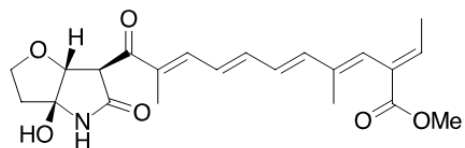
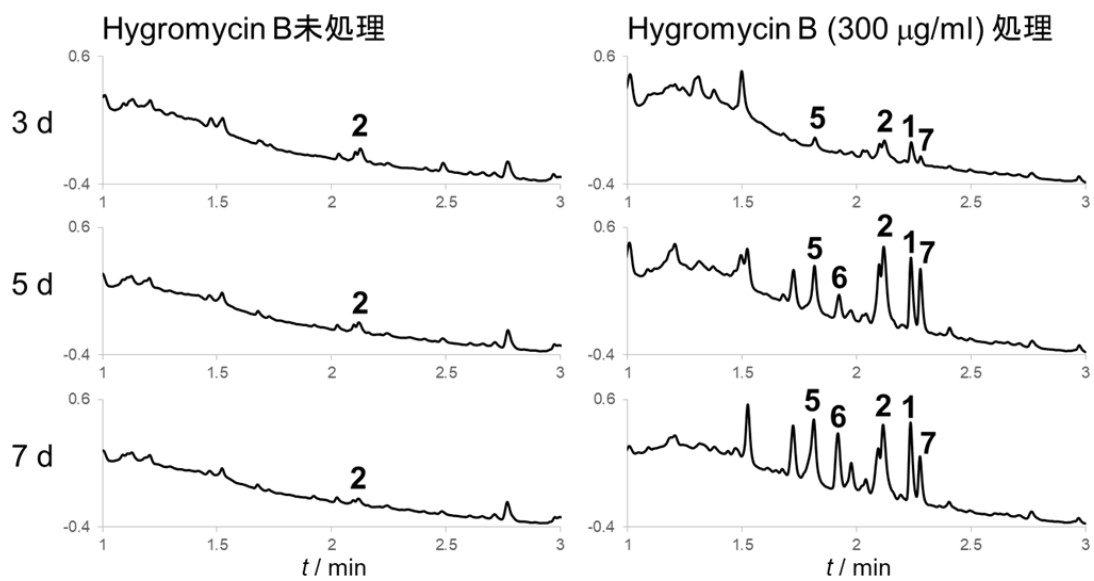
生物種	名称	fusarubin
動物	HeLa	11
動物	HL60	17
グラム陽性細菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	4.1
グラム陰性細菌	<i>Escherichia coli</i>	>30
糸状菌	<i>Aspergillus fumigatus</i>	24
糸状菌	<i>Pyricularia oryzae</i>	20
糸状菌	<i>Candida albicans</i>	>30
原虫	<i>Plasmodium falciparum</i>	4.6

Table 2-2 Fusarubin (5) の生物活性評価

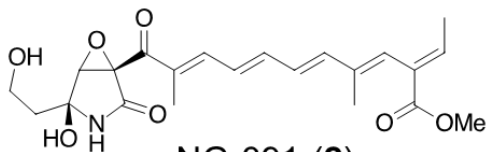
## 2-6. 1233A と 1233B の生産誘導

次に様々な培地に hygromycin B を添加して培養し二次代謝産物を分析した。その結果、FDY 培地に hygromycin B を 100  $\mu\text{g/ml}$  添加した静置条件において、新たなピークが観察された。静置条件では lucilactaene 類の生産量が上昇し、fusarubin (5) 及び代謝物 (6、7) の生産誘導が確認された (Fig. 2-14)。

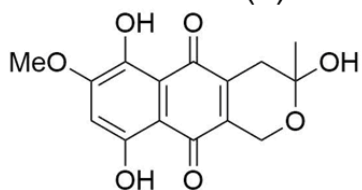
Hygromycin B 処理により生産が誘導された 6、7 を生産する培養条件を検討した結果、hygromycin B を終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  加えたオートミール液体培地で静置条件で生育させると代謝物 6、7 がもっとも効率よく生産誘導されることを見出した。Lucilactaene 類のピークが 7 近傍にあったため、lucilactaene 生合成の PKS-NRPS 遺伝子破壊株である  $\Delta luc5$  株を用いて大量培養し、Fig. 2-15 に示すスキームに従い精製を行った。2 L のオートミール液体培地から 1.36 g の酢酸エチル抽出物を得た。エキスは HPLC によって精製した。fr 29 に代謝物 6、37 に 7 がそれぞれ含まれていることが UPLC/MS により明らかとなった。それらの NMR と MS の解析により、1233A (7) とその類縁体 1233B (6) であることが明らかとなった (Fig. 2-16~28)。1233A (7) は 1971 年に報告された化合物であり、PKS により生合成されることが示唆されていた<sup>32,33</sup>。1233A はメバロン酸経路の HMG-CoA 合成酵素を阻害する活性を有していることが報告されている<sup>34</sup>。



Lucilactaene (1)



NG-391 (2)



Fusarubin (5)

Fig. 2-14 野生型株を hygromycin B 存在下の FDY 液体培地で静置培養したサンプルの代謝物分析

Oatmeal 50ml/plate × 40 plates  
 $\Delta luc5$ 株  
(hygromycin B: 100  $\mu\text{g/ml}$ )  
28°C 5days  
↓  
Acetone抽出  
↓  
EtOAc抽出 (1.36 g)  
↓  
HPLC (H<sub>2</sub>O:MeCN gradient)  
↓  
fr 29 (compound **6**)  
fr 37 (compound **7**)  
↓  
NMR  
HRMS

Fig. 2-15 化合物 **6** と **7** の精製スキーム



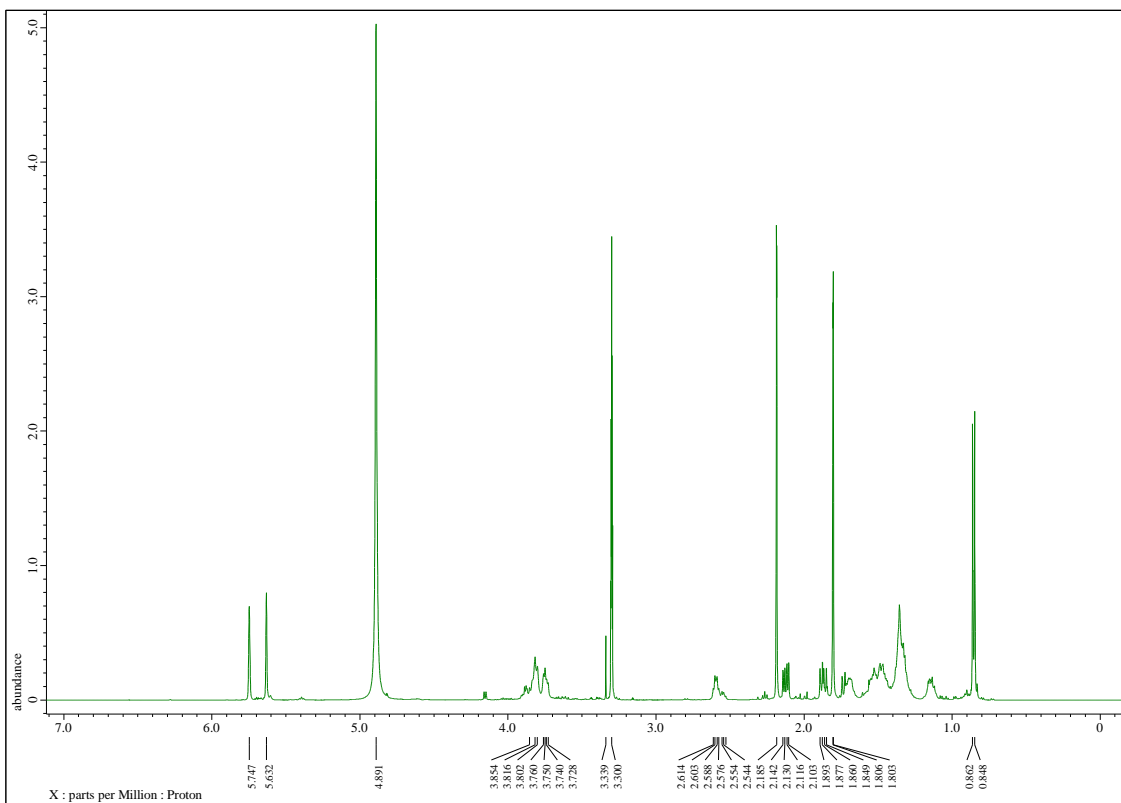


Fig. 2-16 1233A の  $^1\text{H}$  NMR

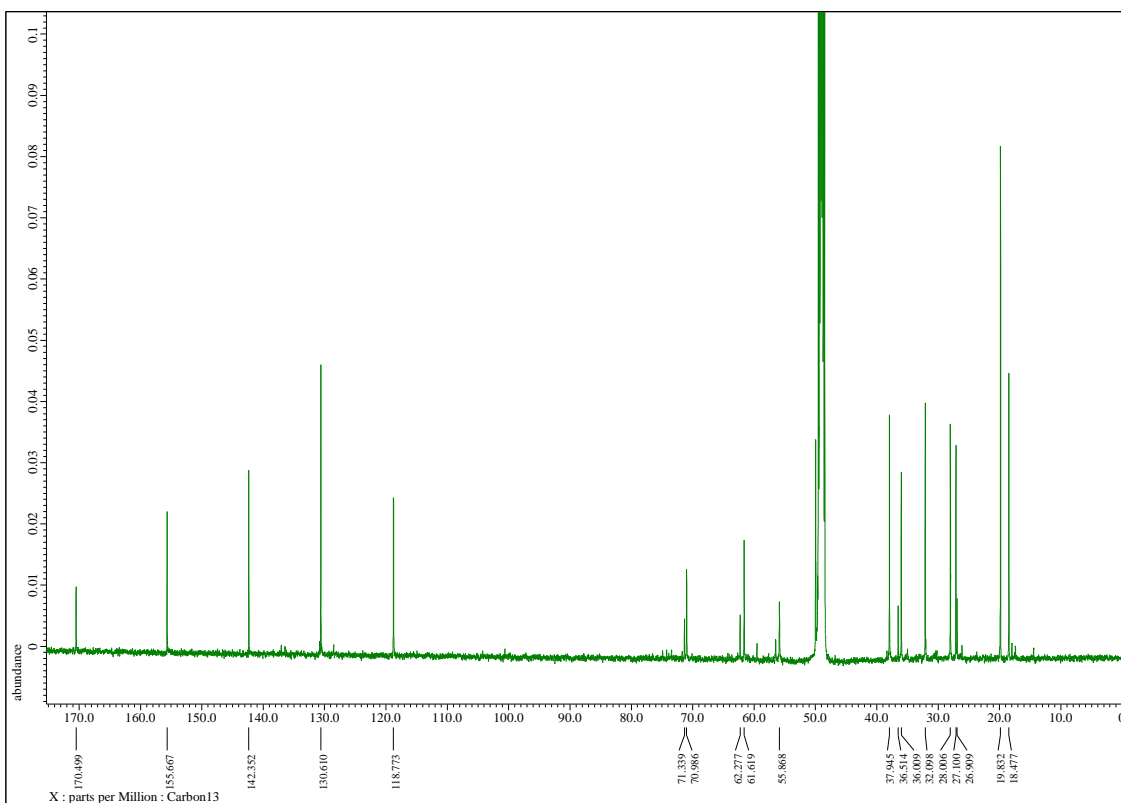


Fig. 2-17 1233A の  $^{13}\text{C}$  NMR

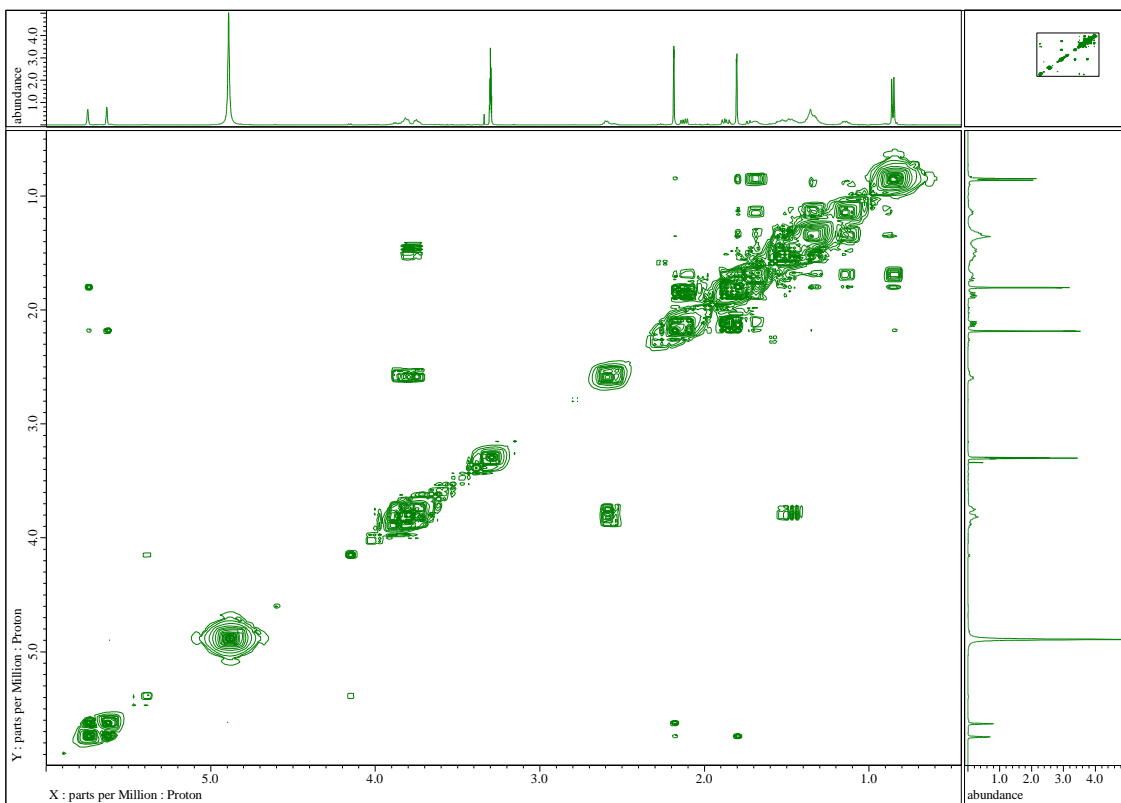


Fig. 2-18 1233A の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

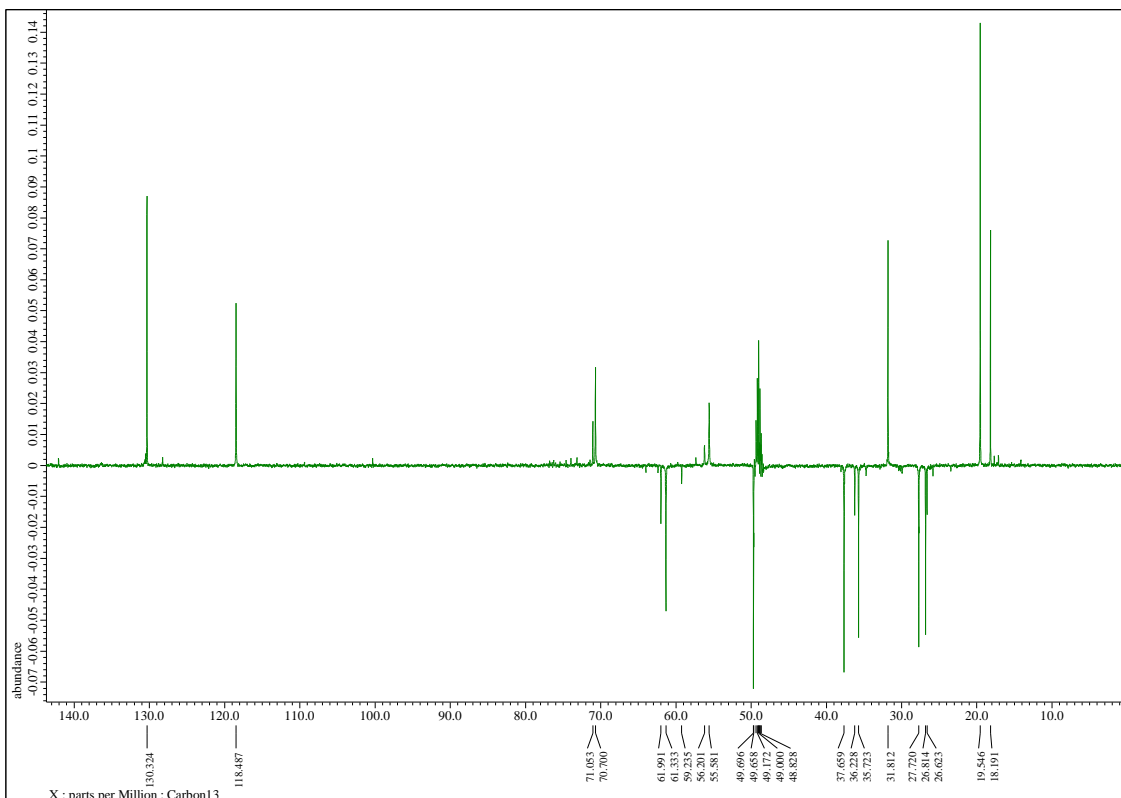


Fig. 2-19 1233A の DEPT

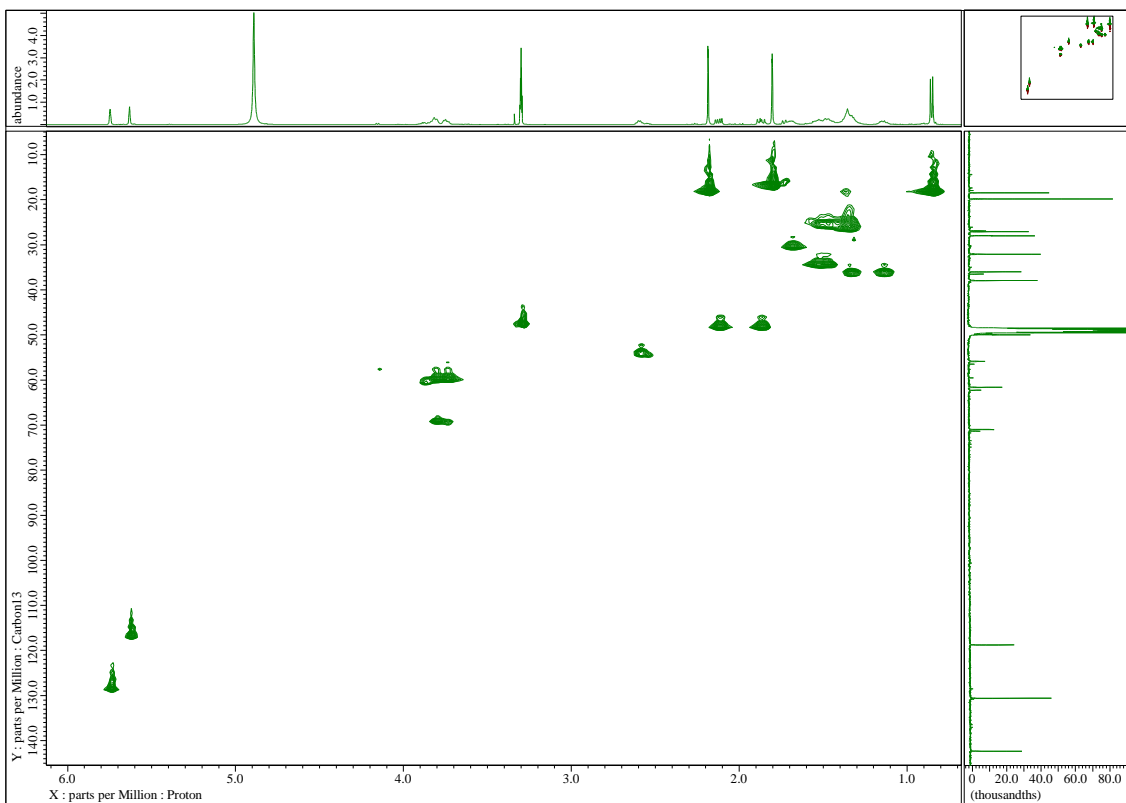


Fig. 2-20 1233A の HSQC

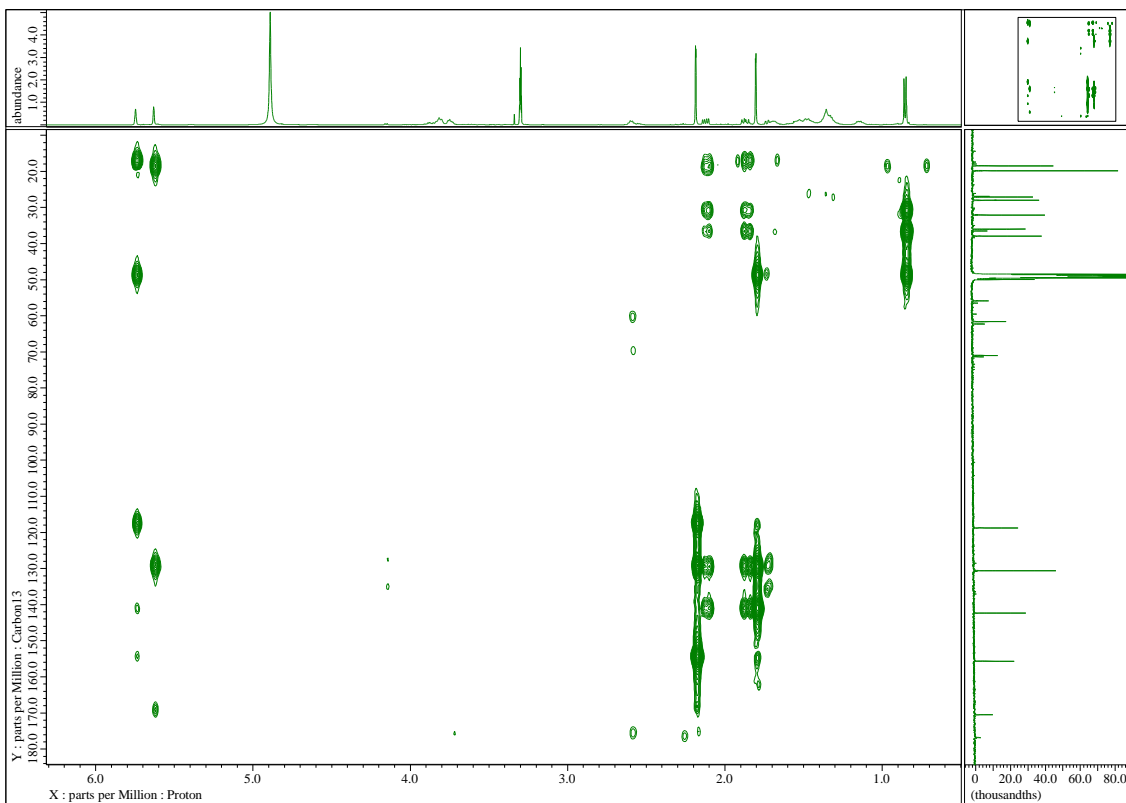


Fig. 2-21 1233A の HMBC

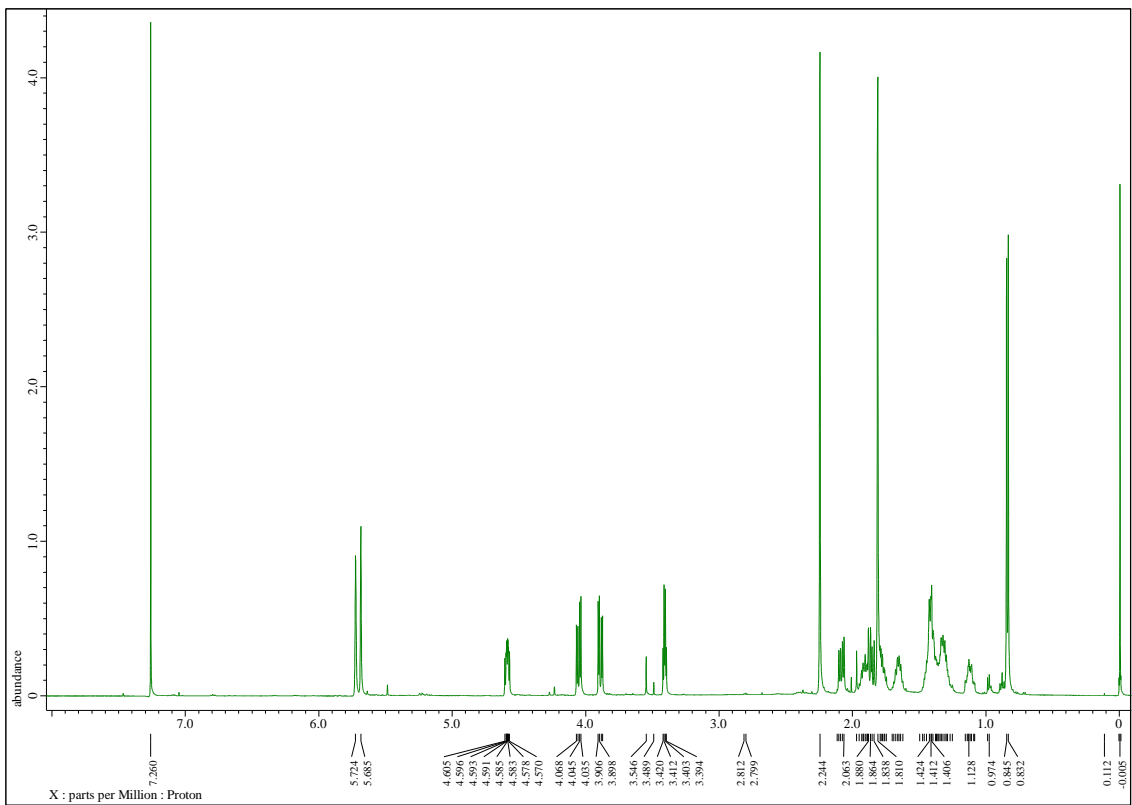


Fig. 2-22 1233B の <sup>1</sup>H NMR

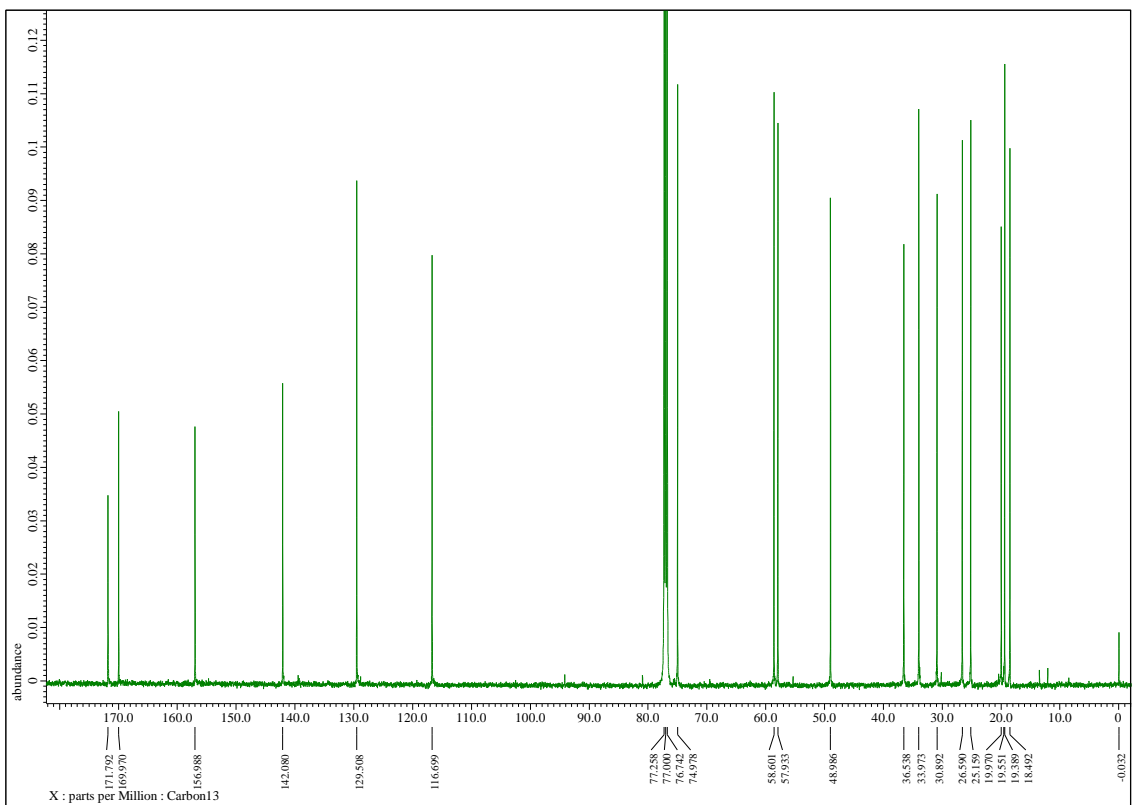


Fig. 2-23 1233B の <sup>13</sup>C NMR

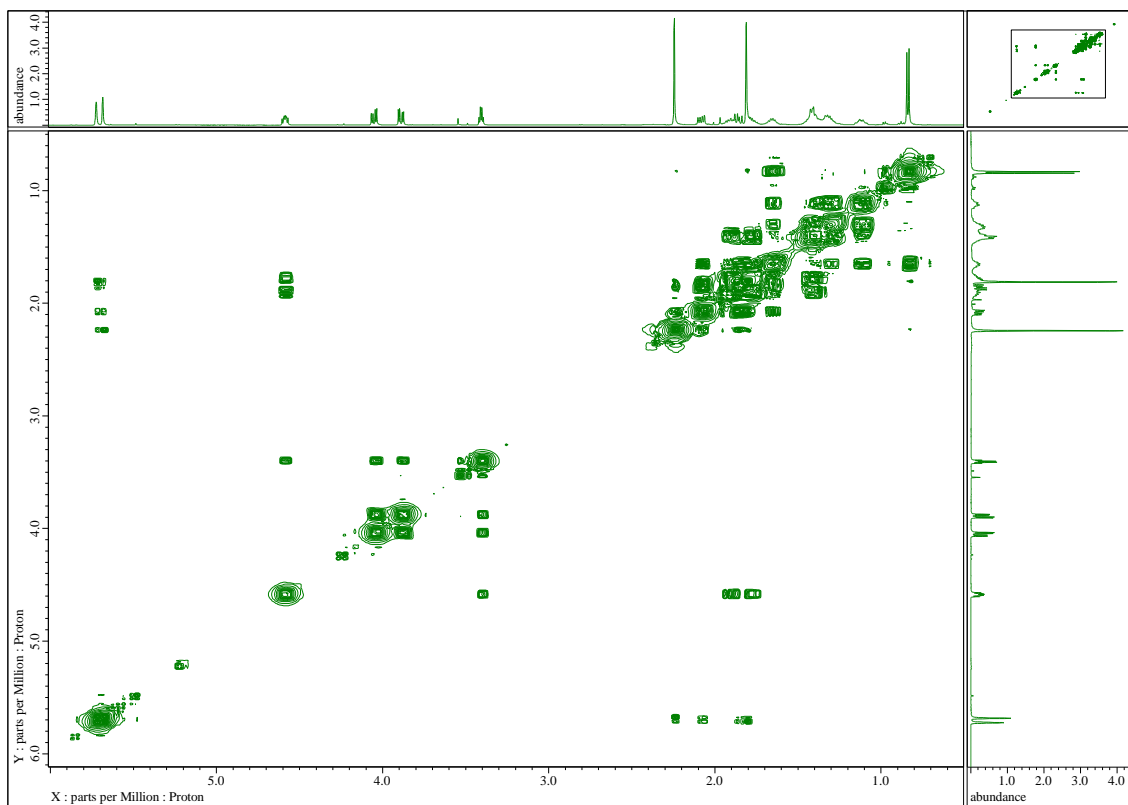


Fig. 2-24 1233B の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY

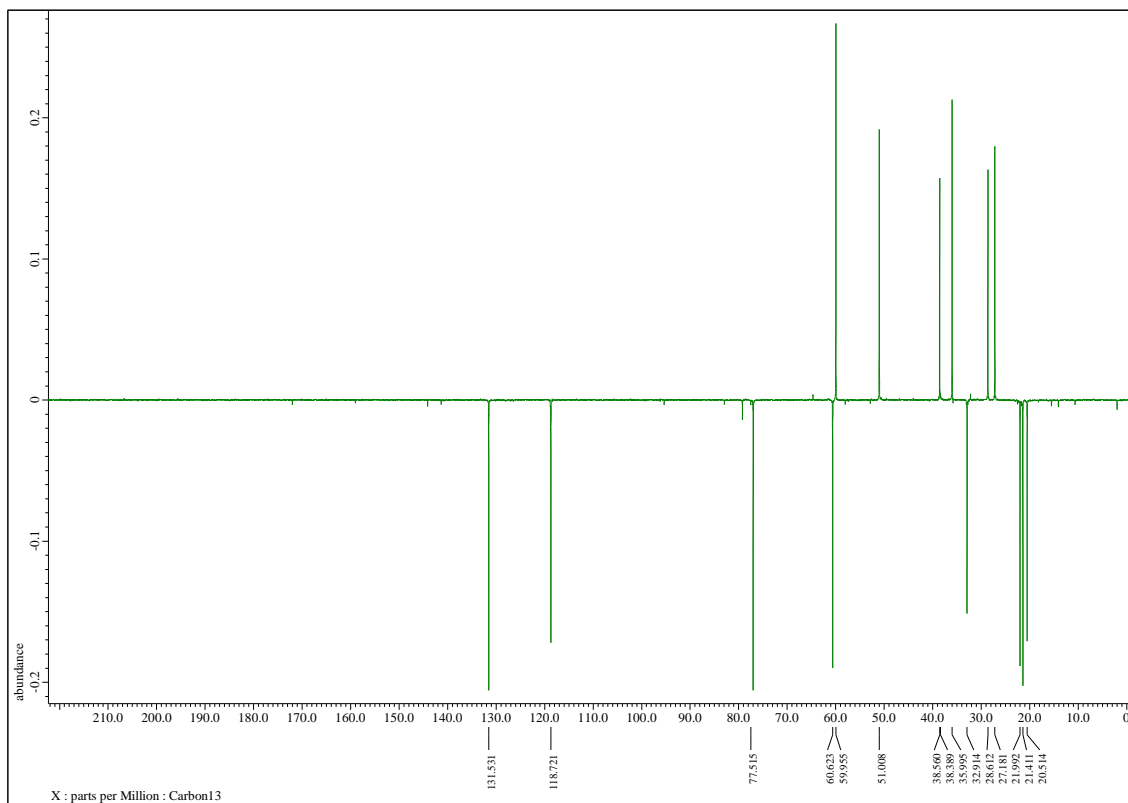


Fig. 2-25 1233B の DEPT

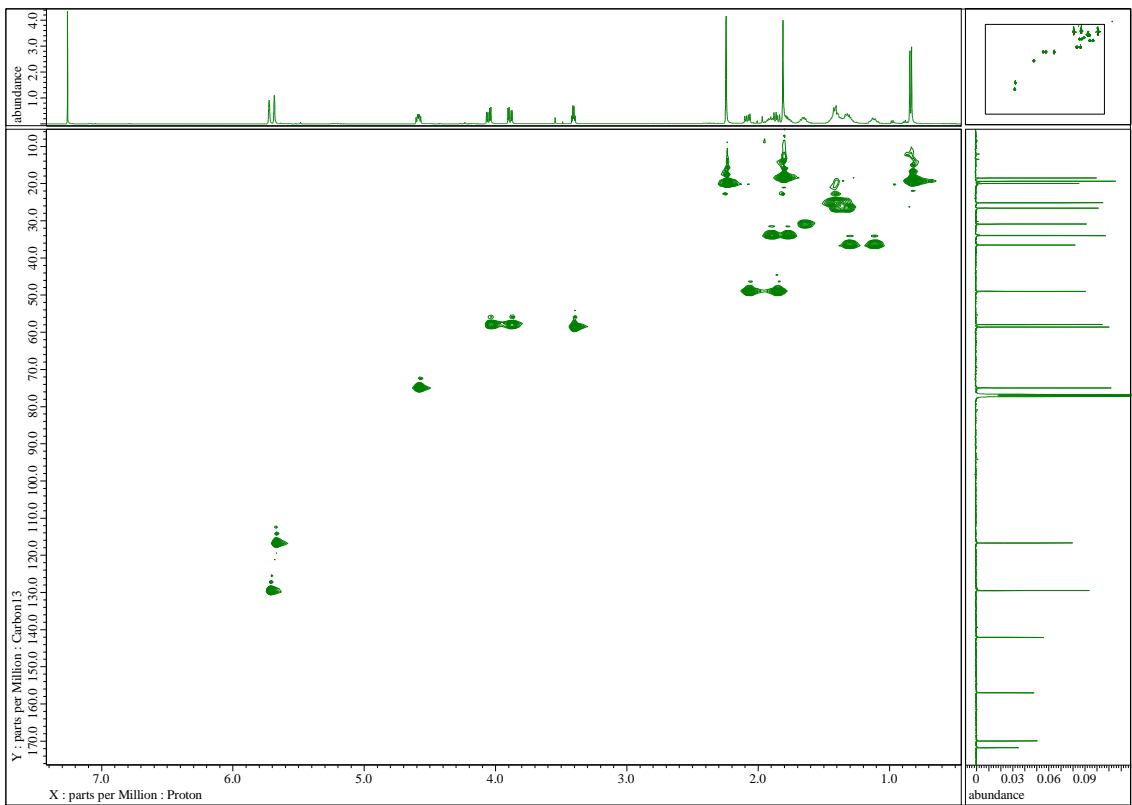


Fig. 2-26 1233B の HSQC

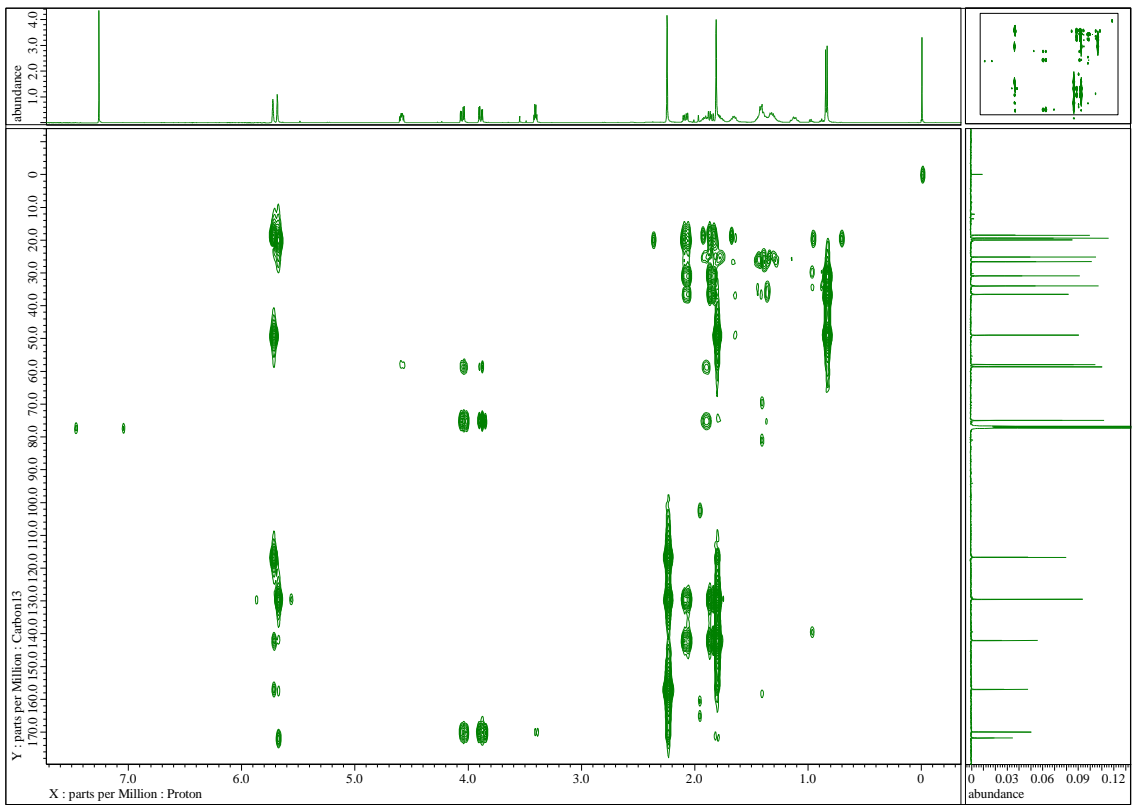
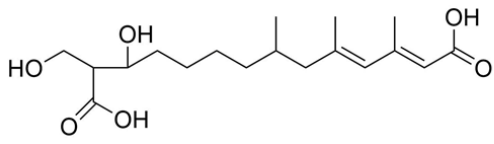
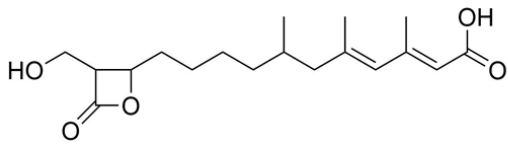
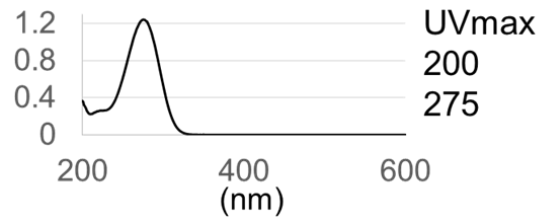


Fig. 2-27 1233B の HMBC



1233B (6)

[M-H]<sup>-</sup> :341.1963



1233A (7)

[M-H]<sup>-</sup> :323.1860

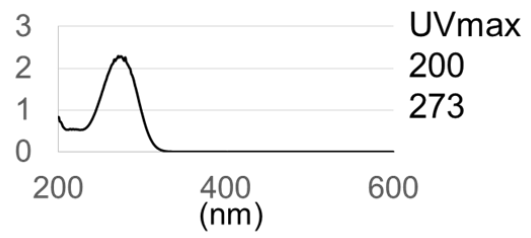


Fig. 2-28 1233A (7) と 1233B (6) の化学構造

## 2-7. Hygromycin B によって生産誘導される二次代謝産物の生理活性の解析

Hygromycin B によって生産誘導される fusarubin (5) は抗真菌活性を、1233A (7) はメバロン酸経路上流の HMG-CoA 合成酵素の阻害活性を有している<sup>30, 34</sup>。

生物活性評価により、lucilactaene (1) と NG-391 (2) は動物細胞とマラリア原虫 (Table 1-3)、fusarubin は動物細胞とグラム陽性細菌と真菌とマラリア原虫 (Table 2-2)、1233A は動物細胞とグラム陽性細菌とイネいもち病菌に対して増殖阻害活性があることを見出した (Table 2-3)。一方、1233B はどの生物に対しても増殖阻害活性を示さなかった (Table 2-3)。これらの結果から、放線菌が生産するタンパク質合成阻害剤 hygromycin B によって生産誘導される本菌の二次代謝産物はいくつかの微生物に対して生育阻害活性を示すことが明らかとなった。これは hygromycin B により本菌が生育阻害されると、防衛反応として二次代謝産物を生産するようになる可能性が考えられる。

Hygromycin B は *Streptomyces* 属が生産する二次代謝産物であり、タンパク質合成阻害剤である<sup>35</sup>。Hygromycin B を介した生育阻害によって二次代謝産物が防衛として誘導されるのであれば、生産誘導される代謝物は放線菌に対して生育阻害活性を有すると考えられる。放線菌に対する生物活性を評価するため、生産誘導された二次代謝産物を用いて二種の放線菌に対してペーパーディスクを用いた抗菌試験を行った (Fig. 2-29)。その結果、放線菌 2 種において fusarubin (5) を含むペーパーディスクの周辺に阻止円が形成されていることが確認された。1233A (7) は周辺に阻止円形成が認められず、増殖阻害活性を示さなかった。この結果から、fusarubin (5) が放線菌二種に対して生育阻害活性を示すことが明らかとなった。



生物種	名称	1233A	1233B
動物	HeLa	6.6	>30
動物	HL60	2.4	>30
グラム陽性細菌	<i>Staphylococcus aureus</i>	0.23	>30
グラム陰性細菌	<i>Escherichia coli</i>	>30	>30
糸状菌	<i>Aspergillus fumigatus</i>	>30	>30
糸状菌	<i>Pyricularia oryzae</i>	0.6	>30
糸状菌	<i>Candida albicans</i>	>30	>30
原虫	<i>Plasmodium falciparum</i>	>30	>30

IC<sub>50</sub> (μg/ml)

Table 2-3 1233A (7) と 1233B (6) の生物活性評価

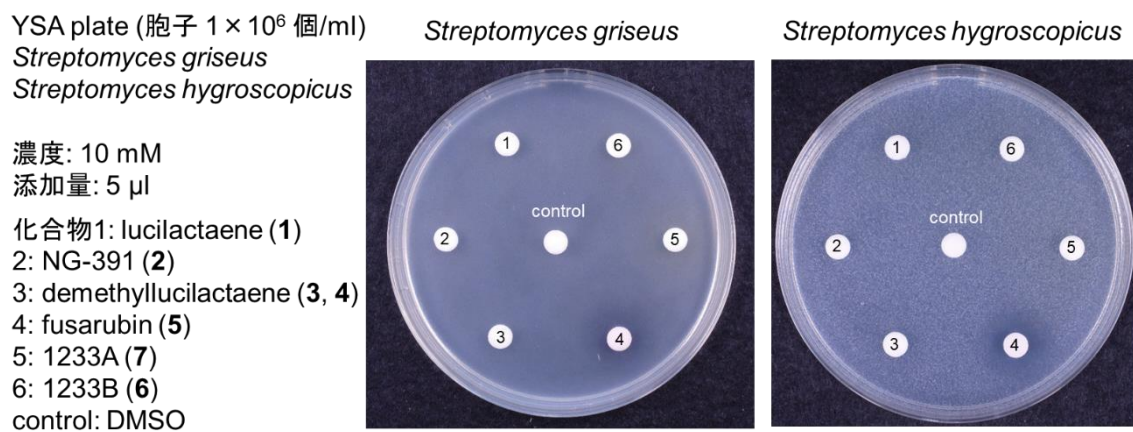


Fig. 2-29 *Streptomyces griseus* と *Streptomyces hygroscopicus* に対する hygromycin B により生産誘導される代謝物の抗菌試験

## 2-8. 考察

本章では hygromycin B 処理によって *Fusarium* sp. RK97-94 株の二次代謝産物 lucilactaene (1) と NG-391 (2) の生産性が上昇し、ならびに赤色色素 fusarubin (5) や HMG-CoA 合成酵素阻害剤 1233A (7) といった二次代謝産物の生産が誘導されることを明らかにした。誘導された二次代謝産物、lucilactaene (1)、NG-391 (2)、fusarubin (5)、1233A (7)、はいくつかの生物に対して生育阻害活性を示すことを明らかにした。

*Fusarium* sp. RK97-94 株が放線菌の生産するタンパク質合成阻害剤 hygromycin B を感知し、防衛手段として生理活性を有する二次代謝産物の生産を誘導する可能性が示唆された。

Fusarubin (5) のようなナフトキノロン類は ROS、UV、乾燥、菌食性の昆虫といった有害な周辺環境に対する保護剤であることが示唆されている<sup>36</sup>。*Aspergillus nidulans* においてもナフトキノロン類化合物を生産する株は昆虫に摂食されにくくなる<sup>37</sup>。同様に周辺環境に対し、二次代謝が誘導される例に melanin が挙げられる。*Cryptococcus neoformans* は貧栄養条件下において melanin が HOG 経路を介して生産誘導されることが報告されている<sup>38</sup>。

1233A は *Scopulariopsis candida* F-244 株が生産する二次代謝産物でありメバロン酸経路上流の HMG-CoA 合成酵素の阻害剤として報告されている。Fusarubin (5) と同様にタンパク質合成阻害剤による生産誘導の報告はない。メバロン酸経路は一次代謝経路であり、コレステロールを生合成する際の原料となるイソペンテニルニリン酸およびジメチルアリルニリン酸を生合成する経路である。メバロン酸経路を多くの生物種では共通して保有しているが、非メバロン酸経路を有する生物も存在している<sup>39</sup>。グラム陽性細菌である *S. aureus* はメバロン酸経路を持つため 1233A 存在下ではメバロン酸の生合成が抑制され、細胞分裂に必要な脂質を生合成することができなくなるため増殖が阻害される。一方で、メバロン酸経路を持たず非メバロン酸経路をもつ *E. coli* は 1233A 存在下でも増殖することができると考えられる。放線菌ではそのどちらの代謝経路を有しているため、1233A に対して活性を示さないことが考えられる。1233A の類縁体である 1233B は  $\beta$  ラクトン環が開環しカルボン酸となった類似構造体であり、活性を示さないという報告がある。1233A は HMG-CoA 合成酵素の基質ポケットとラクトン環が共有結合することで阻害する。そのため、その構造を持たないものは活性を示さない<sup>40</sup>。

Lucilactaene 生合成遺伝子クラスターは二次代謝のグローバルな制御因子 LaeA のオルソログである Lae1 によって制御されている。そのため、hygromycin B による二次代謝の活性化に Lae1 が関与している可能性が考えられる。*Fusarium* 属が生産する二次代謝産物の中に赤色色素 fusarubin (5) が報告されており、硝酸ナトリウムを最終濃度 6 mM の培地や pH 6 以上の培養条件下で生産されるようになる<sup>41</sup>。Fusarubin 生合成遺伝子クラスター中にある Cys6 型転写因子をコードする遺伝子が、クラスター中の生合成遺伝子の発現を正に制御している報告がある。しかし、これらを生産誘導する条件に hygromycin B

が関与するといった報告はない。詳細な解析は二次代謝制御に関わる制御因子とクロマチンの状態などを調べる必要があると考えられる。

タンパク質合成阻害剤によってタンパク質の生合成が停止すると、未熟なタンパク質の産生が生じ小胞体ストレスが生じる。真核生物のタンパク質合成に関するストレス応答は **Unfolded Protein Response (UPR)** が知られている。UPR は酵母に対し小胞体ストレスを与えた際の細胞内分子の挙動である<sup>42</sup>。しかし、こういった現象と二次代謝の関係性は明らかになっておらず、今回の現象が UPR と結びつける一つの懸け橋になると考えられる。

## 第三章 生産誘導される化合物の生合成遺伝子クラスターの解析

### 3-1. 研究の背景と目的

糸状菌は penicillin などの医薬品からカビ毒である aflatoxin や fusarin C などを生産する微生物である。現在までに多くの二次代謝産物が発見され、興味深い生物活性を示すことから探索が行われてきた。近年のドラフトゲノム解読により、一つの菌が予想以上に多くの二次代謝産物を生産するのに必要な遺伝子を有していることが明らかとなった。二次代謝産物生合成遺伝子の研究により、遺伝子クラスター全体の発現を制御する経路特異的転写因子や、グローバルな制御因子が見出されてきた。しかし、生産物が明らかになっていない二次代謝産物生合成遺伝子クラスターは多く残されている。代表的なモデル糸状菌 *Aspergillus nidulans* においても、約三割程度明らかになっているだけである<sup>1</sup>。未利用の二次代謝遺伝子を活性化させる方法が明らかになれば、新たな二次代謝産物の発見が期待できる。更に、二次代謝生合成遺伝子の制御機構の解明や新たな生合成メカニズムの発見に至ることが期待される。そこで本章では hygromycin B によって生産誘導される二次代謝産物の生合成遺伝子クラスターの同定を目的とした。

### 3-2. RNA-seq を用いた hygromycin B 処理による二次代謝産物生合成遺伝子群の変動の解析

Hygromycin B 処理による二次代謝産物の誘導が転写レベルで起きているか明らかにするために、RNA-seq 解析を行った。FDY 液体培地で hygromycin B 100 µg/ml で処理したサンプルと未処理のサンプルの菌体から RNA を抽出し、全遺伝子の発現量を次世代シーケンサーを用いて解析し、未処理と処理の遺伝子の発現量を比較した (Table. 3-1)。

Ratio では未処理に比べ、ハイグロマシン B 処理により何倍になったかを示した。42 個の二次代謝産物生合成鍵遺伝子の発現量が未処理に比べ二倍以上となったものは 7 遺伝子だった。これらの二次代謝産物生合成鍵遺伝子を解析した結果、*g2144* は lucilactaene 生合成に関与する遺伝子であり、*g12887* は fusarubin の生合成に関与する遺伝子であることが明らかとなった。Hygromycin B 処理によって、これらの遺伝子の発現量は *g2144* では 4 倍、*g12887* では 400 倍以上になった。これらの結果から、hygromycin B が二次代謝産物生合成遺伝子を転写レベルで誘導していることが示唆された。

Gene name	Gene cluster No.	Ratio	Annotation
<i>g433</i>	3	1597.56	unknown
<i>g12887</i>	34	452.94	Fusarubin
<i>g9734</i>	24	155.54	unknown
<i>g10727</i>	26	6.49	unknown
<i>g13107</i>	36	4.26	unknown
<i>g2144</i>	7	4.17	Lucilactaene
<i>g11359</i>	28	2.54	unknown

Table 3-1 Hygromycin B 処理により発現誘導された二次代謝産物生合成遺伝子クラスター中の基本骨格生合成に関する遺伝子

### 3-3. Fusarubin 生合成遺伝子クラスターの解析

本菌ゲノム中の二次代謝生合成遺伝子クラスターを探索した結果、*g12887* の近傍に fusarubin 生合成に関与すると期待される生合成遺伝子が確認された。これらの遺伝子の機能を解析するため、*Fusarium fujikuroi* において fusarubin の生合成に必須な遺伝子、*fsr1* (polyketide synthase)、*fsr2* (O-methyltransferase)、*fsr3* (monooxygenase) との相同性を比較した (Table 3-2~4)。本菌の推定 fusarubin 生合成遺伝子クラスターとのアミノ酸配列レベルでの同一性は *fsr1* と *g12887* は 75.76%、*fsr2* と *g12888* は 74.54%、*fsr3* と *g12889* は 81.47% を示した。Fusarubin 生合成遺伝子クラスターと *g12887* 周辺の遺伝子群 (クラスターNo. 34) を比較したところ、類似性が高いことが明らかになった<sup>41</sup> (Fig. 3-1)。これらの結果より、遺伝子クラスターNo. 34 が fusarubin 生合成遺伝子クラスターであることが示唆された。

遺伝子クラスターNo. 34 が fusarubin の生合成遺伝子クラスターであるか確かめるために、生合成鍵遺伝子 (*g12887*) の破壊を行った。ゲノム DNA から上流領域と下流領域を 2 kbp ずつ、pCSN45 から *hph*、pBI121 からベクター配列を PCR により増幅し必要な断片を得た。得られた PCR 産物を In-Fusion 処理し  $p\Delta g12887$  を得た。 $p\Delta g12887$  でアグロバクテリウムを形質転換した。得られたアグロバクテリウムを用い ATMT 法により野生型株を形質転換して遺伝子破壊株を得た (Fig. 3-2)。得られた遺伝子破壊株に対し hygromycin B を添加した培地で培養し fusarubin の生産が生産されるかどうか検討した。その結果、 $\Delta g12887$  株では fusarubin の生産は確認されなかった。また、fusarubin 生産による菌体の黒色化も確認されなかった (Fig. 3-3)。これらの結果から、*g12887* が fusarubin の生合成を担う PKS 遺伝子であり、fusarubin の生合成遺伝子であることが明らかとなった。

Description	E-value	Identity	Accession
hypothetical protein ( <i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4)	0	96.6	XM_003039883.1
putative polyketide synthase (Feu_2145) ( <i>Fusarium euwallaceae</i> strain ATTC 74349)	0	95.74	KU179972.1
putative polyketide synthase (Fba_103) ( <i>Fusarium babinda</i> strain NRRL 25539 )	0	77.44	KU179907.1
putative polyketide synthase (Fpo_270) ( <i>Fusarium poae</i> strain NRRL 26941)	0	76.99	KU180027.1
putative polyketide synthase (Fay_455) ( <i>Fusarium aywerte</i> strain NRRL 25410)	0	76.57	KU179899.1
PKS3 (PKS3) ( <i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096)	0	76.58	XM_009256565.1
uncharacterized protein (FVRRES_13609) ( <i>Fusarium venenatum</i> )	0	76.77	XM_025728995.1
putative polyketide synthase (Fbu_1966) ( <i>Fusarium bulbicola</i> strain NRRL 13618)	0	75.98	KU179927.1
putative polyketide synthase (Fpr_03560) ( <i>Fusarium proliferatum</i> strain NRRL 62905)	0	76	KU180040.1
putative polyketide synthase (Fmi_69) ( <i>Fusarium miscanthi</i> strain NRRL 26231)	0	75.87	KU180022.1
putative polyketide synthase (Fsub_00583) ( <i>Fusarium subglutinans</i> strain NSM 107)	0	75.89	KU180140.1
putative polyketide synthase (Fsc_300) ( <i>Fusarium scirpi</i> strain NRRL 06979)	0	76.13	KU180099.1
putative polyketide synthase (Fsp2_41) ( <i>Fusarium</i> sp. NRRL 25184)	0	75.21	KU180114.1
fusarubin cluster-polyketide synthase (fsr1) ( <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289)	0	75.76	XM_023572783.1
putative polyketide synthase (Fco_3784) ( <i>Fusarium commune</i> strain NRRL 28387)	0	75.25	KU179946.1
putative polyketide synthase (Fsuc_09020) ( <i>Fusarium succisae</i> strain NRRL 13298)	0	75.63	KU180159.1
putative polyketide synthase (Fth_01180) ( <i>Fusarium thapsinum</i> strain FRC M-6563)	0	75.32	KU180173.1
putative polyketide synthase (Fdl_07084) ( <i>Fusarium dlamirii</i> strain NRRL 13164)	0	75.72	KU179958.1
putative polyketide synthase (Fan_415) ( <i>Fusarium anthophilum</i> strain NRRL 25214)	0	75.11	KU179879.1
putative polyketide synthase (Fsa_05487) ( <i>Fusarium sacchari</i> strain FRC M-6865 )	0	75.22	KU180079.1

Table 3-2 g12887 (PKS) の BLAST による相同性検索



Description	E-value	Identity	Accession
hypothetical protein ( <i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4)	0	94.33	XM_003039696.1
uncharacterized protein (FOYG_04282) ( <i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 32931)	0	75.86	XM_031178196.1
uncharacterized protein (FOIG_06317) ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense tropical race 4 54006 )	0	75.86	XM_031205363.1
hypothetical protein (FVEG_03696) ( <i>Fusarium verticillioides</i> 7600)	0	75.07	XM_018891317.1
hypothetical protein (FVEG_03696) ( <i>Fusarium verticillioides</i> 7600)	0	75.07	XM_018891316.1
hypothetical protein (FVEG_03696) ( <i>Fusarium verticillioides</i> 7600)	0	75.07	XM_018891315.1
hypothetical protein (FVEG_03696) ( <i>Fusarium verticillioides</i> 7600)	0	75.07	XM_018891314.1
hypothetical protein (FVEG_03696) ( <i>Fusarium verticillioides</i> 7600)	0	75.07	XM_018891313.1
fusarubin cluster-methyltransferase ( <i>fsr2</i> ) ( <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289 )	0	74.54	XM_023572782.1
fusarubin cluster-methyltransferase (FPRO_03538) ( <i>Fusarium proliferatum</i> ET1)	0	74.54	XM_031226238.1
draft genome, chromosome FFUJ_chr02 ( <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289)	0	71.76	HF679024.1
fusarubin biosynthesis gene cluster ( <i>Fusarium fujikuroi</i> strain IMI58289)	0	71.76	HE613440.1
uncharacterized protein (FIESC28_11726) ( <i>Fusarium coffeatum</i> )	0	70.66	XM_031165841.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096)	0	69.9	XM_009256566.1
uncharacterized protein (FVRRES_13608) ( <i>Fusarium venenatum</i> )	0	68.37	XM_025728994.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium graminearum</i> PH-1)	0	70.75	XM_011330294.1
hypothetical protein ( <i>Bipolaris victoriae</i> FI3)	0	67.26	XM_014703244.1
hypothetical protein ( <i>Bipolaris oryzae</i> ATCC 44560)	1.00E-180	67.26	XM_007690349.1
hypothetical protein ( <i>Bipolaris sorokiniana</i> ND90Pr)	3.00E-180	67.26	XM_007697822.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici 4287)	2.00E-167	74.92	XM_018384255.1
<i>Fusarium culmorum</i> genome assembly, chromosome: IV	5.00E-157	68.75	LT598662.1
<i>Fusarium graminearum</i> chromosome 4, complete genome	2.00E-154	71.59	LT598662.1
<i>Leptosphaeria biglobosa brassicae</i> b35_scaffold00010 complete sequence	3.00E-136	67.31	HG970335.2
<i>Leptosphaeria biglobosa Thlaspii</i> ibcn65_scaffold00017 complete sequence	2.00E-135	68.09	HG970335.2
hypothetical protein (CORC01_09709) ( <i>Colletotrichum orchidophilum</i> )	1.00E-127	63.29	FO905654.1+A8: D26A4:D26A2:D26 A26A12:A1:D26

Table 3-3 g12888 (*O*-methyltransferase) の BLAST による同源性検索

Description	E-Value	Ident	Accession
predicted protein, mRNA ( <i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4)	0	94.41	XM_003039884.1
uncharacterized protein (FIESC28_11727) ( <i>Fusarium coffeatum</i> )	0	80.45	XM_031165842.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. cubense tropical race 4 54006)	0	83.66	XM_031205362.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici 4287)	0	81.87	XM_018384256.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium verticillioides</i> 7600 )	0	81.36	XM_018891318.1
uncharacterized protein ( <i>Fusarium oxysporum</i> NRRL 32931)	0	81.32	XM_031178197.1
fusarubin cluster-monoxygenase ( <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289)	0	81.47	XM_023572781.1
uncharacterized protein (FVRRES_13606) ( <i>Fusarium venenatum</i> )	0	79.52	XM_025728992.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096)	0	80.08	XM_009256567.1
hypothetical protein ( <i>Fusarium graminearum</i> PH-1)	0	75.05	XM_011330293.1
hypothetical protein ( <i>Pseudogymnoascus verrucosus</i> )	0	75.76	XM_018270840.1
monoxygenase (VFPPC_06848) ( <i>Pochonia chlamydosporia</i> 170)	0	73.00	XM_018285816.1
chromosome 4, complete genome ( <i>Fusarium graminearum</i> )	0	73.17	HG970335.2
genome assembly, chromosome: IV ( <i>Fusarium culmorum</i> )	0	84.88	LT598662.1
fusarubin cluster-monoxygenase ( <i>Fusarium proliferatum</i> ET1)	0	52.88	XM_031226240.1
maackiain detoxification protein ( <i>Ramularia collo-cygni</i> )	0	78.84	XM_023766761.1
chromosome II ( <i>Fusarium fujikuroi</i> strain I1.3)	0	78.84	CP023102.1
chromosome II ( <i>Fusarium fujikuroi</i> strain Augusto2)	0	78.84	CP023090.1
chromosome II ( <i>Fusarium fujikuroi</i> strain CSV1)	0	78.84	CP023078.1
draft genome, chromosome FFUJ_chr02 ( <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289)	0	78.84	HF679024.1

Table 3-4 g12889 (monoxygenase) の BLAST による相同性検索

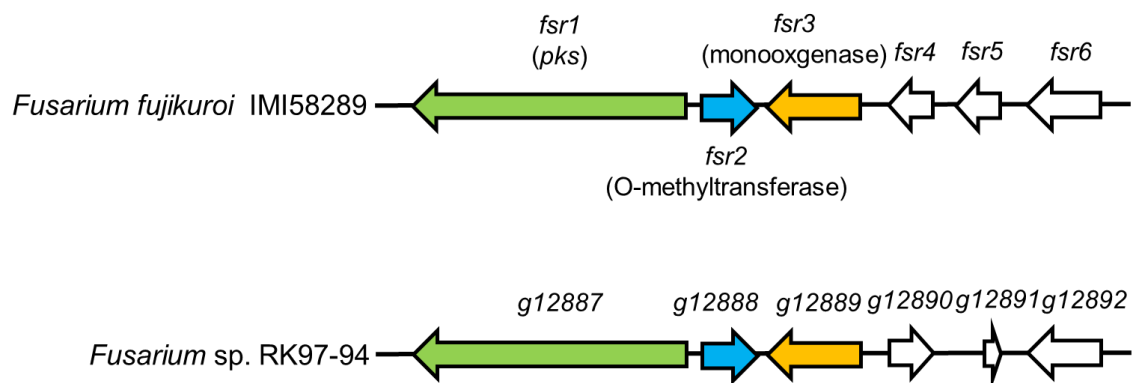


Fig. 3-1 fusarubin 生合成遺伝子クラスターの比較図

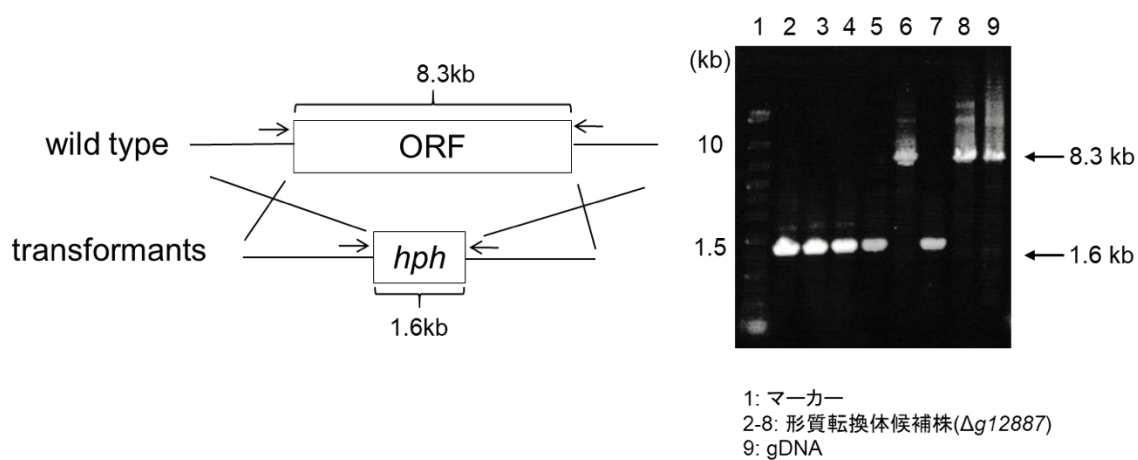


Fig. 3-2 *g12887* の遺伝子破壊

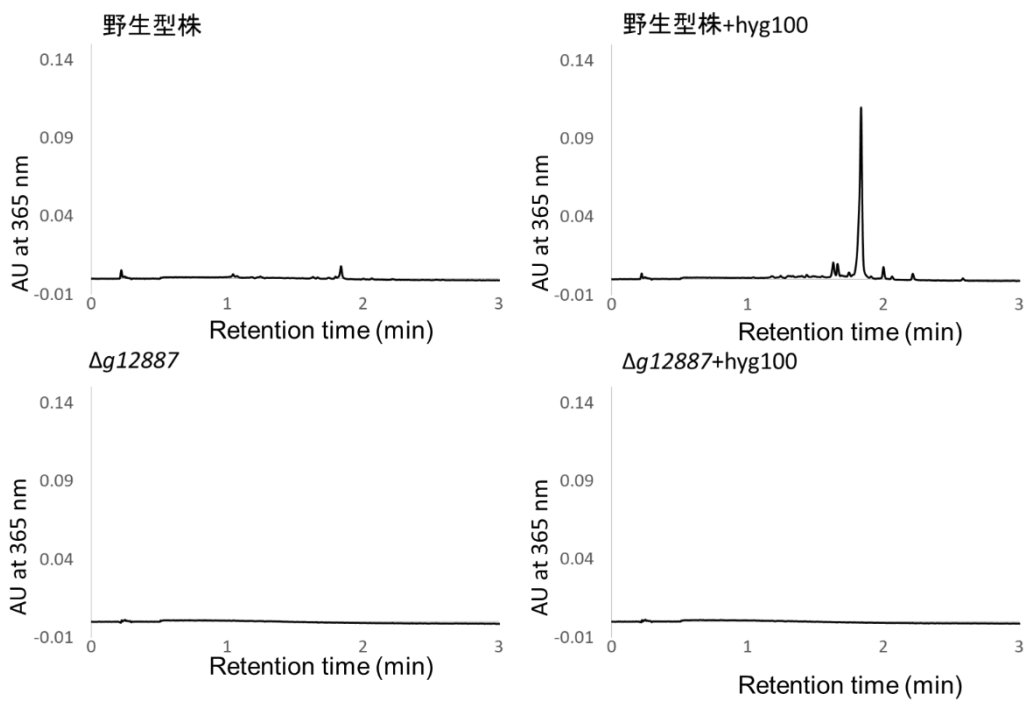
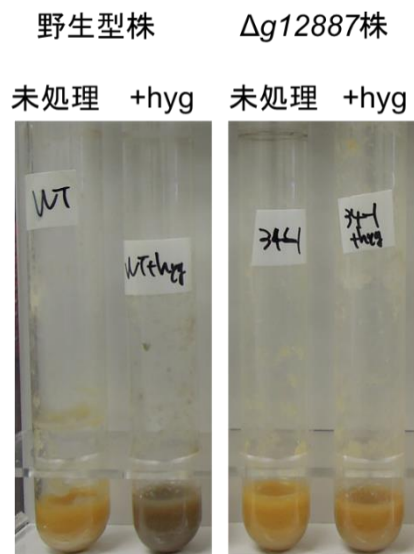


Fig. 3-3  $\Delta g12887$ 株における fusarubin (5) の生産誘導の解析

### 3-4. 1233A 生合成遺伝子クラスターの同定

1233A の生合成遺伝子クラスターは発見の報告がない為、RNA-seq 解析データに基づいて生合成遺伝子クラスターの探索を行った。Hygromycin B 処理により発現が上昇した二次代謝生合成遺伝子クラスターNo.3 には、生合成に必要と考えられる酸化酵素の遺伝子も存在していた。クラスター内の遺伝子の機能解析のために、g430, g431, g432, g433 の BLAST サーチによる相同性検索と Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) によるタンパク質機能ドメイン検索を行った。その結果、g430 は P450、g431 は HMG-CoA 合成酵素、g432 は Myb 型転写因子、g433 は PKS と機能予測された (Table 3-5)。この結果から 1233A のターゲットとなる推定 HMG-CoA 合成酵素遺伝子が PKS 遺伝子近傍に存在していることが明らかとなった (Fig. 3-4)。二次代謝遺伝子クラスター中にターゲットとなる酵素の遺伝子が存在している場合、自己耐性化に寄与している報告がある<sup>43</sup>。これらのことから No.3 を 1233A の生合成遺伝子クラスターと推定した。

次に PKS と機能予測されていた g433 のドメイン構造について解析した。1233A は放射性標識した基質の取り込み実験により、生合成メカニズムが解析されていた<sup>32</sup>。KS、AT、DH、ER、KR によって主鎖が生合成され、側鎖のメチル基は cMT (メチル基転移ドメイン) によって付加されることが示唆されていた (Fig. 3-5)。g433 の機能予測を行うべく相同性検索した結果、PKS として相同性を示すものが得られたが、生産物が特定されているものはなかった (Table 3-6)。g433 のドメイン構造を予測した結果、生合成に必要なドメインを有していることが示唆された (Fig. 3-6)。

1233A 生合成遺伝子クラスターを同定するため、遺伝子発現の解析と遺伝子破壊株の代謝物解析に取り組んだ。RNA-seq 解析データから遺伝子クラスターNo.3 の PKS 遺伝子近傍の遺伝子の発現量を、hygromycin B 未処理と処理のサンプルで比較した (Fig. 3-7)。その結果、g430-g434 までが hygromycin B により遺伝子発現が上昇していた。また、g431 は hygromycin B 未処理においても発現していることが明らかとなった。g434 はトランスポーターとして機能予測されており、生産物の細胞外排出を担っていることが考えられる。

次に、各遺伝子破壊株を作製し (Fig. 3-8)、24 well プレートを使用し hygromycin B を添加した FDY 液体培地で培養し、代謝物を分析した。その結果、 $\Delta g433$  株では 1233A、1233B のどちらの生産も確認されなかった (Fig. 3-9)。この結果から g433 は 1233A 生合成遺伝子であることが明らかとなった。 $\Delta g430$  株と  $\Delta g432$  株では 6, 7 の生産が見られなかったことから、g430 と g432 は生合成に必須な遺伝子であることが示唆された。

これらの結果より、1233A の生合成経路を推定した (Fig. 3-10)。g433 により基本骨格が生合成される。更に g430 (P450) により酸化され 1233A が生合成される。

Gene	Predicted protein size (aa)	Highest homology protein (organism)	E-value	Annotation
<i>g430</i>	571	RMJ16758.1 <i>Fusarium kuroshium</i>	0.0	P450
<i>g431</i>	456	RTE84761.1 <i>Fusarium euwallaceae</i>	0.0	HMG-CoA synthase
<i>g432</i>	382	PVH92256.1 <i>Periconia macrospinosa</i>	4e-55	Myb transcriptional factor
<i>g433</i>	2510	RAL64241.1 <i>Monilinia fructigena</i>	0.0	Polyketide synthase

Table 3-5 *g430*, *g431*, *g432*, *g433* の相同性検索と遺伝子機能予測

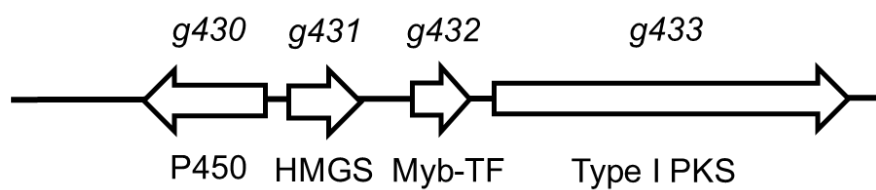


Fig. 3-4 二次代謝生合成遺伝子クラスターNo. 3 の構成遺伝子

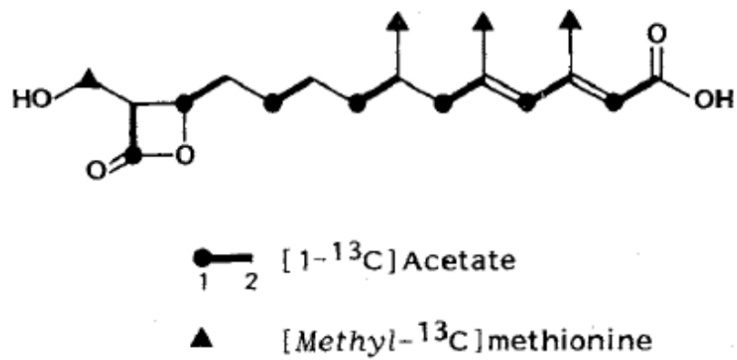


Fig. 3-5 1233A の放射性基質取り込み実験



Fig. 3-6 g433 (PKS) のドメイン構造予測

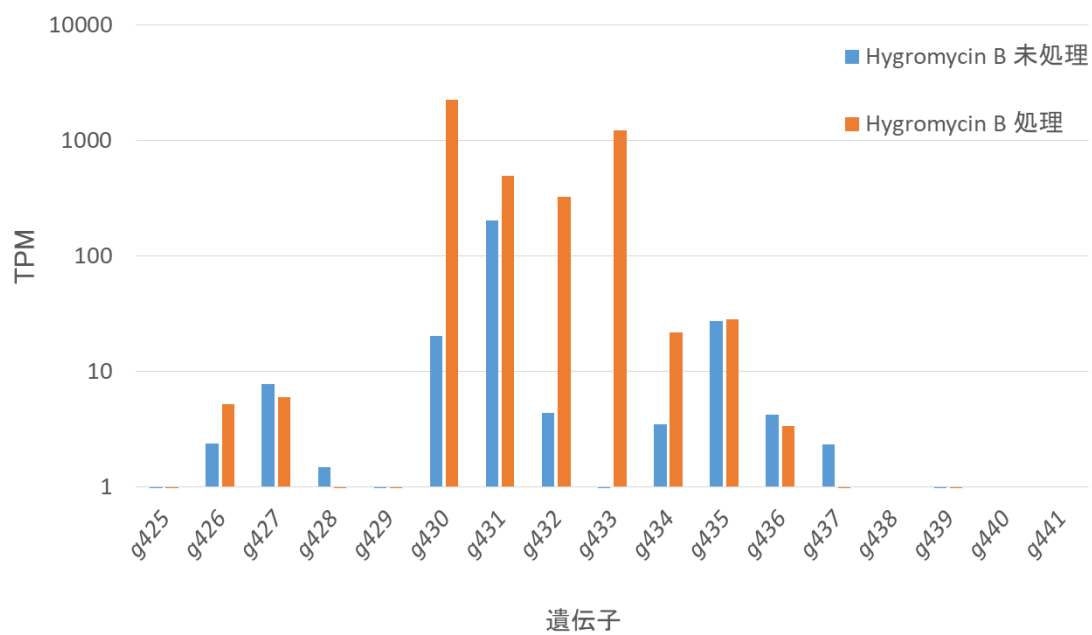


Fig. 3-7 推定 1233A 生合成遺伝子クラスター近傍遺伝子の発現量比較



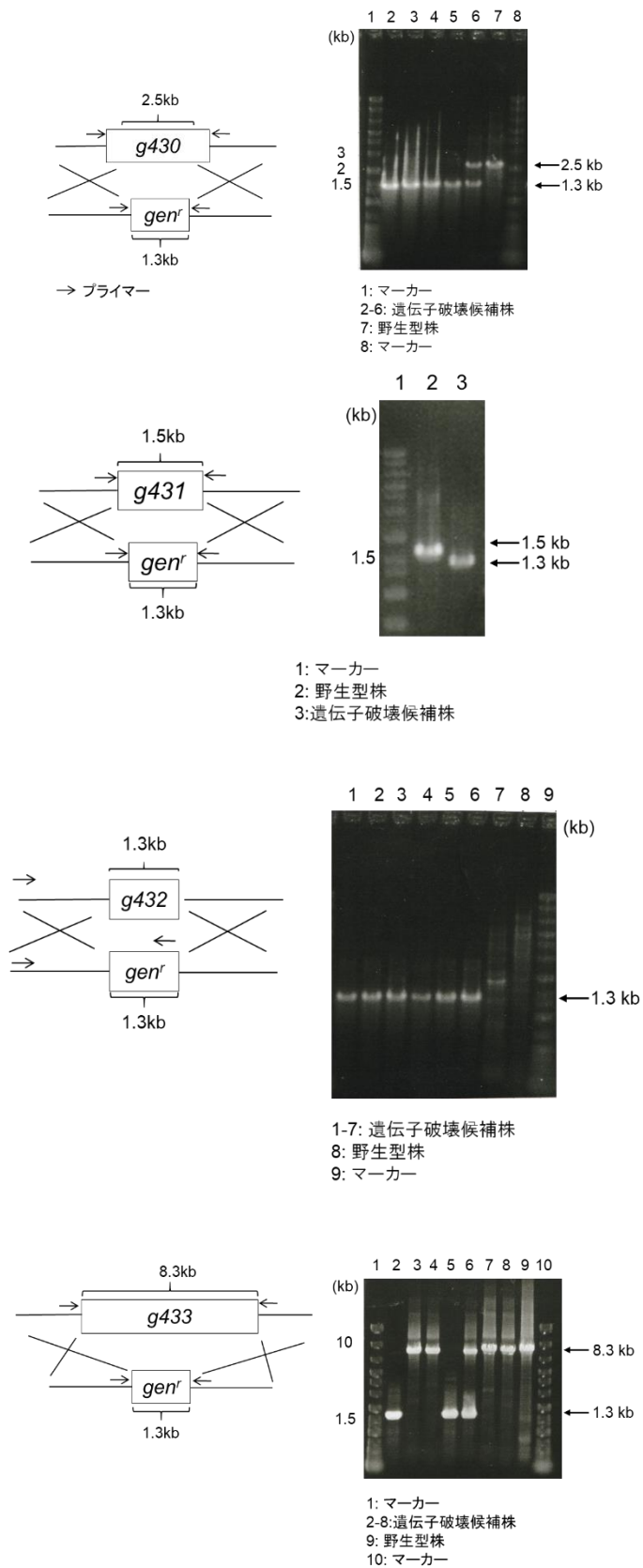


Fig. 3-8 *g430*, *g431*, *g432* の遺伝子破壊株作成図

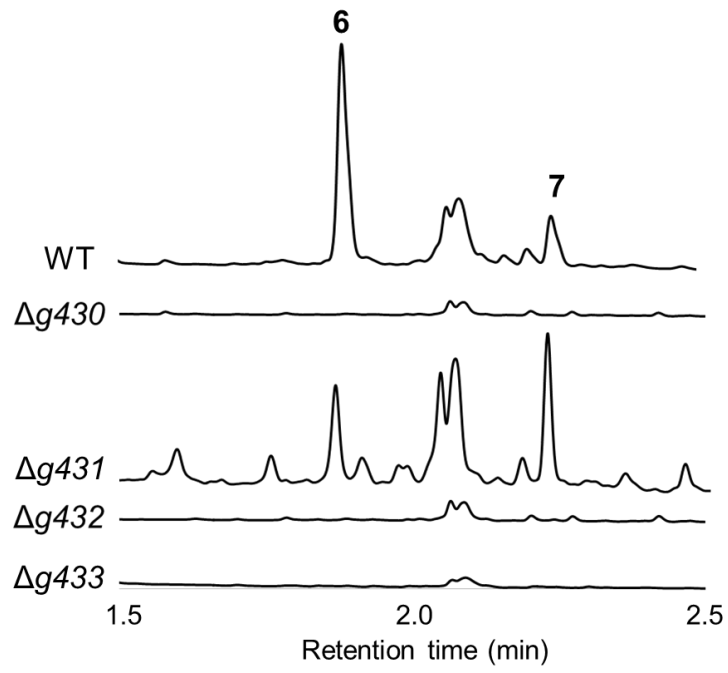


Fig. 3-9 各 1233A 生合成遺伝子破壊株の代謝物分析

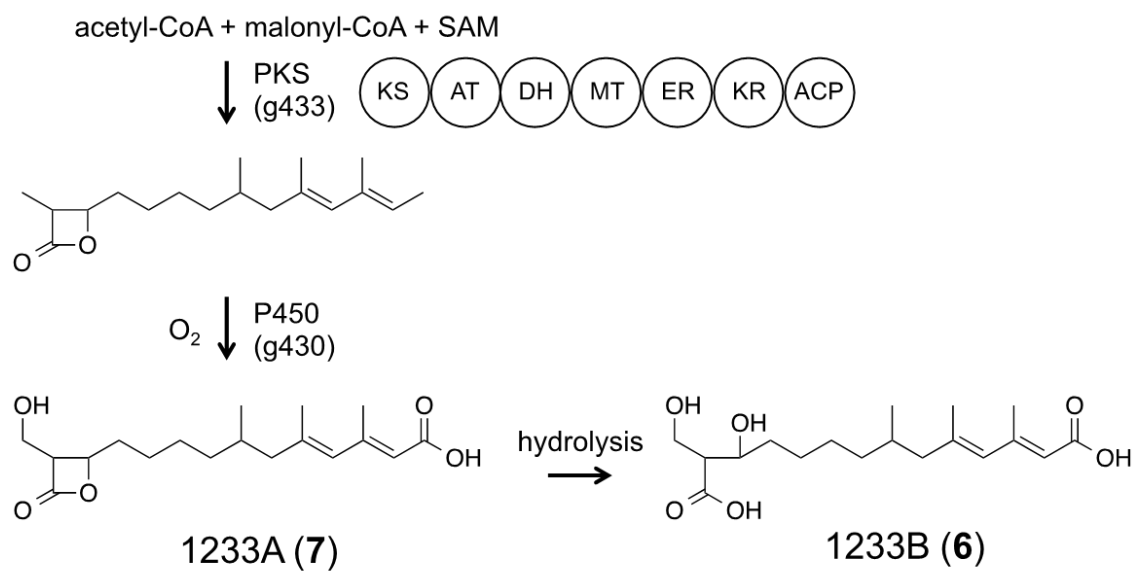


Fig. 3-10 推定 1233A 生合成経路

Description	E- Value	Identity(%)	Accession
hypothetical protein DID88_002133 [ <i>Monilinia fructigena</i> ]	0.0	68.38	RAL64241.1
polyketide synthase [ <i>Cenococcum geophilum</i> 1.58]	0.0	52.88	OCK87084.1
Highly reducing polyketide synthase [ <i>Lachnellula willkommii</i> ]	0.0	51.98	TVY93974.1
Highly reducing polyketide synthase [ <i>Lachnellula hyalina</i> ]	0.0	52.25	XP_031006041.1
Highly reducing polyketide synthase [ <i>Lachnellula subtilissima</i> ]	0.0	52.01	TVY37615.1
Putative polyketide synthase [ <i>Podospora anserina</i> S mat+]	0.0	53.75	CDP29160.1
Highly reducing polyketide synthase FUM1 [ <i>Lachnellula suecica</i> ]	0.0	51.68	TVY80960.1
Putative polyketide synthase [ <i>Podospora comata</i> ]	0.0	53.82	VBB80905.1
Thiolase-like protein [ <i>Glarea lozoyensis</i> ATCC 20868]	0.0	52.03	XP_008082817.1
Highly reducing polyketide synthase FUM1 [ <i>Lachnellula arida</i> ]	0.0	51.22	TVY20219.1
hypothetical protein ATETN484_0006036900 [ <i>Aspergillus terreus</i> ]	0.0	50.87	GES61710.1
putative type I PKS [ <i>Cladonia uncialis</i> subsp. <i>uncialis</i> ]	0.0	50.87	ANM86582.1
hypothetical protein M434DRAFT_70407 [ <i>Hypoxylon</i> sp. CO27-5]	0.0	50.73	OTA94899.1
fatty acid synthase S-acetyltransferase [ <i>Paraphaeosphaeria sporulosa</i> ]	0.0	50.57	XP_018034048.1
hypothetical protein K449DRAFT_369872 [ <i>Hypoxylon</i> sp. EC38]	0.0	50.47	OTA62349.1
putative type I PKS [ <i>Cladonia uncialis</i> subsp. <i>uncialis</i> ]	0.0	49.8	ANM86496.1
putative polyketide synthase [ <i>Rosellinia necatrix</i> ]	0.0	50.26	GAP88125.1
hypothetical protein IQ06DRAFT_249262 [ <i>Stagonospora</i> sp. SRC1IsM3a]	0.0	49.4	OAL00504.1
hypothetical protein AJ80_09194 [ <i>Polytolypa hystricis</i> UAMH7299]	0.0	50.18	PGH00300.1
polyketide synthase [ <i>Corynespora cassiicola</i> Philippines] 1:21	0.0	49.38	PSN59509.1

Table 3-6 g433 (PKS) の BLAST サーチによる相同性検索の結果

### 3-5. HMG-CoA 合成酵素の解析

HMG-CoA 合成酵素遺伝子が二次代謝遺伝子クラスター中に存在している報告はない。そこで、*g431* の機能を解析することを目的とした。本菌はドラフトゲノムを解析済みであるため、HMG-CoA 合成酵素遺伝子がゲノム中に重複して存在しているのか探索した。その結果、*g431* と相同性のある遺伝子 *g6807* がゲノム中に存在していることが明らかとなった。アミノ酸配列の同一性は 52% であり、69% の類似性を示した。E-value は  $4e-176$  であった。HMG-CoA 合成酵素の活性に必須であるアミノ酸は 83Glu (E)、117Cys (C)、257His (H)、368Ser (S) であり、どちらの酵素にも保存されていることが判明した<sup>40</sup> (Fig. 3-11)。

次に、それぞれの遺伝子について機能解析するべく、*g431* と *g6807* に対し BLAST を用いて相同性検索を行った。*g6807* は 80% 以上の同一性を維持したまま高度に保存されており、HMG-CoA 合成酵素と機能予測された (Table 3-7)。一方、*g431* は高い同一性を維持しながらも *g6807* とは異なる生物種 (*Aspergillus ellipticus*, *Botrytis* 属) の酵素と類似性が高いことが明らかとなった (Table 3-8)。Hygromycin B 処理と未処理の菌体における、*g431* と *g6807* の発現を比較した。二つの遺伝子は共に hygromycin B 未処理の際に発現しており、生育に関与していることが示唆された (Fig. 3-12)。これらの結果より、HMG-CoA 合成酵素としてどちらも機能していることが示唆された。*g431* は自己耐性遺伝子である可能性が期待できるため、詳細な機能解析に取り組んだ。

*g431* が 1233A に対して耐性を有しているならば、遺伝子破壊株では 1233A に対する感受性が高くなると期待される。よって *g431* 破壊株を作製し (Fig. 3-13)、1233A を添加した培地における生育を観察した (Fig. 3-14)。その結果、破壊株では 1233A に対する感受性が高くなったことから、*g431* は 1233A に耐性を付与する遺伝子であることが示唆された。

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
489 bits(1260)	4e-176	Compositional matrix adjust.	236/453(52%)	314/453(69%)	6/453(1%)
Query 4	PQN+GIKA+EIY P Q ++QT EK GVSAGKYTIGLG M+FC DRED+ S ALTA				63
Sbjct 5	PQNIGIKAIEIYFPSQYVEQTELEKFDGVSAGKYTIGLGQTKMSFCDDREDIYSFALTAT				64
Query 64	SSLLRKFIDPKSIGRLE <sup>81</sup> VGTE <sup>119</sup> SPIDKAKSVKSVLTTLFEPHGNTSLEGIDTIHACYGGT				123
Sbjct 65	KNLLKYNVDPNSIGRLE <sup>81</sup> VGTE <sup>119</sup> TETLLDKSKSVKTVLMQLF--GDNTNIEGVDTINACYGGT				122
Query 124	SALFNAVNWVESRSWDGRDAIVVASDIALYKEDASRPTGGAGCVAMLIGPNAVLSLEPSL				183
Sbjct 123	NAVFNTINWIESSAWDGRDGIWVAGDIALYAKGNARPTGGAGAVALLIGPNAPIVAEPL				182
Query 184	RGVYMTNTDFYKPD <sup>258</sup> MKVEFPIVNGHESIACYLALDECHKDLLRRTEAAKQLNG--DA				241
Sbjct 183	RGTYMQHAYDFYKPD <sup>258</sup> LTSEYPYVDGHYSINCYKALDAAYRDYCKRE--AKQSTNGVTNG				240
Query 242	PKTGKKVLDLFDYMAFH <sup>258</sup> TPNCKLVSKSYGRLKYNDCLNSTNAADWEGIPDELRLNSYKDS				301
Sbjct 241	SDPNRTNLDRFDYLA <sup>258</sup> FHSPTCKLVQKSYARLLYHDYLANADSPAFAEVAPELRDMDEYS				300
Query 302	LKDKTLERALVAATKTEFKMRVEPCIAAPSLCGNMYTASLYCSLISLISNIDLASAEGKT				361
Sbjct 301	LTDKVV <sup>366</sup> EKTFMGLTKKRFQERVNPSIQVATNVGNMYCGSVWGLASLISVVDNKALEGKR				360
Query 362	IGLFSY <sup>366</sup> GSGAASTLFGMRVTGDLTNMVQKIDLMRRLKQRNIQTPEDYEKACALRLKAYGN				421
Sbjct 361	IGLFSY <sup>366</sup> GSLAASFMSFRINGNVERISDVLDIPTRLAARRAVPPENYDKMCDLRKQAHLQ				420
Query 422	KSYKPLGDVSSLTPGTYYLKSIDEAYRRTYAIK 454				
Sbjct 421	K Y P G++S + PGTYYL +D+ ++R YAIK 453				

Query: g431 subject: g6807

Fig. 3-11 ゲノム中に重複して存在している g6807 と g431 の相同性

Description	E-value	Identity(%)	Accession
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium</i> sp. AF-8]	0	98.90	RSL61163.1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium</i> kuroshium]	0	98.90	RMJ01536.1
predicted protein [ <i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4]	0	98.68	XP_003046809.1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium</i> sp. AF-6]	0	98.68	RSL38547.1
hypothetical protein FIESC28_01189 [ <i>Fusarium</i> sp. FIESC_28]	0	91.23	RBR25916.1
hydroxymethylglutaryl- synthase [ <i>Fusarium</i> longipes]	0	90.57	RGP75644.1
hydroxymethylglutaryl-coa synthase [ <i>Fusarium</i> sp. FIESC_12]	0	90.35	RFN51932.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. lycopersici 4287]	0	90.99	XP_018241554.1
hydroxymethylglutaryl- synthase [ <i>Fusarium sporotrichioides</i> ]	0	90.35	RGP71400.1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. narcissi]	0	90.77	RYC95083.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. radices-lycopersici 26381]	0	90.77	EXL58783.1
probable hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289]	0	90.77	XP_023426697.1
hydroxymethylglutaryl- synthase [ <i>Fusarium langsethiae</i> ]	0	90.13	KPA44532.1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium oxysporum</i> ]	0	90.97	RKL14879.1
hypothetical protein FVER14953_03844 [ <i>Fusarium verticillioides</i> ]	0	90.33	RBQ73178.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium graminearum</i> PH-1]	0	89.91	XP_011328502.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium verticillioides</i> 7600]	0	90.33	XP_018748031.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Fusarium proliferatum</i> ]	0	90.55	RBA18877.1
hypothetical protein FPSE_09658 [ <i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096]	0	89.91	XP_009261050.1
hypothetical protein FPOA_11543 [ <i>Fusarium poae</i> ]	0	89.87	OBS19818.1

Table 3-7 g6807 の BLAST 検索の結果

Description	E-value	Identity(%)	Accession
hypothetical protein BHE90_000800 [ <i>Fusarium euwallaceae</i> ]	0	96.05	RTE84761.1
hypothetical protein CDV31_011894 [ <i>Fusarium ambrosium</i> ]	0	96.27	RSM00160.1
hypothetical protein CEP52_005688 [ <i>Fusarium sp. AF-4</i> ]	0	96.05	RSM06542.1
hypothetical protein CEP54_011009 [ <i>Fusarium sp. AF-8</i> ]	0	95.57	RSL52246.1
hypothetical protein NECHADRAFT_95060 [ <i>Nectria haematococca</i> mpVI 77-13-4]	0	94.96	XP_003049224.1
hypothetical protein CEP53_014102 [ <i>Fusarium sp. AF-6</i> ]	0	95.18	RSL39374.1
hypothetical protein CDV36_003539 [ <i>Fusarium kuroshium</i> ]	0	95.18	RMJ16766.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Aspergillus ellipticus</i> CBS 707.79]	0	83.30	PYH95674.1
hypothetical protein SS1G_10644 [ <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> 1980 UF-70]	0	83.30	XP_001588197.1
hypothetical protein BHYA_0173g00290 [ <i>Botrytis hyacinthi</i> ]	0	82.86	TGO35034.1
Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Scedosporium apiospermum</i> ]	0	82.46	XP_016644187.1
hypothetical protein BCON_0702g00010 [ <i>Botryotinia convoluta</i> ]	0	82.64	TGO43933.1
putative hydroxymethylglutaryl-synthase protein [ <i>Botrytis cinerea</i> BcDW1]	0	82.64	EMR87016.1
hypothetical protein BCIN_04g04450 [ <i>Botrytis cinerea</i> B05.10]	0	82.42	XP_001557571.1
hypothetical protein BELL_0015g00430 [ <i>Botrytis elliptica</i> ]	0	82.64	TGO80110.1
hypothetical protein BGAL_0055g00460 [ <i>Botrytis galanthina</i> ]	0	82.16	THV53287.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Xylona heveae</i> TC161]	0	80.88	XP_018192497.1
hypothetical protein BOTNAR_0077g00010 [ <i>Botryotinia narcissicola</i> ]	0	81.98	TGO65596.1
hypothetical protein BOTCAL_0674g00010 [ <i>Botryotinia calthae</i> ]	0	81.54	TEY33601.1
hydroxymethylglutaryl-CoA synthase [ <i>Lepidopterella palustris</i> CBS 459.81]	0	81.80	OCK73980.1

Table 3-8 g431 の BLAST 検索の結果



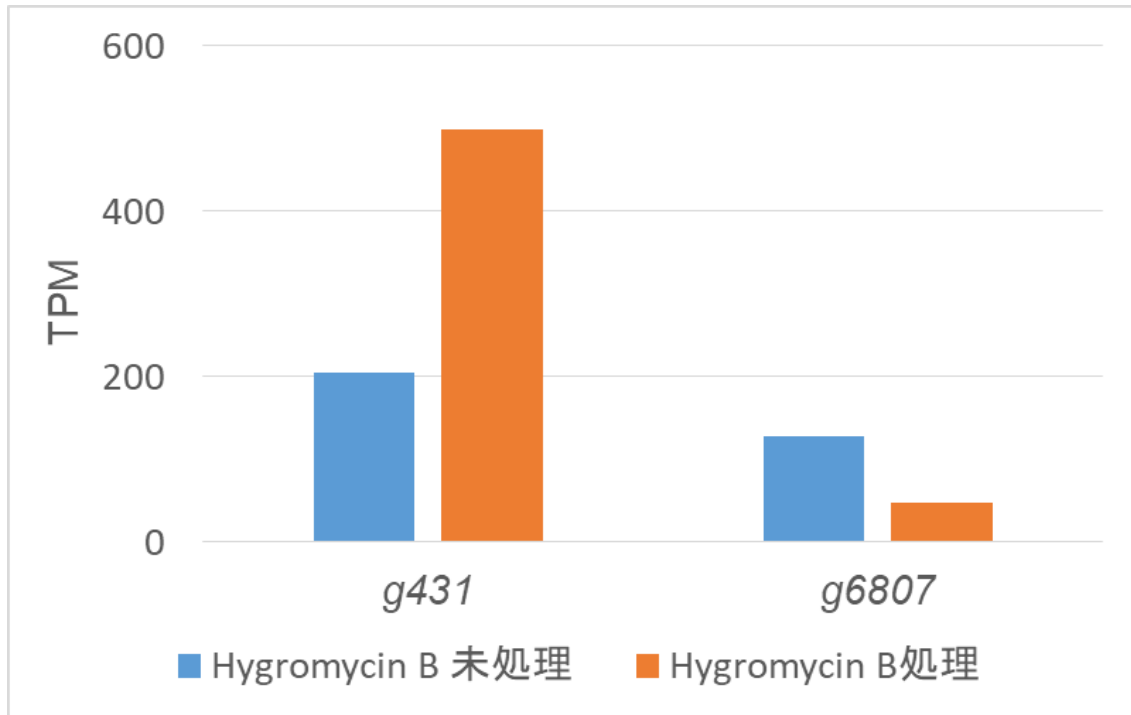


Fig. 3-12 *g431* と *g6807* 遺伝子発現量の比較

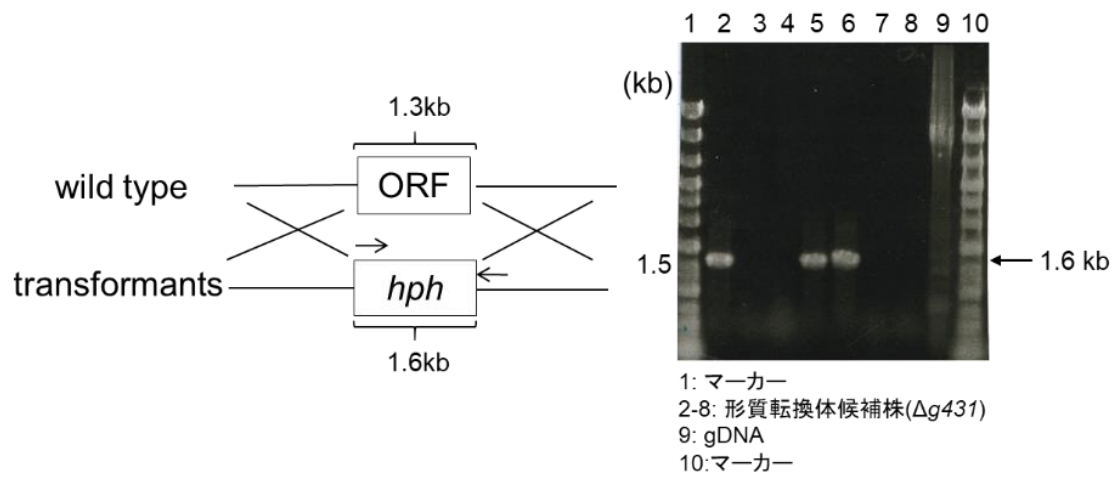


Fig. 3-13 *g431* 破壊株作成

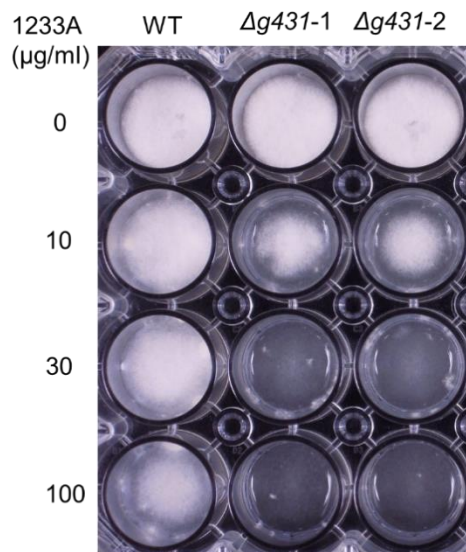


Fig. 3-14 1233A に対する感受性試験

### 3-6 考察

本章では、*Fusarium* sp. RK97-94 株において、hygromycin B 処理によって二次代謝産物生合成遺伝子クラスター中の基本骨格生合成に関与する遺伝子のうち 7 遺伝子が発現誘導されることを見出した。更に、遺伝子破壊株の代謝物分析の結果から、fusarubin と未発見であった 1233A 生合成遺伝子クラスターを同定した。本研究で明らかにした hygromycin B による二次代謝遺伝子の発現誘導は、新たな二次代謝遺伝子の活性化手法となりえる。Hygromycin B 処理によって二次代謝産物生合成遺伝子の発現が変化したことから、クロマチンレベルでの変化が起きている可能性が考えられる。今後はヒストン修飾やクロマチンの変化と hygromycin B の作用との関連性についての解析が望まれる。

Hygromycin B 処理した菌体と未処理の菌体の全遺伝子の発現量を比較する RNA-seq 解析により見出した *g12887* は fusarubin の基本骨格を生合成する PKS をコードする *fsr1* と高い相同性を示した。この遺伝子は hygromycin B 処理によって発現量が 452 倍になり、その周辺の生合成に必須な遺伝子は保存されていた。PKS (*g12887*) の遺伝子破壊株では fusarubin の生産が見られなくなったことから、周辺の遺伝子群を fusarubin 生合成遺伝子クラスターと同定した。fusarubin 生合成遺伝子クラスターは C6 型転写因子を含み、この転写因子が fusarubin 生合成遺伝子の発現を調節していることが明らかとなっている<sup>41</sup>。しかしながら、本菌のクラスター内には存在していなかった。糸状菌の二次代謝遺伝子クラスター中に必ずしも明確な転写因子が存在しているわけではない。転写因子が存在しない二次代謝遺伝子クラスターの発現制御メカニズムは一部解明されている。二次代謝生合成遺伝子クラスターのグローバルな制御因子として *LaeA* が知られており、*LaeA* がこのような遺伝子クラスターの発現制御を担っている例が報告されている<sup>25</sup>。Fusarubin 生合成遺伝子クラスターも *LaeA* のホモログにより発現制御されている可能性がある。

Hygromycin B 処理により発現が上昇した二次代謝産物生合成遺伝子クラスターのうち遺伝子クラスター No.3 を 1233A 生合成遺伝子クラスターとして同定した。二次代謝産物生合成遺伝子クラスター中にターゲットとなる酵素遺伝子が存在している場合、その酵素遺伝子は自己耐性化に付与していることが報告されている<sup>43,44</sup>。

HMG-CoA 合成酵素遺伝子はゲノム内に重複していることが明らかとなった。*g431* が自己耐性能を有するか検討したところ、 $\Delta g431$  株では 1233A に対する感受性が向上したことから、1233A への耐性化に関与していることが示唆された。1233A 耐性型の HMG-CoA 合成酵素について報告はなく、新たな知見が得られることが期待できる。今後の更なる解析として、*g6807* 遺伝子破壊株に対する 1233A の感受性を調べることが必要とされる。遺伝子破壊により 1233A 感受性が変化しなければ *g431* が 1233A に対して耐性型であることが示唆される。*g431* は *g6807* と相同性が 52% であり、BLAST サーチによる相同性検索では、ごく限られた近縁の *Fusarium* 属にのみ共通して存在し

ていることが示唆されている。一方 g6807 は 80%以上の高い相同性を有した糸状菌において広く保存されていることが明らかとなった。HMG-CoA 合成酵素遺伝子の近傍に PKS 遺伝子が存在する例があるか検討した結果、クラスターとして存在している例がないことが示唆された。このことから 1233A 生合成遺伝子クラスターは PKS と HMG-CoA 合成酵素の遺伝子が共存している、非常にユニークな例であることが示唆された。

## 第4章 実験方法

### 4-1. 使用菌株と培地

本研究では、理化学研究所長田抗生物質研究室で単離され保存されている lucilactaene 生産菌 *Fusarium* sp. RK97-94 株を使用した。プラスミドの増幅には *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  株を使用し、ATMT 法には *Agrobacterium tumefaciens* C58 株を使用した。

### 4-2. 大腸菌 DH5 $\alpha$ の形質転換

*E. coli* DH5 $\alpha$  株の形質転換は Inoue method で行った。コンピテントセル 100  $\mu$ l へ In-Fusion 処理済み溶液 5  $\mu$ l をゆっくりとエッペンの先を回しながら加え、氷上で 30 min 静置した。その後 42°C のお湯で 45 sec 処理し、即座に氷中へ移した。その後、1 ml の SOC medium (2% tryptone、0.5% yeast extract、0.05% NaCl、20 mM glucose) を加えて、37°C で 1 時間培養した。この培養液 100  $\mu$ l を、kanamycin を最終濃度 50  $\mu$ g/ml になるように加えた LB 寒天培地 (1% tryptone、1% NaCl、0.5% yeast extract、1.5% agar) (LB+Km50) にプレーティングした。残りの培養液を 10000rpm で 1 分遠心し、上清を少量残して取り除き、菌体を懸濁して LB+Km50 培地にプレーティングした。これを 37°C で 15 時間静置培養した。

### 4-3. プラスミド抽出

生育したコロニーを楊枝でピックアップして 14 ml チューブに入った LB+Km50 液体培地 3 ml に懸濁し、約 16 時間 37°C で振とう培養した。培養液を 13000 rpm、1 min 遠心し、培地を取り除いた。この菌体から QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN 社) のプロトコルに従いプラスミドを抽出した。プラスミドは 1/2 TE buffer 50  $\mu$ l に溶解させた。

### 4-4. *A. tumefaciens* C58 株の形質転換

抽出したプラスミド溶液 2  $\mu$ l を *A. tumefaciens* C58 株のコンピテントセル 50  $\mu$ l に加え、エレクトロポレーション法 (1.80 kV、4.10 ms) で遺伝子導入した。その後、1 ml の SOC 培地を加えて 1.5 時間 28°C で培養した。この培養液を 10000 rpm で 2 分遠心し、上清を少量残して取り除き、菌体を懸濁して LB+Km50 培地に播種し 28°C で 2 日から 3 日間培養した。これに 15% グリセロールを 1.5 ml 加えて懸濁し、-80°C で保存した。

### 4-5. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation (ATMT) 法

形質転換した *A. tumefaciens* C58 株の一部を滅菌水で 20 倍希釈して OD<sub>660</sub> を測定した。OD 値の測定には NanoDrop 2000 (Thermo) を使用した。測定した OD 値から何倍希釈で OD<sub>660</sub> が 0.3 になるかを計算した。この *A. tumefaciens* を 1.5 ml の誘導培地 (kanamycin 最終濃度 50  $\mu$ g/ml、acetosyringone 最終濃度 500  $\mu$ g/ml になるように加えた induction

medium (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 9 μM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 10 mM glucose, 40 mM MES, 0.5% glycerol, pH5.3) (IM+Km50+As500) に OD<sub>660</sub> が 0.3 になるように懸濁し、28℃で 6 時間培養した。共培養培地 (kanamycin 最終濃度 50 μg/ml, acetosyringone 最終濃度 500 μg/ml になるように加えた co-cultivation medium (10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5 mM NaCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.7 mM CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 9 μM FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 5 mM glucose, 40 mM MES, 0.5% glycerol, 1.5% agar, pH5.3) (CCM+Km50+As500)) の上に Amersham Hybond ·N<sup>+</sup> (GE Healthcare) メンブレンをのせた。そこに、10<sup>5</sup>/ml、10<sup>4</sup>/ml、10<sup>3</sup>/ml に調整した *Fusarium* sp. RK97-94 株の孢子 100 μl と IM+Km50+As500 で培養した *A. tumefaciens* 100 μl を混合してからプレーティングした。これを 25℃で 36 時間から 48 時間培養した後に、メンブレンを選択培地 (hygromycin B 最終濃度 500 μg/ml, carbenicillin 最終濃度 500 μg/ml になるように加えた PDA 培地 (PDA+Hyg500+Carb500)、および hygromycin B 最終濃度 200 μg/ml, carbenicillin 最終濃度 500 μl になるように加えた PDA 培地 (PDA+Hyg200+Carb500)) の上に移した。これを 28℃で 3~7 日間培養し、コロニーが出たらピックアップして PDA+Hyg200+Carb500 上で培養した。

#### 4-6. PCR による形質転換体の確認

*Fusarium* sp. RK97-94 株の形質転換の確認はコロニーPCR により行った。KOD FX Neo (25 μl スケール) の反応溶液を調整後、菌体を 0.5 mg 程度反応液中に直接入れて PCR を行った。泳動 buffer は TAE buffer を使用し、マーカーは Wide Range DNA Ladder (50-10000 bp) (TaKaRa 社) を使用した。泳動は 100 V で 30 min 行った。泳動したゲルは GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X in water で染色し、トランスイルミネーターで確認した。

#### 4-7. 前培養

Lucilactaene 生産培地での生育に用いる菌体は事前に十分に生育させた状態であることが、効率的な lucilactaene 生産の条件となるため、前培養を行った。今回は 5 ml の PDB+0.1% Agar (PDB、Agar 共に Difco 社製) の入った 50 ml ファルコンチューブに、予め PDA プレートに十分に生育させた *Fusarium* sp. RK97-94 株と各形質転換株を 7 mm 四方に切り取った寒天片を入れ、25℃、150 rpm でウォーターバスインキュベーターを用いて振とう培養した。

#### 4-8. 24 穴プレートを用いた培養

*Fusarium* sp. RK97-94 株と各形質転換株の培養を 24 穴プレートで行った。各ウェルへ十分に攪拌した FDY 培地を 500 μl ずつ分注し、十分に攪拌した 10 μl の前培養液を添加

し、ピペットを使い本培養液と前培養液を攪拌した。25°Cで静置培養した。

#### 4-9. オムニプレートを用いた液体静置培養

*Fusarium* sp. RK97-94 株の形質転換株 $\Delta luc5$ 株の培養をオムニプレートでも行った。50 ml の OM 培地に前培養液 500  $\mu$ l を加え十分に攪拌し、オムニプレートへ全量添加し、25°Cで静置培養した。

#### 4-10. 2 L フラスコを用いた大量培養

*Fusarium* sp. RK97-94 株の野生型株と形質転換株 $\Delta luc1$ を 2 L 三角フラスコを用いて培養した。500 ml の FDY 培地に前培養液を 5 ml 加え、28°C 150 rpm で振盪培養した。

#### 4-11. 試験管培養時の代謝物の抽出

*Fusarium* sp. RK97-94 株の形質転換株  $\Delta g12887$ 株の培養を試験管で行った。一本当たり 7 ml の FDY 培地に前培養液 70  $\mu$ l を加え中分に攪拌し、28°Cで 250 rpm の振盪条件で 5 日間培養した。培養液を 500  $\mu$ l 回収し、培養液に 2 倍量のアセトンを加えて超音波処理 (30 sec) を行った後に、4000 rpm、5 min 遠心分離を行い、上清のみ新たなガラス管に回収し窒素ガスを 20 min 吹き込むことでアセトンを除いた。1.5 倍量 (0.75 ml) の酢酸エチルを添加し、30 sec ボルテックスし十分に攪拌した後、上層の酢酸エチル層のみを新たなガラス管に回収した。酢酸エチルによる抽出操作をもう一度行い合計で 2 回抽出した後、酢酸エチル抽出物に窒素ガスを吹き込むことで酢酸エチルを完全に取り除いた。200  $\mu$ l のメタノールに溶解させ、得られた溶液を 0.2  $\mu$ m フィルター(Miles-LG)を用いて濾過し、抽出サンプルとして-20°Cに保存した。

#### 4-12. 24 穴プレート培養時の代謝物の抽出

各ウェルの培養液を UPLC/MS を用いて分析するにあたり、培養液の抽出を行った。1 ウェルあたり 2 ml の 99.8%エタノール (和光純薬) を加え、攪拌し、全量を 15 ml チューブに移し、4°Cで一日静置した。抽出液を 4000 rpm で 5 min (Beckman) 遠心分離し、菌体と抽出液を分離した。抽出液のみガラス管に移し、窒素ガスを吹き込み完全に乾燥させ、LC/MS 用メタノールを 200  $\mu$ l 添加し、30 sec ボルテックスし溶解させた。得られた溶液を 0.2  $\mu$ m フィルター(Miles-LG)を用いて濾過し、抽出サンプルとして-20°Cに保存した。

#### 4-13. UPLC/MS を用いた分析

UPLC は Waters 社の ACQUITY UPLC H-Class システムを用いた。MS は API 3200 (システム Analyst 1.5.1、AB SCIEX 社) で検出した。カラムは ACQUITY UPLC BEH C18 1.7  $\mu$ m 2.1  $\times$  50 mm Column (Waters 社) を使用し、カラム温度は 40°Cで分析した。サンプルは 1  $\mu$ l 注入した。流量 0.6 ml/min、展開溶媒はアセトニトリル-0.05%ギ酸水系グ

ラジエント (0 min アセトニトリル 5%、0-2.80 min アセトニトリル 95%、2.80-5.80 min アセトニトリル 95%、5.80-5.90 min アセトニトリル 5%) で展開した。吸光度は 200-500 nm で検出した。MS はポジティブ及びネガティブモードで検出した。

#### 4-14. Demethylucilactaene (3, 4)の精製

$\Delta luc1$  株は、FDY 培地中で培養すると demethylucilactaene (3, 4)を産生する。 $\Delta luc1$  を 500 ml の生産培地 FDY を含む 2 L のフラスコ中で 28°Cにおいて 96 時間培養した。培養物を 2 倍量のアセトンで処理し、上清を真空中で濃縮してアセトンを除去した。得られた水溶液を 1.5 倍量の酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層をエバポレーターで蒸発させて、630 mg の褐色油状物を得た。乾燥した物質を、溶媒相  $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$  (5 : 6 : 4、上昇法) を使用した遠心分離クロマトグラフィー (CPC、モデル CPCLLN、サンキエンジニアリング社製) に供した。第六から第八画分を合わせた。溶出画分をエバポレーターで溶媒を蒸発させ、抽出物を得た。流速 8 ml/min 逆相カラム (PEGASIL ODS、20×250 mm、Senshu Scientific Co. Ltd.、東京、日本) を使用して抽出物を HPLC 分画した。グラジエントは、 $\text{H}_2\text{O}$  (溶媒 A) 中の MeCN (溶媒 B) : 0~40 min で 5%~100% B および 40~50 分で 100% B とした。

#### 4-15. Fusarubin (5) の精製

$\Delta luc5$  株を hygromycin B を 100  $\mu\text{g/ml}$  添加した PDA 培地で 28°Cで 7 日間培養した。培養物を 20 ml のメタノール:アセトン=1:1 の混合液で抽出し、抽出液を真空中で濃縮してアセトンとメタノールを除去し、40 mg の褐色油状物を得た。流速 8 ml/min 逆相カラム (PEGASIL ODS、20×250 mm、Senshu Scientific Co. Ltd.、東京、日本) を使用して抽出物を HPLC 分画した。グラジエントは、 $\text{H}_2\text{O}$  (溶媒 A) 中の MeCN (溶媒 B) : 0~40 min で 5%~100% B および 40~50 分で 100% B とした。溶出時間 28 分付近に代謝物が確認され、18.2 mg を取得した。

#### 4-16. 1233A (7)の精製

$\Delta luc5$  株を hygromycin B を 100  $\mu\text{g/ml}$  添加したオートミール液体培地で 28°C、5 日間培養した。培養物を 1.5 倍量のアセトンで処理し、抽出液を真空中で濃縮してアセトン除去し、1.36 g の褐色油状物を得た。流速 8 ml/min 逆相カラム (PEGASIL ODS、20×250 mm、Senshu Scientific Co. Ltd.、東京、日本) を使用して抽出物を HPLC 分画した。グラジエントは、 $\text{H}_2\text{O}$  (溶媒 A) 中の MeCN (溶媒 B) : 0~40 min で 5%~100% B および 40~50 分で 100% B とした。溶出時間 29 分付近に 1233B (6) が確認された。溶出時間 35 分に 1233A (7) が観察された。



#### 4-17. 化合物の構造決定

NMR データは、JEOL JNM-ECA-500 分光計 (JEOL、東京、日本) 上で、<sup>1</sup>H-NMR については 500 MHz、<sup>13</sup>C-NMR については 125 MHz で得た。HRMS は Waters VIOM で分析した。IR スペクトルは、DuraSampl IR II ATR 装置を備えた HORIBA FT-720 で記録した。

#### 4-18. 動物細胞を用いた生物活性評価

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa を、10%ウシ胎児血清 (FBS ; Sigma-Aldrich) を補充した DMEM (Thermo Fisher Scientific) 中で 37°C で培養した。ヒト前骨髄球性白血病細胞由来細胞株 HL-60 を、10%FBS を添加した RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) 中、37°C で培養した。各細胞株を 384 ウェルプレートに播種した (HeLa については  $1 \times 10^3$  細胞/well、HL-60 については  $3.75 \times 10^3$  細胞/well)。サンプルへの 48 時間の曝露後、製造元の指示に従って Cell Count Reagent SF (ナカライテスク) を用いて細胞増殖を測定した。簡単に説明すると、1/10 容量の WST-8 溶液を各ウェルに添加し、プレートを 1 時間インキュベートした。次に、細胞増殖をマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) で 450 nm の吸光度として測定した。

#### 4-19. 抗菌活性アッセイ

以下の微生物をアッセイにおける試験株として使用した。黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 209、大腸菌 *Escherichia coli* HO141、*Candida albicans* JCM1542、*Aspergillus fumigatus* Af293、および *Pyricularia oryzae* Kita1。これらの微生物に対する試料の抗微生物活性は、標準的な微量希釈法によって行われた。黄色ブドウ球菌および大腸菌については、0.1%の 0.5 McFarland 標準懸濁液を含有する 50  $\mu$ l の細胞懸濁液を 384 ウェルプレートにプレーティングした。試験化合物を培地に添加し、プレートを 37°C (黄色ブドウ球菌、大腸菌) で 24 時間インキュベートした。*C. albicans* および *A. fumigatus* については、0.1%の 0.5 McFarland 標準懸濁液を含有する 50  $\mu$ l の接種懸濁液を 384 ウェルプレートに播種し、28°C で 24 時間 (*C. albicans*) または 48 時間 (*A. fumigatus*)。 *P. oryzae* の場合、384 ウェルプレート中に 2%の前培養ブロス含有する 50  $\mu$ l の細胞懸濁液を 28°C で 48 時間インキュベートした。これらの微生物の増殖は 600 nm での吸光度によって測定した。

#### 4-20. 抗マラリア活性アッセイ

熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* 3D7 を、3%ヘマトクリット A 型ヒト赤血球 (日本赤十字社) を含む培地中で、5.0% CO<sub>2</sub> および 5% O<sub>2</sub> 下、37°C で培養した。培地は RPMI1640 (25 mM HEPES、24 mM NaHCO<sub>3</sub>、0.03% L-glutamine (Thermo Fisher Scientific)) に 0.4% glucose、20  $\mu$ g/ml hypoxanthine、24  $\mu$ g/ml gentamicin、及び 0.25%

AlbuMax II (Sigma-Aldrich) を添加したものをを用いた。熱帯熱マラリア原虫増殖アッセイを実施するために、50  $\mu$ l の 0.3% 寄生赤血球および 2% ヘマトクリットを 384 ウェルプレートに分注した。試験サンプルに 72 時間暴露した後、プレートを -70°C で一晩凍結し、次いで室温で少なくとも 4 時間解凍した。LDH 活性を評価するために、25  $\mu$ l の新たに調製した反応混合物 (300 mM L-乳酸ナトリウム、300  $\mu$ M 3-アセチルピリジンアデニンジヌクレオチド、374  $\mu$ M ニトロブルーテトラゾリウムクロリド、270  $\mu$ g/ml ジアホラーゼ (22.5 U/ml)、1.5% tween 20、209 mM Tris-HCl、pH 8.0) を添加した。プレートを振盪して確実に混合し、室温で 10 分間インキュベートした後、620 nm での吸光度をプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific) でモニターした。

#### 4-21. 放線菌を用いたペーパーディスク試験

放線菌 *Streptomyces griseus* と *Streptomyces hygroscopicus* の孢子を終濃度 ( $1 \times 10^6$  個/ml) で YSA プレートに播種し、ペーパーディスクに 5  $\mu$ l の 10 mM 化合物溶液を添加したものを置き、28°C で 2 日間培養した。

Table1 本研究で使用したプライマー

name	sequence
IF_RB-No.3_upstream2k- 5F,15+30mer,78.15,,(18001-18030)	GGAAACGACAATCTGAAGGGCTCGTGGT CTTTGAGTGAGGACGAG
IF_3HPH-No.3_upstream2k- 5R,15+30mer,70.33,,(20000-19971)	CAAGAATAAAACGCGGGCTGCTAATTCAA AAGACAGAGAAAAAGC
IF_5HPH-No.3_downstream2k- 3F,15+30mer,73.21,,(28333-28362)	GGTATCGATAAGCTTATTGACGGTTACAG GACGCTACAAACTCGT
IF_LB-No.3_downstream2k- 3R,15+30mer,Tm,74.68,,(30304- 30333)	AACACATTGCGGACGGGCGGAGGCTGAT TCAAGCTTATCTACATG
IF_colonycheck_No.3_upstream2k- 5F, 30mer,70.33,,(20000-19971)	GCTTTTTCTCTGTCTTTTGAATTAGCAGCC
IF_colonycheck_No.3_downstream2k -3R, 30mer,73.21,,(28333-28362)	CGAGTTTGTAGCGTCCTGTAACCGTCAAT
IF_RB-No.34_upstream2k- 5F,15+35mer,70.2,,(18001-18035)	GGAAACGACAATCTGCCAATCATCTCATA AATAACAATTTGACGAAATTC
IF_3HPH-No.34_upstream2k- 5R,15+32mer,72.95,,(20000-19953)	CAAGAATAAAACGCGGTAGAGGAGAAGTA AAGGGAACCAGTTGGTGGAAATCAAG
IF_5HPH-No.34_downstream2k- 3F,15+30mer,72.89,(27162-27191)	GGTATCGATAAGCTTGACGAAGGTGTTGA ATCTTGGTGGTGTA
IF_LB-No.34_downstream2k- 3R,15+35mer,70.02,,(29262-29128)	AACACATTGCGGACGGCTTGGTAAGAATA ACGATGTAAGTTCATAACCAA
IF_colonycheck_No.34_upstream2k- 5F 32mer,72.95,,(20000-19953)	ACCAACTGGTTCCCTTTACTTCTCCTCTAC
IF_colonycheck_No.34_downstream2 k-3R, 30mer,72.89,(27162-27191)	TTTACACCACCAAGATTCAACACCTTCGT C
IF_RB-g430up2k-5F,15+30mer(9915- 9944)	GGAAACGACAATCTGATCCTGGTCACTCA TTGGGAGACTGTGTGTT
IF_3HPH-g430up2k- 5R,15+30mer(11914-11885)	CAAGAATAAAACGCGATCCAGTACAAGAT CCTCAGGGTTTCTCAT
IF_5HPH-g430down2k- 3F,15+30mer(14042-14071)	GGTATCGATAAGCTTCTTCGTGTTGACAA GTACTAAAGGCGTCGT
IF_LB-g430down2k- 3R,15+30mer(16041-16012)	AACACATTGCGGACGGTTCCTGGCCCTT GATAGCATAAGTTCTA
IF_RB-HMG-CoA_upstream2k-	GGAAACGACAATCTGAATATCCCACCCA

5F,15+30mer,78.15,,	ACCTTTCTCCCCTCCC
IF_3HPH-HMG-CoA_upstream2k- 5R,15+30mer,70.33,,	CAAGAATAAAAACGCGCTTGTGAATACTTG CGTGGCTGATCTTCAG
IF_5HPH-HMG- CoA_downstream2k- 3F,15+30mer,73.21,,	GGTATCGATAAGCTTACAATGGGGTTGGG GGCTTACCAGCGGTAA
IF_LB-HMG-CoA_downstream2k- 3R,15+30mer,Tm,74.68,,	AACACATTGCGGACGCTAAGAGTTGCTCG TCCTCACTCAAAGACC
colonycheck_HMGS_F,30mer,77.3	TGGTGAGAGAGAGGATGTAACCCACAGG CA
colonycheck_HMGS_R,30mer,82.0	CCCATTGGCGGCCGTACTTTTGCACACCT T
IF_RB-g432up2k- 5F,15+30mer(15753-15782)	GGAAACGACAATCTGTCACTGGTGATCTA ACCAACATGGTTCAAA
IF_3HPH-g432up2k- 5R,15+30mer(17751-17722)	CAAGAATAAAAACGCGTCTGTGGCCTTGTG ATCGAATCTGAAGAAC
IF_5HPH-g432down2k- 3F,15+30mer(19076-19105)	GGTATCGATAAGCTTACCATTACTGGCCTC GCAGGCCTGGCTTGG
IF_LB-g432down2k- 3R,15+30mer(21046-21075)	AACACATTGCGGACGAGCGCCTCATGGCT CTCAGGGCTAGGATGA

## 第5章 引用文献

1. Katz, L. & Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **43**, 155–176 (2016).
2. Keller, N. P., Turner, G. & Bennett, J. W. Fungal secondary metabolism - From biochemistry to genomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 937–947 (2005).
3. Gacek, A. & Strauss, J. The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **95**, 1389–1404 (2012).
4. Tudzynski, B. *et al.* Characterization of the final two genes of the gibberellin biosynthesis gene cluster of *Gibberella fujikuroi*. *des* and *P450-3* encode GA4 desaturase and the 13-hydroxylase, respectively. *J. Biol. Chem.* **278**, 28635–28643 (2003).
5. Dien *et al.*, 2013. 基因的改变 NIH Public Access. *Bone* **23**, 1–7 (2008).
6. Notz, R., Maurhofer, M., Dubach, H. & Haas, D. Fusaric Acid-Producing Strains of *Society* **68**, 2229–2235 (2002).
7. Wiemann, P. *et al.* Biosynthesis of the red pigment bikaverin in *Fusarium fujikuroi*: Genes, their function and regulation. *Mol. Microbiol.* **72**, 931–946 (2009).
8. Von Bargen, K. W. *et al.* Isolation and Structure Elucidation of Fujikurins A-D: Products of the PKS19 Gene Cluster in *Fusarium fujikuroi*. *J. Nat. Prod.* **78**, 1809–1815 (2015).
9. Brock, N. L., Tudzynski, B. & Dickschat, J. S. Biosynthesis of sesqui- and diterpenes by the gibberellin producer *Fusarium fujikuroi*. *ChemBioChem* **12**, 2667–2676 (2011).
10. Janevska, S. & Tudzynski, B. Secondary metabolism in *Fusarium fujikuroi*: strategies to unravel the function of biosynthetic pathways. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **102**, 615–630 (2018).
11. Kakeya, H. *et al.* Lucilactaene, a new cell cycle inhibitor in p53-transfected cancer cells, produced by a *Fusarium* sp. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **54**, 850–4 (2001).
12. Foster, B. A., Coffey, H. A., Morin, M. J. & Rastinejad, F. Pharmacological rescue of mutant p53 conformation and function. *Science (80- )*. **286**, 2507–2510 (1999).
13. Vogelstein, B., Lane, D. & Levine, A. J. Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307–310 (2000).
14. Winters, Z. E., Ongkeko, W. M., Harris, A. L. & Norbury, C. J. p53 regulates Cdc2 independently of inhibitory phosphorylation to reinforce radiation-induced G2 arrest in human cells. *Oncogene* **17**, 673–684 (1998).

15. Mclure, K. G., Takagi, M. & Kastan, M. B. NAD<sup>+</sup> Modulates p53 DNA Binding Specificity and Function. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 9958–9967 (2004).
16. Wiebe, L.A, and Bjeldanes, L. F. Fusarin C, a mutagen from *Fusarium Moniliforme* grown on corn. *J. Food Sci.* **46**, 1424–1426 (1981).
17. Song, Z., Cox, R. J., Lazarus, C. M. & Simpson, T. J. Fusarin C biosynthesis in *Fusarium moniliforme* and *Fusarium venenatum*. *ChemBioChem* **5**, 1196–1203 (2004).
18. Gelderblom, W. C. A., Thiel, P. G., Marasas, W. F. O. & van der Merwe, K. J. Natural Occurrence of Fusarin C, A Mutagen Produced by *Fusarium moniliforme*, in Corn. *J. Agric. Food Chem.* **32**, 1064–1067 (1984).
19. Brakhage, A. A. Regulation of fungal secondary metabolism. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 21–32 (2013).
20. Orejas, M. *et al.* Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. *Genes Dev.* **9**, 1622–1632 (1995).
21. Hortschansky, P. *et al.* Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex - A novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* **26**, 3157–3168 (2007).
22. Caddick, M. X. & Arst, J. Deletion of the 389 N-terminal residues of the transcriptional activator AREA does not result in nitrogen metabolite derepression in *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* **180**, 5762–5764 (1998).
23. Bayram, Ö. & Braus, G. H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: The velvet family of regulatory proteins. *FEMS Microbiol. Rev.* **36**, 1–24 (2012).
24. Dowzer, C. E. A. & Kelly, J. M. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **15**, 457–459 (1989).
25. Atoui, A., Bao, D., Kaur, N., Grayburn, W. S. & Calvo, A. M. *Aspergillus nidulans* natural product biosynthesis is regulated by MpkB, a putative pheromone response mitogen-activated protein kinase. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3596–3600 (2008).
26. Bayram, Ö. *et al.* The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
27. Oakley, C. E. *et al.* Discovery of McrA, a master regulator of *Aspergillus* secondary metabolism. *Mol. Microbiol.* **103**, 347–365 (2017).
28. Asai, T. *et al.* Structurally diverse chaetophenol productions induced by chemically mediated epigenetic manipulation of fungal gene expression. *Org. Lett.* **15**, 3346–3349 (2013).
29. Asai, T., Taniguchi, T., Yamamoto, T., Monde, K. & Oshima, Y. Structures of

- spiroindicumides A and B, unprecedented carbon skeletal spirolactones, and determination of the absolute configuration by vibrational circular dichroism exciton approach. *Org. Lett.* **15**, 4320–4323 (2013).
30. Gerber, N., Box, P. O. & Sacc, M. NEW ANTIBIOTIC PIGMENTS RELATED TO FUSARUBIN FROM FUSARIUM SOLANI ( MART .) SACC . and MOKHTAR S . AMMAR Waksrnan Institute of Microbiology , Rutgers-The State University ( Received for publication. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **XXXII**, 685–688
  31. Kurobane, I., Zaita, N. & Fukuda, A. New metabolites of *Fusarium martii* related to dihydrofusarubin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **39**, 205–214 (1986).
  32. KUMAGAI, H., TOMODA, H. & OMURA, S. Biosynthesis of antibiotic 1233A (F-244) and preparation of (14C) 1233A. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **45**, 563–567 (2012).
  33. Yodkovitz, J. B. *et al.* Satoshi Omura. 1356–1357 (1987).
  34. Hiroshi, T., Hidetoshi, K., Haruo, T. & Satoshi, O. F-244 specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)/Lipids Lipid Metab.* **922**, 351–356 (1987).
  35. Roberts, N. N. K. F. K. B. B. M. W. D. L. L. H. D. E. D. J. D. Structure of hygromycin B, an antibiotic from *Streptomyces hygrosopicus*†; The use of CMR. spectra in structure determination, I. *Helv Chim Acta.* **53**, 2314–2319 (1970).
  36. Graziani, S., Vasnier, C. & Daboussi, M. J. Novel polyketide synthase from *Nectria haematococca*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 2984–2988 (2004).
  37. Rohlf, M., Albert, M., Keller, N. P. & Kempken, F. Secondary chemicals protect mould from fungivory. *Biol. Lett.* **3**, 523–525 (2007).
  38. Pihet, M. *et al.* Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia. *BMC Microbiol.* **9**, 1–11 (2009).
  39. Ajikumar, P. K. *et al.* Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*. *Science (80-. )*. **330**, 70–74 (2010).
  40. Tomoda, H., Ohbayashi, N., Morikawa, Y., Kumagai, H. & Omura, S. Binding site for fungal  $\beta$ -lactone hymeglusin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1636**, 22–28 (2004).
  41. Studt, L., Wiemann, P., Kleigrewe, K., Humpf, H. U. & Tudzynski, B. Biosynthesis of fusarubins accounts for pigmentation of *Fusarium fujikuroi* perithecia. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**, 4468–4480 (2012).
  42. Tesh, V. L. Activation of cell stress response pathways by Shiga toxins. *Cell. Microbiol.* **14**, 1–9 (2012).
  43. Yan, Y. *et al.* Resistance-gene-directed discovery of a natural-product herbicide with a new mode of action. *Nature* **559**, 415–418 (2018).

44. Regueira, T. B. *et al.* Molecular basis for mycophenolic acid biosynthesis in *Penicillium brevicompactum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3035–3043 (2011).



## 第6章 謝辞

本研究の遂行に当たりご指導、ご高配を賜りました理化学研究所 環境資源科学研究センター副センター長/ケミカルバイオロジー研究グループグループディレクター 兼、埼玉大学大学院理工学研究科客員教授 長田裕之博士に心から感謝申し上げます。

本研究の遂行、本論文の作製に当たり終始ご指導、ご助言を賜りました。理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループ 本山高幸博士に心より感謝申し上げます。

本研究で行った標準評価系システムでの生物活性評価をおこなってくださった、理化学研究所環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループ 二村友史博士

本研究で精製した化合物の HRMS 解析をしていただきました、理化学研究所環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループ 野川俊彦研究員に深く感謝いたします。

本研究で精製した化合物の構造決定のご助言をいただいた理化学研究所 長田抗生物質研究室 浦本昌和博士に深く感謝いたします。

多岐にわたるご指導を賜りました 埼玉大学 分子生物学科 高橋康弘教授、小竹敬久教授、戸澤譲教授に感謝いたします。

日々の研究を共に進めてまいりました、理化学研究所 環境資源科学研究センター ケミカルバイオロジー研究グループの皆様には感謝いたします。

最後に精神的並びに経済的に支えていただいた両親と妻・文菜に感謝いたします。