

放線菌二次代謝産物 kinanthraquinone
の生合成研究

2021年9月

埼玉大学大学院理工学研究科（博士後期課程）

理工学専攻 生命科学コース

（主指導教員 高橋 俊二）

18DB002 高尾 理沙

目次

第1章 序論	
第1節 序	1
第2章 Kinanthraquinone (KQ) 生合成遺伝子クラスターの同定	3
第1節 KQ 生合成遺伝子クラスターの探索	3
第2節 異種発現ベクターの構築及び形質転換株の解析	8
第3節 <i>kqG</i> 遺伝子破壊株の解析	9
第4節 非典型 OmpR ファミリー制御因子遺伝子	10
第5節 <i>kqA</i> 遺伝子発現による KQ 類縁体の生産性改善	12
第6節 KQ 類縁体の構造決定	13
第7節 Feeding 実験による KQB から KQ への変換	16
第8節 考察	17
第3章 KQ 生合成遺伝子クラスターの解析と新規化合物の生物活性評価	18
第1節 遺伝子破壊と生合成中間体の解析	18
第2節 <i>kqO</i> 遺伝子破壊株に蓄積した化合物の単離・構造決定	20
第3節 Feeding 実験による 6,9-DHT から KQ への変換	23
第4節 6,9-DHT の生物活性評価	24
第5節 配糖化経路の探索	25
第6節 考察	27
実験の部	29
参考文献	39
補遺	46
謝辞	59

略語一覽

Amp	ampicillin
Apr	apramycin
BAC	bacterial artificial chromosome
BLAST	basic local alignment search tool
Cm	chloramphenicol
COSY	correlation spectroscopy
DMSO	dimethyl sulfoxide
EtOAc	ethyl acetate
GCN, <i>gcn</i>	grincamycin
HMBC	heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy
HPLC	high performance liquid chromatography
HRMS	high resolution mass spectrometry
HSQC	heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy
6,9-DHT	6,9-dihydroxytetrangulol
IR	infrared spectroscopy
Kan	kanamycin
KQ, <i>kiq</i>	kinanthraquinone
KR	ketoreductase
KS	ketosynthase
MIC	minimum inhibitory concentration
MT	methyltransferase
MeCN	acetonitrile
MeOH	methanol
MPLC	medium-pressure liquid chromatography
NMR	nuclear magnetic resonance
NRPS	nonribosomal peptide synthetase
OD	optical density
ORF	open reading frame
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PKS	polyketide synthase
Tsr	thiostrepton
UPLC/MS	ultra high performance liquid chromatography/ mass spectrometry
XIC	extracted ion chromatogram

第1章 序論

第1節 序

放線菌や真菌などの微生物は多種多様な骨格及び生物活性を有する天然化合物の宝庫であり、天然物及びその誘導体から多くの臨床医薬が見出されている[1]。また、微生物から単離された生理活性物質の約半数は放線菌により生産されている[2]。近年、既知化合物の再単離などによる新規化合物取得の効率性が低下しているが、DNA シークエンス技術の向上により多くの微生物のゲノム配列解析が行われた結果、多様な二次代謝生合成遺伝子クラスターの存在が明らかになっている。また、生合成遺伝子クラスターの多くは、通常の実験室での培養条件下では発現しないか、あるいは発現が微弱な休眠生合成遺伝子クラスターである。従って、未利用の遺伝子資源を化合物資源として活用するための技術開発はポストゲノム時代の中心的な解決議題である。

放線菌 *Streptomyces* 属は生活環の中で形態分化を示すが、これは二次代謝産物の生産と密接に関係している。一般的に、二次代謝産物生産は基底菌糸から気中菌糸が形成される移行期に開始される [3]。また、放線菌は周囲の環境変化を敏感に察知し、自身の生合成系を柔軟に調節することで生合成遺伝子発現を誘導することが知られている。例としてオートレギュレーター [4-6]、goadsporin [7]、 β -carboline [8, 9]、antibiotics remodeling 化合物[10]、希土類元素 ScCl_3 [11] などが挙げられ、様々な刺激に応じて二次代謝産物を生産することが報告されている。また、リボソームエンジニアリング [12]、ミコール酸含有細菌との共培養 [13] も新規代謝産物取得に利用されており、他には効率的に化合物の収率を上げる有効な手段として SARP [14-17] や LuxR [9, 18, 19] のような経路特異的転写制御因子の構成的発現が行われている。さらに、最適化された放線菌を宿主として利用し、最適なプロモーターや制御因子を用いて生合成遺伝子クラスター全長の遺伝子を異種発現する方法も報告されている [20-27]。所属する研究室で保有する *Streptomyces* sp. SN-593 においても [9]、これまでにゲノム解読されている他の放線菌 (*Streptomyces coelicolor* A3(2), *Saccharopolyspora erythraea* NRRL23338, *Salinispora tropica* CNB-440, *Streptomyces avermitilis* ATCC 31267, *Streptomyces griseus* IFO13350) [28] と同様に nonribosomal peptide synthetase (NRPS)、type I, II, III polyketide synthase (PKS)、テルペン生合成遺伝子クラスターが約30種類以上見出されている。しかしながら、本菌より単離された化合物は reveromycin A [29, 30] を始めとし、reveromycin T 1-methyl ester、reveromycin T 1-ethyl ester [31]、fraquinocin D, I, 及び J [17, 32] 6-dimethylallylindole-3-carbaldehyde [33]、alkyldihydropyrone A-D [34] (Fig. 1) などごく限られた数の化合物が単離され、遺伝子が同定されている。本研究では、これまで *Streptomyces* sp. SN-593 より単離された化合物の中でも、生産性が低いため遺伝子破壊後の評価が困難であり、生合成遺伝子クラスター同定に至っていない kinanthraquinone [35] (KQ) (Fig. 2) の生合成

遺伝子クラスターの同定を第一の目的とした。

第2章では、KQ生産評価に適した放線菌ホスト (*Streptomyces lividans* TK23 [36]) を用いて候補遺伝子クラスターを異種発現することにより、KQ生産に関わる未解明遺伝子クラスターの同定を行うとともに、制御因子の活用による生産性改善を目的とした。

第3章では、KQ生合成に関与する未知遺伝子の破壊により、生合成中間体を取得し、生合成経路を考察するとともに、蓄積する生合成中間体の生物活性を評価することを目的とした。

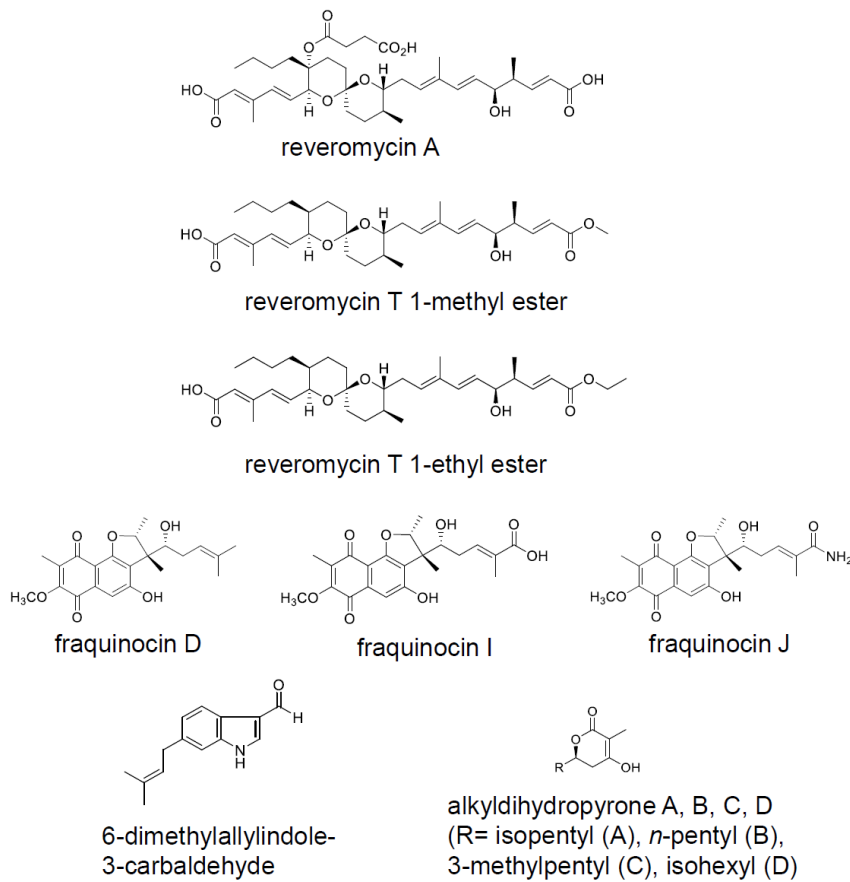


Fig. 1 *Streptomyces* sp. SN-593 より単離された二次代謝産物の構造

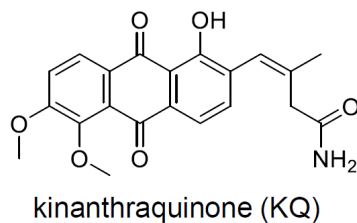


Fig. 2 Kinanthraquinone (KQ)の構造

第2章 Kinanthraquinone (KQ) 生合成遺伝子クラスターの同定

KQ は、*Streptomyces* sp. SN-593 より単離されたアントラキノン骨格を有する化合物である。類似の骨格を有する化合物は、抗悪性腫瘍剤である doxorubicin、epirubicin、amrubicin など様々な医薬品として用いられており、これらは特徴的な 4 環性骨格を有するアントラサイクリンである。KQ のようなアントラキノン骨格は、アングサイクノンを経由し、その後の開環反応により生合成されると考えられる (Fig. 2)。KQ 生合成遺伝子クラスターを明らかにし、機能未知の遺伝子を取得することは、新規天然化合物の取得に繋がる可能性がある。KQ は、遺伝子操作が困難な *Streptomyces reveromyceticus* SN-593-44 からの単離されたものであり生産性も低い。野生株の *Streptomyces* sp. SN-593 は、通常培養条件下では KQ は非生産である。そこで、本章では、*Streptomyces* sp. SN-593 ゲノム解読情報を利用して、KQ 生合成に関わる遺伝子クラスターを取得し、*S. lividans* TK23 で異種発現することによって、目的遺伝子クラスターを同定する。さらに、転写制御因子のプロモーター交換による生産効率改善によって、新規類縁体の取得することを目的とした。

第1節 KQ 生合成遺伝子クラスターの探索

KQ 生産菌である *Streptomyces* sp. SN-593 のゲノム中には、NRPS、type I, II, III PKS、テルペン生合成遺伝子クラスターが約 30 種類見出されている (Fig. 3) [9]。これら約 30 の生合成遺伝子クラスター中から、KQ 生合成に関わる遺伝子の候補を絞り込むために、第一に KQ の化学構造に着目した (Fig. 2)。ポリケチド骨格形成には、erythromycin などのマクロライド化合物や真核生物由来の脂肪酸合成酵素などモジュール型の type I PKS、doxorubicin のような多環性芳香族化合物を合成する type II PKS、chalcone や 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (THN) を合成する type III PKS による生合成機構が知られている [37] (Fig. 4)。

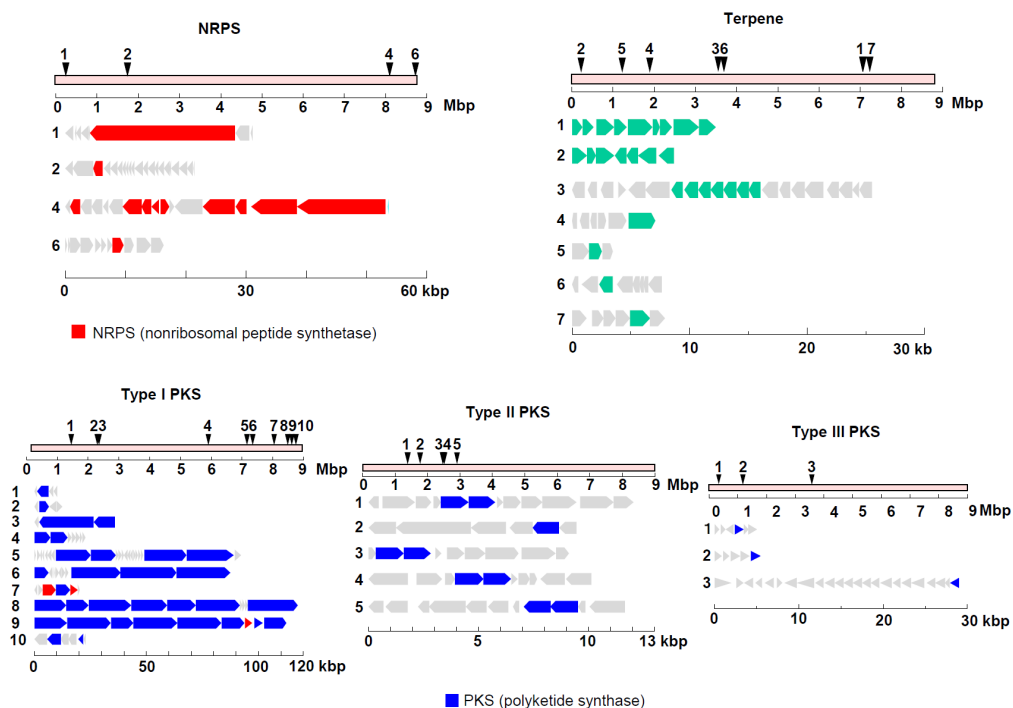


Fig. 3 *Streptomyces* sp. SN-593 ゲノム配列中に見出された
二次代謝産物生成遺伝子クラスター

KQ 構造から、type II PKS により合成されることを予想し、*Streptomyces* sp. SN-593 のゲノム中に存在する 5 つの候補クラスター (type II PKS-1~5) (Fig. 3) に注目した。また、クラスター探索にあたり、アングサイクリン系化合物である grincamycin (GCN, *gcn*) 生合成に着目した [38]。実際に、GCN 生合成過程で、D 環が開裂したシャント化合物が取得されていることから (Fig. 5A)、類似の生合成遺伝子クラスターの存在を予想し、遺伝子構成の比較を行った。その結果、type II PKS-3 クラスターでは、ポリケチド合成に必須の最小単位 (KS_{α} , KS_{β} , ACP)、芳香環形成に関わる遺伝子群、制御因子、酸化修飾酵素群、rhodnose 生合成遺伝子群、糖転移酵素、その他未知遺伝子との相同性が確認できた (Fig. 5B)。さらに、KQ 構造中 (Fig. 2) の 2 つのメトキシ基形成に関わると予想される 2 つの *O*-methyltransferase が存在することから、KQ 生合成への関与が強く示唆された (Table 1, 2)。

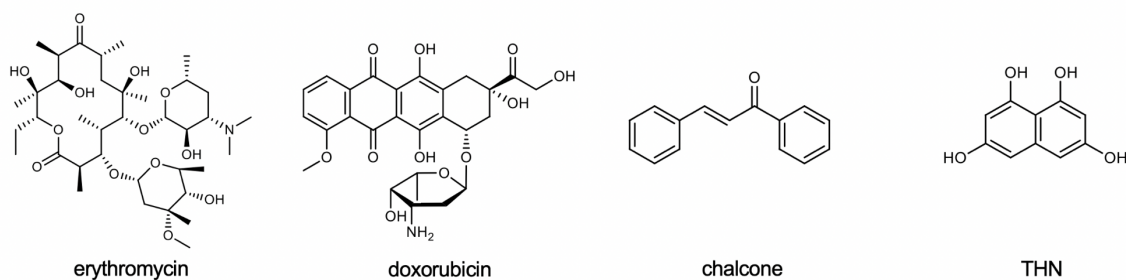


Fig. 4 Erythromycin、doxorubicin、chalcone 及び THN の化学構造

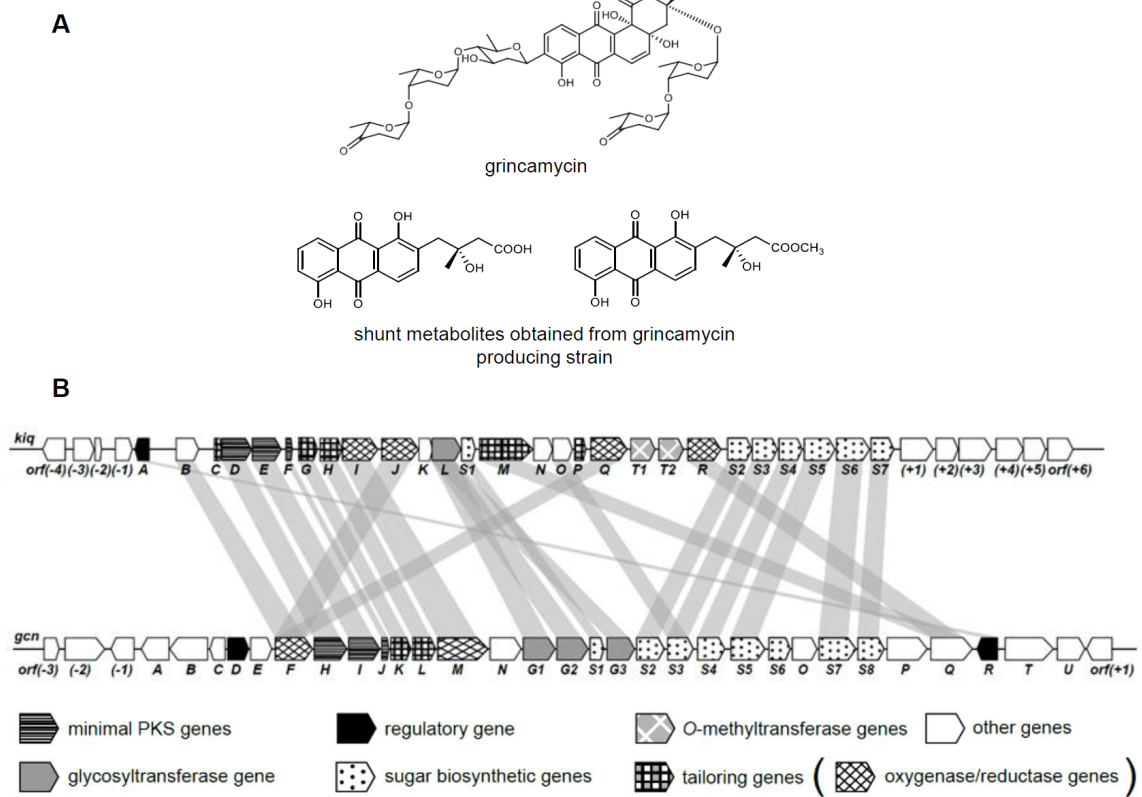


Fig. 5 *Streptomyces lusitanus* SCSIO LR32 により生産される二次代謝産物 (A)、候補の type II PKS-3 遺伝子クラスター (上段) と *gcn* 遺伝子クラスター (下段) の遺伝子構成の比較 (B) (Table 1, 2)

Table 1 KQ 生合成遺伝子クラスターの機能アノテーション

Orf	Protein size (amino acids)	Putative function	Best blast hit [species]	Identity/similarity (%)	Accession number
<i>orf</i> (-4)	325	putative integral membrane protein	Uncharacterized membrane protein STKORF319 [Streptomyces leuvenhoekii]	81/88	CQR60365
<i>orf</i> (-3)	287	putative carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase	carboxyvinyl-carboxyphosphonate phosphorylmutase [Streptomyces showdoensis]	87/92	WP_046906632
<i>orf</i> (-2)	97	hypothetical protein	hypothetical protein [Streptomyces misionensis]	68/78	WP_146466047.1
<i>orf</i> (-1)	250	putative hydrolase	dienelactone hydrolase family protein [Streptomyces antioxidans]	75/85	WP_046088292
<i>kiqA</i>	218	DNA-binding response regulator OmpR family	DNA-binding response regulator [Streptomyces bicolor]	60/77	WP_031478691
<i>kiqB</i>	322	hypothetical protein	hypothetical protein [Streptomyces sp. NBRC 109706]	57/64	WP_062214984
<i>kiqC</i>	108	putative cyclase	type II polyketide cyclase [Streptomyces sp. MJM1172]	90/92	WP_073775778
<i>kiqD</i>	426	putative β -ketoacyl synthase	β -ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase II [Streptomyces sp. MJM1172]	91/95	WP_073775776
<i>kiqE</i>	409	putative chain length factor	type II polyketide synthase 1 [Streptomyces sp.]	88/91	APD71655
<i>kiqF</i>	89	putative acyl carrier protein	actinorhodin polyketide synthase [Streptomyces sp. MJM1172]	85/89	WP_073775772
<i>kiqG</i>	261	putative ketoreductase	putative ketoreductase [Streptomyces fradiae]	87/92	CAA60572.1
<i>kiqH</i>	311	putative aromatase	cyclase [Streptomyces sp. MJM1172]	83/89	WP_073775768
<i>kiqI</i>	501	putative oxygenase	oxidoreductase [Streptomyces sp. MJM1172]	75/80	WP_073775766
<i>kiqJ</i>	514	putative oxygenase	monooxygenase [Streptomyces sp. MJM1172]	79/84	WP_073775764
<i>kiqK</i>	193	hypothetical protein	nuclear transport factor 2 family protein [Streptomyces sp. MJM1172]	67/71	WP_073775762.1
<i>kiqL</i>	423	putative glycosyltransferase	DUF1205 domain-containing protein [Streptomyces sp. HNM0575]	77/87	WP_169136283.1
<i>kiqS1</i>	191	putative NDP-hexose 3, 5-epimerase	dTDP-4-dehydrohannose 3,5-epimerase family protein [Streptomyces sp. HNM0575]	87/92	WP_169136284.1
<i>kiqM</i>	754	putative FAD/FMN-containing dehydrogenase	acyl-CoA dehydrogenase family protein [Thermobifida fusca]	56/66	WP_016188553
<i>kiqN</i>	276	hypothetical protein	hypothetical protein [Thermobifida fusca]	60/75	WP_011291682
<i>kiqO</i>	274	hypothetical protein	hypothetical protein [Microbispora sp. ATCC PTA-5024]	51/64	WP_036332644
<i>kiqP</i>	162	putative flavin-dependent reductase	Monooxygenase [Streptomyces caatingaensis]	64/75	WP_049714284
<i>kiqQ</i>	508	putative monooxygenase	hypothetical protein [Streptomyces sp. MJM1172]	78/84	WP_073775743
<i>kiqT1</i>	352	putative O-methyltransferase	methyltransferase [Streptomyces erythrochromogenes]	55/67	WP_051892796
<i>kiqT2</i>	348	putative O-methyltransferase	methyltransferase [Streptomyces sp. NRRL B-1347]	65/76	WP_030669557
<i>kiqR</i>	462	putative FAD-dependent oxygenase	FAD linked oxidase domain containing protein [Streptomyces sp. Mg1]	78/87	EDX26492
<i>kiqS2</i>	355	putative dNDP-glucose synthetase	glucose-1-phosphate thymidyltransferase [Streptomyces nodosus]	82/88	WP_043445922
<i>kiqS3</i>	345	putative dNDP-glucose 4,6-dehydratase	dTDP-glucose 4,6-dehydratase [Streptomyces sp. NRRL F-5122]	86/92	WP_059130326
<i>kiqS4</i>	333	putative NDP-hexose 4-ketoreductase	hypothetical protein [Streptomyces sp. NRRL F-5122]	66/76	WP_059130327
<i>kiqS5</i>	434	putative NDP-hexose 3,4-dehydratase	lipopolysaccharide biosynthesis protein RfbH [Streptomyces sp. NRRL F-5122]	85/92	WP_059130328
<i>kiqS6</i>	469	putative NDP-hexose 2,3-dehydratase	NDP-hexose 2,3-dehydratase [Streptomyces niveus]	82/87	WP_023542155
<i>kiqS7</i>	319	putative NDP-hexose 3-ketoreductase	putative dNDP-hexose 3-ketoreductase [Streptomyces sp. SCC 2136]	71/78	CAF31369
<i>orf</i> (+1)	460	putative TMC biosynthetic enzyme L1	putative type B carboxylesterase [Streptomyces spiroverticillatus]	57/69	ABW96543
<i>orf</i> (+2)	320	putative cyclase	putative cyclase [Streptomyces spiroverticillatus]	79/86	ABW96551
<i>orf</i> (+3)	472	putative MmgE/Prp family protein	putative MmgE/PrpD family protein [Streptomyces griseochromogenes]	76/83	ABV91303
<i>orf</i> (+4)	396	putative TMC biosynthetic enzyme L2	TMC biosynthetic enzyme L2 [Streptomyces sp. CK4412]	77/86	AB194377
<i>orf</i> (+5)	291	putative citrate lyase beta chain	probable citrate lyase beta subunit [Streptomyces spiroverticillatus]	71/79	ABW96547
<i>orf</i> (+6)	368	putative TMC biosynthetic enzyme L4	AMP-binding protein [Nocardia terpenica]	73/84	AJO72728

Table 2 KQ 及び GCN 生合成に関わる酵素遺伝子との相同性

Proteins/enzymes for the biosynthesis of		Identity/similarity (%)
KQ	GCN	
KiqA	GcnR	54/70
KiqB	GcnE	58/71
KiqD	GcnH	88/93
KiqE	GcnI	80/87
KiqF	GcnJ	80/91
KiqG	GcnK	86/92
KiqH	GcnL	77/86
KiqI	GcnM	63/73
KiqJ	GcnF	65/73
KiqL	GcnG1	45/61
	GcnG2	33/47
	GcnG3	28/44
KiqS1	GcnS1	75/82
KiqM	GcnQ	48/59
KiqO	GcnS3	41/47
KiqQ	GcnF	45/57
KiqR	GcnQ	35/45
KiqS2	GcnS2	82/88
KiqS3	GcnS3	84/89
KiqS4	GcnS4	64/73
KiqS5	GcnS5	83/91
KiqS6	GcnS7	78/87
KiqS7	GcnS8	70/75

第2節 異種発現ベクターの構築及び形質転換株の解析

gcn 遺伝子クラスターとの相同性が確認された約 32 kb の領域には、KQ 構造に存在するアミド生合成に関与すると予想される遺伝子が見出されなかった。そこで、前後約 5 kb の未知生合成遺伝子を含む領域を含めた約 43 kb の領域のクローニングを行うことにした。また、コスミドベクターを用いたクローニングが困難であるため、研究室で構築されていた BAC クローンライブラリーのスクリーニングを行い、目的とする遺伝子全長を含む BAC クローン (*Escherichia coli* NEB10-β/pKU503_21E1) を取得した。続いて、放線菌異種発現ベクターである pKU592*Aac(3)IV* [24] を用い、λ-Red 組み換えにより 43 kb の領域を含む pKU592*aac(3)IV::kiq1* を構築した。プロトプラスト法により構築した異種発現ベクターを *S. lividans* TK23 に導入した。得られた形質転換株を培養後、代謝産物を抽出し、UPLC/MS 解析を行った結果、KQ 生産を確認した。さらに、KQ 生合成を担う *kiq* 遺伝子の境界領域を評価するため、*gcn* 遺伝子クラスターと高い相同性が確認された約 32 kb 領域のみを最小化クローニングした (pKU592*aac(3)IV::kiq2*)。同様に、プロトプラスト法により *S. lividans* TK23 に導入し、得られた形質転換体を培養、抽出、UPLC/MS 解析を行った結果、KQ 及び KQ 類縁体の生産を確認した (Fig. 6)。

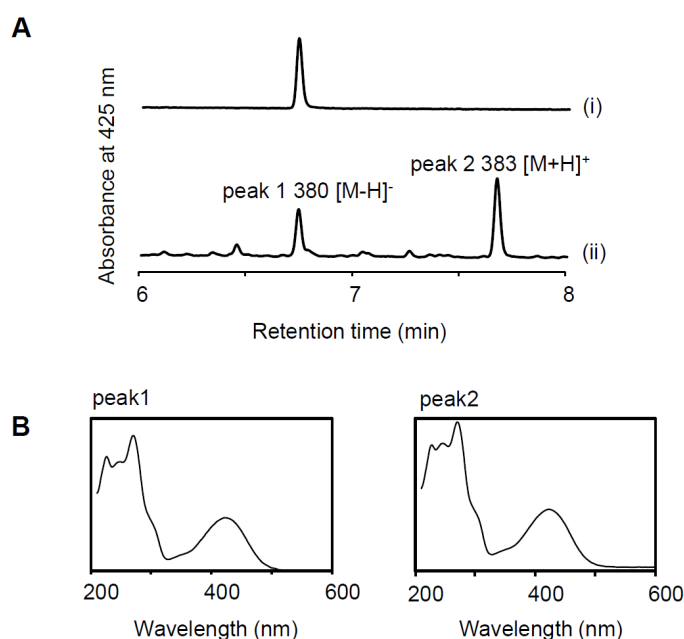


Fig. 6 *kiq2* 遺伝子クラスターの *S. lividans* TK23 異種発現
(A) UPLC クロマトグラム、KQ 標準品 (i)、
S. lividans TK23/pKU592*aac(3)IV::kiq2* (ii)、
(B) Peak 1 (KQ) 及び peak 2 の UV スペクトル

第3節 *kigG* 遺伝子破壊株の解析

最小化 *kig* 遺伝子クラスター (*kig2*) が KQ 生産に関与する証拠を確固たるものにするために、生合成初期段階に関与し、芳香環形成に重要な酵素 (ketoreductase) をコードする *kigG* 遺伝子の破壊を行うことにした。下流の遺伝子発現に影響しないように、 λ -Red 及び FLP 組み換えを利用したインフレーム破壊を行った。次に、構築した異種発現ベクター (pKU592aac(3)IV::*kig2* Δ *kigG*) を *S. lividans* TK23 に導入した。得られた形質転換株を培養し、代謝産物を UPLC/MS 解析した結果、KQ 非生産であることを確認した。以上より、最小化 *kig2* 遺伝子クラスターは、KQ 及び KQ 類縁体の生合成に関与することが強く示唆された (Fig. 7)。

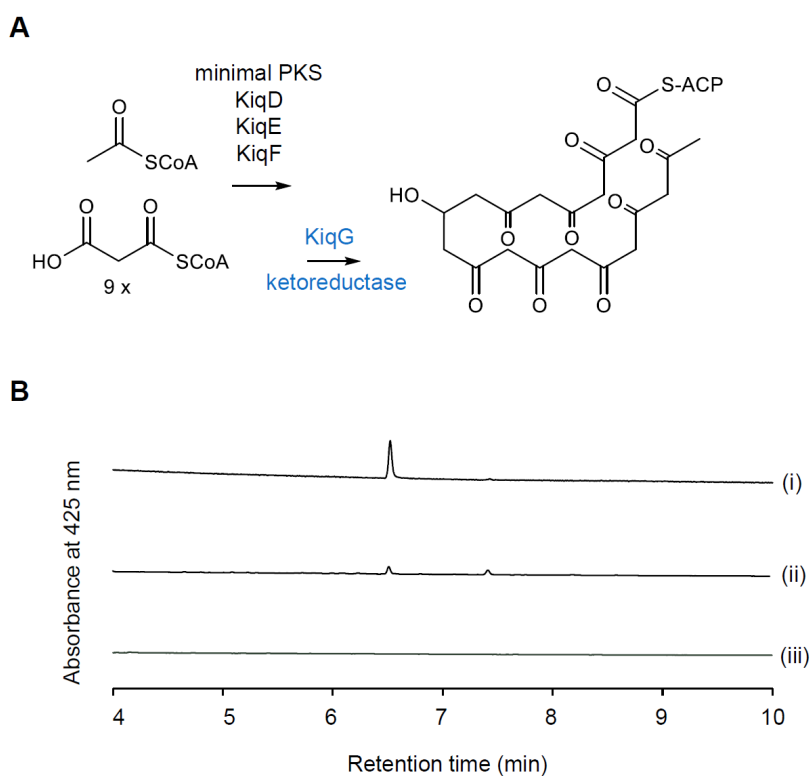


Fig. 7 *kigG* 遺伝子破壊株の解析

(A) KiqG による生合成の初期反応、(B) UPLC クロマトグラム、KQ 標準品 (i)、*S. lividans* TK23/pKU592aac(3)IV::*kig2* (ii)、*S. lividans* TK23/pKU592aac(3)IV::*kig2* Δ *kigG* (iii)

第4節 非典型 OmpR ファミリー制御因子遺伝子

kiq 遺伝子クラスターの *S. lividans* TK23 異種発現によって KQ と同時に生産される KQ 類縁体を見出し、単離精製と構造決定を試みたが、低生産のため化合物取得には至らなかった。二次代謝生合成遺伝子群の機能解析、類縁化合物の取得、および生物活性評価のためには、生産性の改善が重要な課題である。そこで、生合成遺伝子クラスター生産制御に関わる転写制御因子の探索を行った。最小化 *kiq* 遺伝子クラスター (*kiq2*) の配列 (*kiqA*-*kiqU6*, *Streptomyces* sp. SN-593 2,514,318-2,546,247 nt) [9] を用いて antiSMASH (<https://antismash.secondarymetabolites.org/>) 検索を行った結果、アングサイクリン抗生物質の生合成遺伝子クラスターの一部を見出した。この中には非典型 OmpR ファミリーである JadR1 及び Aur1P と相同性を有する転写制御因子が共通して存在することが明らかになった (Fig. 8)。また、OmpR ファミリー転写制御因子群のアミノ酸配列の比較および系統解析の結果、*kiq* 遺伝子クラスターからは非典型 OmpR としての機能が予想される *kiqA* 遺伝子を見出した (Fig. S20, 21)。

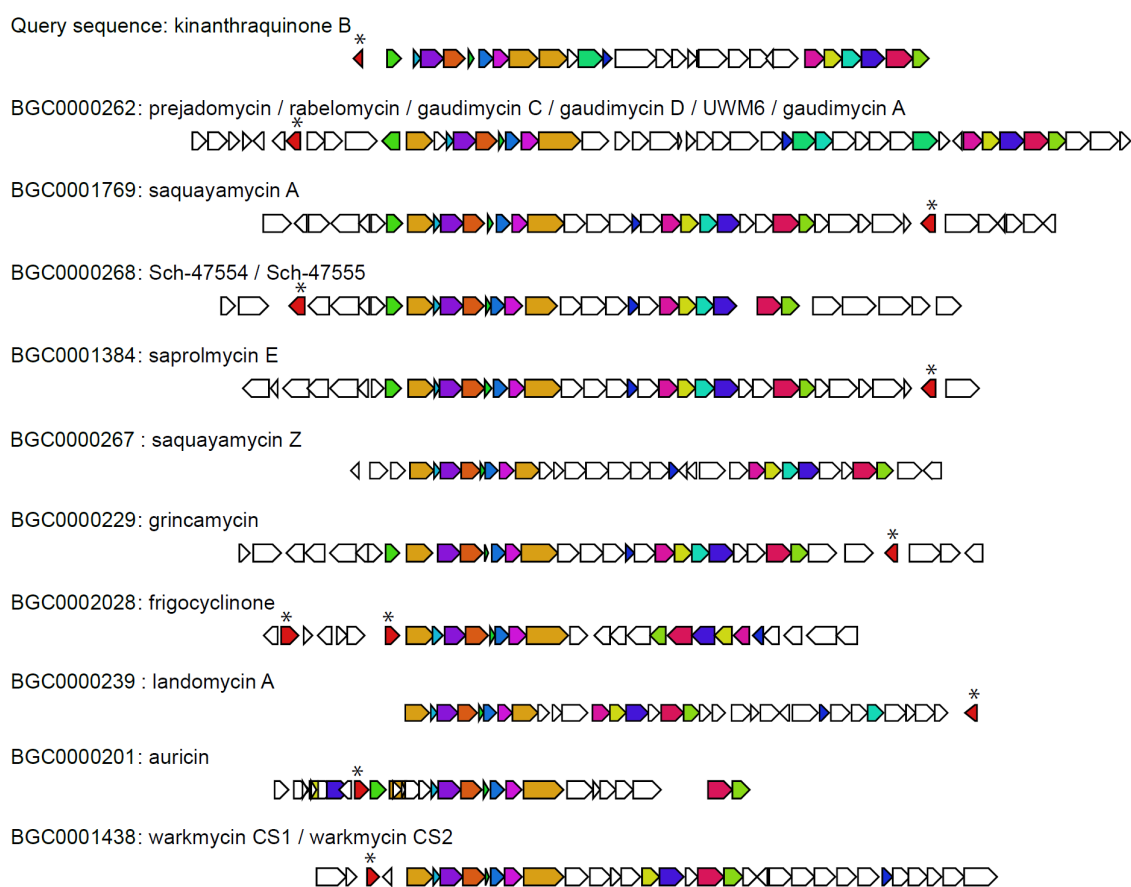


Fig. 8 antiSMASH による遺伝子構成の比較

*非典型 OmpR ファミリー転写制御因子遺伝子

OmpR ファミリー転写制御因子は、センサーとなる histidine kinase と応答制御因子 2 つのタンパク質で構成された二成分情報伝達系の転写調節因子であり、1981 年に *Escherichia coli* K-12 より見出された [39]。センサーキナーゼは多くの場合、細胞質膜に存在しており、環境刺激を察知し、その情報は His-Asp リン酸化により細胞内の応答制御因子に伝達され、下流の遺伝子発現を調節する [40]。放線菌では、典型的な OmpR ファミリー転写制御因子とは異なり、リン酸化による制御を受けない非典型タイプが報告されている。Jadomycin および auricin 生合成遺伝子クラスターより見いだされた正の制御因子 JadR1 及び Aur1P は負の制御因子として報告されている TetR 型調節因子である JadR2/JadR* と Aur1R と協調して生合成遺伝子クラスターを制御している。

第5節 *kiqA* 遺伝子発現による KQ 類縁体の生産性改善

第一に *kiq* 遺伝子クラスター制御に関わる *kiqA* の役割を解明するため、*kiqA* 遺伝子を破壊した異種発現ベクター (*pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqA*) を構築した。これを *S. lividans* TK23 に導入し、得られた形質転換体が生産する代謝産物を解析した結果、形質転換体は KQ 非生産となることが確認された (Fig. 9)。これより、*kiqA* 遺伝子発現誘導が KQ および KQ 類縁体の生産に及ぼす影響を評価するため、*kiqA* 遺伝子上流に *sav2794* プロモーター [24] を連結したベクターを構築し (*pTYM19::sav2794p-kiqA*)、最小化 *kiq* 遺伝子クラスター (*kiq2*) と共発現を行った (Fig. 9)。得られた形質転換体の培養、抽出、UPLC/MS 分析を行った結果、KQ は約 6 倍、KQ 類縁体は約 10 倍生産性が向上することが判明した (Fig. 9)。

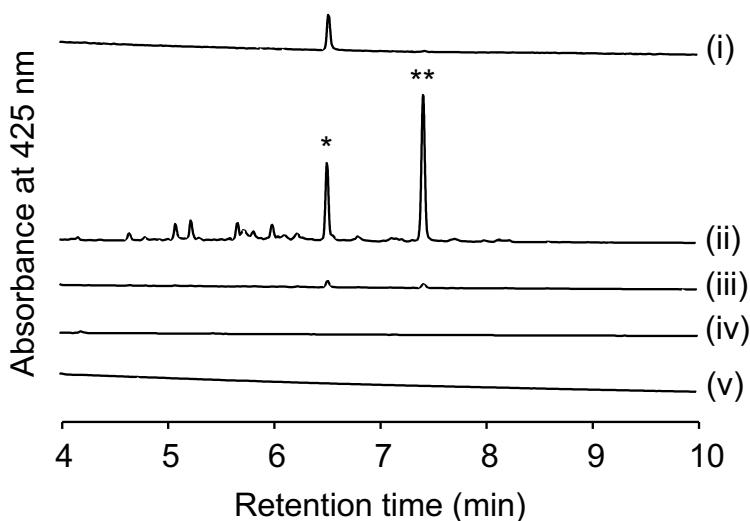


Fig. 9 *S. lividans* TK23 異種発現による *kiqA* 遺伝子の機能解析

UPLC クロマトグラム、* KQ、**KQ 類縁体

KQ 標準品 (i)、

S. lividans TK23/*pKU592aac(3)IV::kiq2/pTYM19::sav2794p-kiqA* (ii)、

S. lividans TK23/*pKU592aac(3)IV::kiq2* (iii)、

S. lividans TK23/*pKU592aac(3)IV::kiq2 ΔkiqA* (iv)、

S. lividans TK23/*pKU592aac(3)IV* (v)

第6節 KQ 類縁体の構造決定

第5節の結果をもとに、pTYM19::sav2794p-kiqA および *kiq2* の共発現株を用いて、スケールアップ培養による KQ 類縁体の単離精製を試みた。その結果、KQ 類縁体は HRESIMS より分子量 382、分子式 $C_{21}H_{18}O_7$ (found: m/z 383.1120 $[M+H]^+$, calculated for $C_{21}H_{19}O_7$ 383.1125) であると示唆され、KQB の UV スペクトルは、226、250、269、415 nm に極大吸収を示し、IR は、3390、1664、1628、1576、1485、1423、1365、1323、1250、1068、993、777、741 cm^{-1} にスペクトルが観測された (Table 3)。また、KQ 類縁体は KQ に類似した UV スペクトルを示したことから、アントラキノン骨格 (Fig. 10 A) を有することが示唆された。さらに、IR スペクトルより、ヒドロキシ基 (3390 cm^{-1}) 及びカルボニル基 ($1664, 1628\text{ cm}^{-1}$) の存在が示唆され、KQ の分子式 ($C_{21}H_{19}NO_6$) との比較より (Table 3)、KQ 類縁体は KQ のアミド基がカルボキシ基に変換された化合物であることが示唆された。

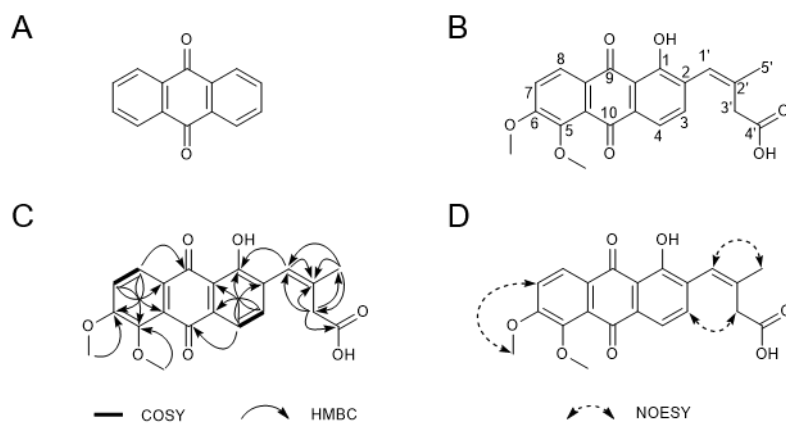
KQ 類縁体の詳細な化学構造は、1D 及び 2D-NMR 解析により決定した。また、 1H -NMR 及び ^{13}C -NMR により得られたケミカルシフト値を Table 4 にまとめた。 1H -NMR より、4つの芳香族メチンのシグナル (δ_H 8.06, 7.71, 7.61, 7.55)、オレフィンメチンシグナル (δ_H 6.48)、2つのメトキシシグナル (δ_H 3.97, 3.81)、メチレンシグナル (δ_H 3.10)、そしてシングレットのメチルシグナル (δ_H 1.98) が観測された。 ^{13}C -NMR 及び HSQC 解析により、21個のカーボンシグナルの存在は明らかになった。そして、21個のカーボンシグナルは、3つのカルボニル、14個の芳香族もしくはオレフィン炭素、2つのメトキシ炭素、メチレン炭素そしてメチル炭素に分類された。 1H - 1H COSY 相関より、H-3 と H-4 及び H-7 と H-8 の繋がりを決定した。加えて、カップリング定数は $J_{H-3,4}=8.5\text{ Hz}$ と $J_{H-7,8}=7.3\text{ Hz}$ であり、それぞれオルトカップリングしていることが明らかになった。続いて、 1H - ^{13}C HMBC 相関が H-3 から C-1 と C-2 へ、H-4 から C-4a、C-9a と C-10 のケトンの炭素へ、H-7 から C-5 と C-8a へ、H-8 から C-6、C-10a と C-9 のケトンの炭素へ観測できたことより、アントラキノン骨格 (Fig. 10 A) の存在を明らかにした。また、2つのメトキシ基は HMBC 相関が 5-OMe と H-7 から C-5 へ観測できたこと、及び 6-OMe と H-8 から C-6 へ観測できたことより、H-7 と H-8 を有するベンゼン環側に存在することが明らかになった。さらに、NOESY 相関が 6-OMe と H-7 間で観測されたことより、2つのメトキシ基の位置を決定した (Fig 10 B, C, D)。次に、ヒドロキシ基の位置は、C-1 の ^{13}C -NMR のケミカルシフト値が 159.1 ppm を示したこと、及びカルボニル基とヒドロキシ基の水素結合により、C-9 のケミカルシフト値が低磁場シフトしたことより明らかになった (Table 4)。側鎖は、 H_2 -3'から C-1'、C-2'、C-4' と C-5' 及び H_3 -5'から C-1'、C-2' と C-3' への HMBC 相関が確認できたことより決定した。C-2 と側鎖の結合は、これまでの解析から得られた部分骨格と H-3 と H-3' 間の NOESY 相関、そして H-1' から C-1 への HMBC 相関により決定した (Fig 10 C, D)。最後に、C-1' と C-2' の幾何異性は H-1' と H-5' 間の NOESY 相関により Z 体であると決定した (Fig. 10 D)。

以上の解析より、KQ 類縁体は、新規化合物であることが明らかになり、kinanthraquinone B

(KQB) と名付けた (Fig. 10 B)。

Table 3 KQ 及び KQ 類縁体の物理化学データの比較

	KQ 類縁体	KQ
Appearance	Yellow amorphous	Orange needles
Molecular formula	C ₂₁ H ₁₈ O ₇	C ₂₁ H ₁₉ NO ₆
Molecular weight	382	381
HRESIMS (<i>m/z</i>)	Found:383.1120 [M+H] ⁺ Calcd: 383.1125 [M+H] ⁺	Found: 380.11117 [M-H] ⁻ Calcd: 380.11341 [M-H] ⁻
UV λ _{max} nm (log ε) (MeOH)	226 (4.30), 250 (4.26), 269 (4.32), 415 (3.89)	226 (4.02), 247 (4.00), 305 (sh、 3.58), 420 (3.66)
IR (ATR) ν _{max} (cm ⁻¹)	3390, 1664, 1628, 1576, 1485, 1423, 1365, 1323, 1250, 1068, 993, 777, 741	3419, 2915, 2850, 1733, 1660, 1623, 1560, 1457, 1413, 1365, 1276, 1253, 1195, 1072, 781



**Fig. 10 (A) アントラキノン骨格、(B) KQB の化学構造、
(C) KQB の COSY 及び HMBC 相関、(D) KQB の NOESY 相関**

Table 4 KQB のケミカルシフト値 (DMSO-*d*₆)

<i>Position</i>	δ_C	<i>mult.</i>	δ_H (<i>int.</i> , <i>mult.</i> , <i>J</i> in Hz)	<i>HMBC</i>
1	159.1	C		
2	131.7	C		
3	135.7	CH	7.71 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	C-1, 4a
4	118.3	CH	7.61 (1H, d, <i>J</i> = 8.5 Hz)	C-2, 9a, 10
4a	133.0	C		
5	149.1	C		
6	159.5	C		
7	117.1	CH	7.55 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz)	C-5, 8a
8	124.9	CH	8.06 (1H, d, <i>J</i> = 7.3 Hz)	C-6, 9, 10a
8a	125.9	C		
9	187.5	C		
9a	114.9	C		
10	180.8	C		
10a	126.4	C		
1'	121.7	CH	6.48 (1H, s)	C-1, 2'
2'	135.8	C		
3'	38.6 ^a	CH ₂	3.10 (2H, s)	C-1', 2', 4', 5'
4'	172.1	C		
5'	24.6	CH ₃	1.98 (3H, s)	C-1', 2', 3'
5-OMe	60.5	CH ₃	3.81 (3H, s)	C-5
6-OMe	56.5	CH ₃	3.97 (3H, s)	C-6

1D ¹H and ¹³C data were collected at 500 and 125 MHz, respectively.

^aAssigned by HSQC spectroscopic data.

第7節 Feeding 実験による KQB から KQ への変換

KQB から KQ への変換に関わる遺伝子を検索するために、*kiq* 遺伝子クラスター (*kiq2*: 31,930 bp) について、既知の transamidase 反応を行う酵素 (PhzH, FdmV) [41, 42] との相同性を調べたが、アミド化に関与する遺伝子は存在しなかった。そこで、異種発現宿主 (*S. lividans* TK23) の内在酵素により KQB から KQ への変換が起こる可能性を検討した。*kiq2* 遺伝子を含まないベクターのみを導入した *S. lividans* TK23 を用いて、KQB の添加実験を行った。本培養 2 日目に、終濃度 0.05 mM の KQB を添加し、3 日目に培養液を回収、酢酸エチル抽出、UPLC/MS 分析を行った。その結果、24 時間以内に KQB から KQ への変換が確認できた (Fig. 11)。現在、*kiq* 遺伝子クラスター中の遺伝子が関与している可能性を完全に排除することはできないが、*S. lividans* TK23 の内在酵素により KQB から KQ への迅速な変換が行われていることが示唆された。

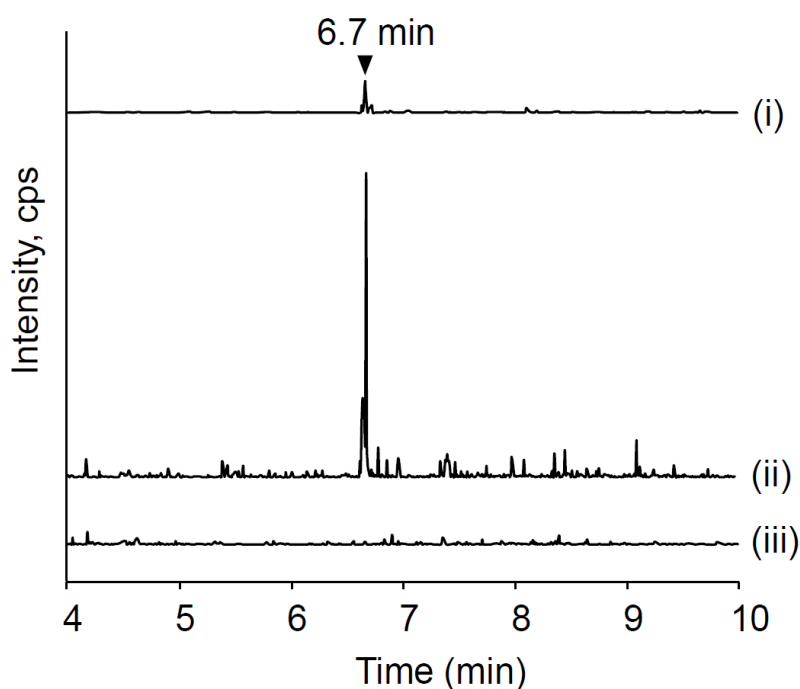


Fig. 11 *S. lividans* TK23 による KQB から KQ への変換

UPLC/MS 分析後の抽出イオンクロマトグラム

(KQ: m/z 379.6-380.6 [M-H]⁻)。

KQ 標準品 (i)、*S. lividans* TK23/pKU592aac(3)IV (KQB 添加) (ii)、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV (KQB 無添加) (iii)、

第8節 考察

本章では、*Streptomyces* sp. SN-593 のゲノム中より KQ 生合成に関わる遺伝子クラスターを同定するとともに、非典型 OmpR ファミリー制御因子遺伝子 (*kiqA*) を利用した KQ 生産性向上および蓄積した新規類縁体 (KQB) の単離・構造決定に成功した。また、異種発現ホストである *S. lividans* TK23 への feeding 実験により、KQB から KQ への迅速な変換が認められたことから、未知の内生酵素により変換が行われたことが示唆された。

非典型 OmpR ファミリー制御因子遺伝子 [43, 44] として見出された KiqA は、jadomycin および auricin 生合成遺伝子クラスターの正の制御因子として報告されている非典型応答制御因子 (JadR1 [45]、Aur1P [46]) (Fig. 8) とそれぞれ 60% および 57% のアミノ酸相同性を示すことが確認された。また、TetR 型調節因子である JadR2/JadR* および Aur1R は、それぞれ jadomycin、auricin 生合成遺伝子クラスターの負の制御因子として報告されている [47-50]。これに対し、*kiq* 遺伝子クラスターは、TetR 型の負の制御因子を欠損していることから、jadomycin、auricin 生合成遺伝子クラスターとは異なる制御機構を有することが示唆された。さらに、JadR1 [51]、Aur1P [52] は最終産物の結合によるフィードバック制御が報告されていることから、今後 KQ もしくは KQB の結合を介した KiqA による同様の制御についても検討する必要があると考察される。さらに、今回取得した antiSMASH 検索の結果より、*kiqA* と相同性を有する遺伝子がアングサイクリン生合成遺伝子クラスター内に共通して存在することが明らかになった。さらに、*kiqA* 遺伝子に *sav2794* プロモーター [24] を連結したベクターを構築し、最小化 *kiq* 遺伝子クラスター (*kiq2*) と共発現を行った結果、生合成中間体 (KQB) および最終産物 (KQ) の生産性が向上することが示された。以上より、アングサイクリン生合成遺伝子クラスターに共通して存在する非典型 OmpR ファミリー制御因子遺伝子の高発現により、他の放線菌ゲノム中に眠るアングサイクリン系生合成遺伝子クラスターの活性化が期待される。

第3章 KQ 生合成遺伝子クラスターの解析と新規化合物の生物活性評価

第2章では、候補遺伝子クラスターの異種発現によるKQ生産に成功し、必須遺伝子 (*kiqG*) 破壊株の解析により *kiq* 遺伝子クラスターを同定した。第3章では、同定した *kiq* 遺伝子クラスター中の機能未知遺伝子の破壊株に蓄積する新規生合成中間体を取得するとともに、その生物活性評価を行うことを目的とした。まず、*kiq* 遺伝子クラスターと *gcn* 遺伝子クラスターとの比較で機能未知の遺伝子に着目し (Fig. 5) (Table 1, 2)、遺伝子破壊、代謝産物の構造解析、生物活性評価を行うことにした。また、*gcn* 遺伝子クラスターとの遺伝子構成の比較から配糖化機構が予想されるが、代謝産物からは配糖化物が全く検出されていない。配糖化は生物活性と相関しており、水酸基はその足場として反応に重要である。そこで、メチル基転移酵素遺伝子の破壊と中間代謝産物の解析により、配糖化経路の検討を行うことにした。

第1節 遺伝子破壊と生合成中間体の解析

TypeII PKS の生合成経路では、 KS_{α} 、 KS_{β} および ACP による伸長反応後、環化反応によりポリケトメチレン鎖からアングサイクリン構造へ変換される。その後、アントラキノン骨格をもつ開環物の形成、酸化還元反応は未だ明らかにされていない (Fig. 12)。そこで、クラスター中に存在する機能未知遺伝子に着目した。タンパク質ファミリーデータベース情報サイトである Pfam 検索を行った結果、NAD(P)H 結合ドメインを有する *kiqO* 及び *kiqN* 遺伝子、FAD/FMN 結合領域を有する *kiqM* 遺伝子を見出した。そこで、上記3つの機能未知遺伝子を破壊しその代謝産物を解析することにした。

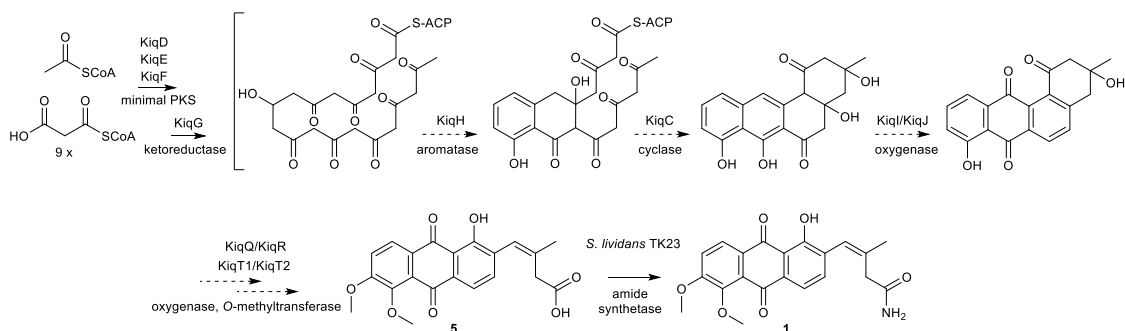


Fig. 12 遺伝子情報から推定される KQ 生合成経路

最小化 *kiq* 遺伝子クラスター (*kiq2*) 中の *kiqM*、*kiqN*、および *kiqO* 遺伝子を λ -Red 組み換えによるインフレーム破壊後、*S. lividans* TK23 に導入し、得られた形質転換体の代謝産物の解析を行った。その結果、*kiqM* および *kiqN* 遺伝子破壊株は代謝産物が検出されなかったが、*kiqO* 遺伝子破壊株では新たな代謝産物が蓄積していた (Fig. 13 A, peak1)。また、アントラキノン骨格特有の極大吸収波長とは異なる波長 (Fig. 13 B) を有することから、*kiqO* 遺伝子破壊株に蓄積する化合物の単離・構造決定を行った。

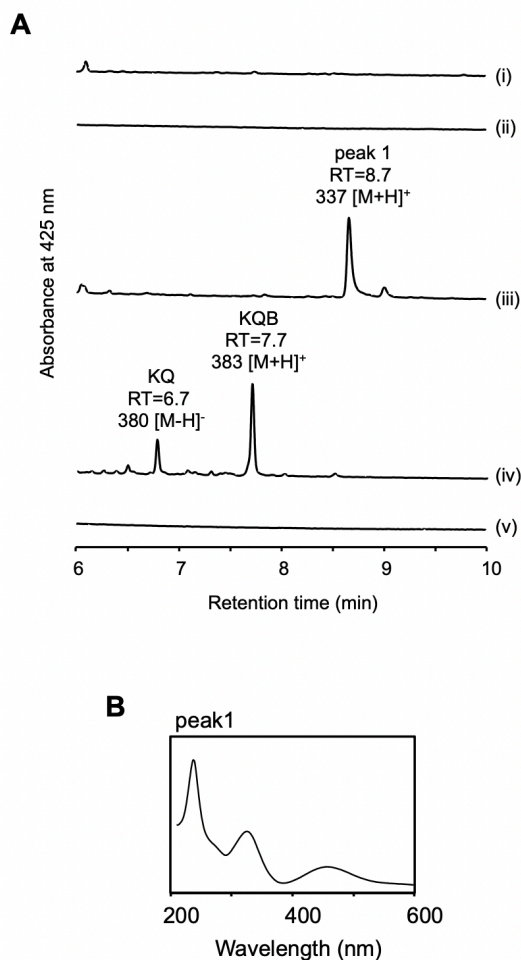


Fig. 13 *kiqO* 遺伝子破壊株 ($\Delta kiqO$) の代謝産物解析

(A) UPLC クロマトグラム、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2* $\Delta kiqM$ (i)

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2* $\Delta kiqN$ (ii)

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2* $\Delta kiqO$ (iii)、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2* (iv)、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV (v)、

(B) peak 1 の UV スペクトル

第2節 *kigO* 遺伝子破壊株に蓄積した化合物の単離・構造決定

kigO 遺伝子破壊株に蓄積した化合物は、HRESIMS より、分子量 336、分子式 $C_{19}H_{12}O_6$ (found: m/z 337.07074 $[M+H]^+$, calculated for $C_{19}H_{13}O_6$ 337.07067) であると示唆された。またこの化合物の UV-Vis スペクトルは、236、266sh、327、459 nm に極大吸収を示した。IR は、3194, 1603, 1576, 1541, 1458, 1304, 1277, 1227, 1163, 1149, 1070, 1030, 1005, 798, 779 cm^{-1} にスペクトルが観測され (Table 5)、IR スペクトルより、ヒドロキシ基の存在 (3194 cm^{-1}) と 2 つのカルボニル基の存在 (1603, 1576 cm^{-1}) が示唆された。

さらに、詳細な化学構造は 1D 及び 2D-NMR 解析により決定し、 1H -NMR 及び ^{13}C -NMR により得られたケミカルシフト値は、Table 6 にまとめた。 1H -NMR 解析より、5 つの芳香族メチン (δ_H 7.54, 7.54, 7.21, 7.11, 6.70) と 1 つのシングレットメチル (δ_H 2.36) の存在が明らかになり、 ^{13}C -NMR 解析により、19 個のカーボンシグナルの存在が明らかになった。19 個のカーボンシグナルは、2 つのカルボニル炭素、5 つのフェノール性水酸基を含む 16 個の芳香族炭素と 1 つのメチル炭素に分類された。ROESY 相関が H-2 と H₃-13 間及び H-4 と H₃-13 間でそれぞれ確認できたこと及び 1H - ^{13}C HMBC 相関が H₃-13 から C-2、C-3 そして C-4 へ確認できたことから、H-2 と H-4 は、メタ位に位置することが示唆された。さらに、HMBC 相関が H-2 から C-1、C-4 そして C-12b へ、H-4 から C-2、C-4a、C-12b そして C-13 へ確認できたことから、1 つの六員環の存在が明らかになった (Fig. 14 A)。次に、H-5 から C-6、C-6a そして C-12b へ、6-OH から C-5 と C-6 への HMBC 相関はもう 1 つの 6 員環の存在を示唆した。また、 1H -NMR 解析より、H-4 及び H-5 は、シングレットのプロトンであること、HMBC 相関が H-4 から C-5 へ、H-5 から C-4 へ相関を示したこと及び ROESY 相関が H-4 と H-5 間で観測されたことは 2 つの 6 員環が結合していることを示唆した。さらに、H-2、H-4 と H-5 から C-12b へ、H-4 から C-4a への HMBC 相関は、2 つ六員環が C-4a 及び C-12b で繋がっていることを明らかにした (Fig. 14 A, B)。 1H - 1H COSY 相関は、H-10 と H-11 の繋がりを決定した。また、カップリング定数は $J_{H-10,11}=8.3$ Hz を示したことから、H-10 と H-11 はオルソ位であることが明らかになった。さらに、HMBC 相関が H-10 から C-9、C-8 及び C-11a へ、H-11 から C-7a 及び C-9 へ、8-OH から C-7a へ観測されたことから、1 つの 6 員環の存在が明らかになった。続いて、H-11 からカルボニル炭素の C-12 へ観測された HMBC 相関は、この 6 員環が benzo[*a*]anthracene-7,12-dinone 骨格内のキノン部位と結合していることを明らかにした (Fig. 14 A)。

最後に、1 位、6 位、8 位及び 9 位の ^{13}C -NMR のケミカルシフト値が、それぞれ 154.7、155.4、149.8 及び 152.7 ppm を示したこと及び前述した HMBC 相関から、全てのフェノール性水酸基の位置を決定した (Fig. 14 A, Table 6)。以上の解析から、*kigO* 遺伝子破壊株に蓄積した化合物は、新規化合物 6,9-Dihydroxytetrangulol (6,9-DHT) であることが明らかになった (Fig. 15)。

Table 5 6,9-DHT の物理化学データ

6,9-DHT	
Appearance	Blue amorphous
Molecular formula	C ₁₉ H ₁₂ O ₆
Molecular weight	336
HRESIMS (<i>m/z</i>)	Found: 337.07074 [M+H] ⁺ Calcd: 337.07067 [M+H] ⁺
UV λ _{max} nm (log ε) (MeOH)	236 (4.11), 266 (sh, 3.95), 327 (3.90), 459 (3.43)
IR (ATR) ν _{max} (cm ⁻¹)	3194, 1603, 1576, 1541, 1458, 1304, 1277, 1227, 1163, 1149, 1070, 1030, 1005, 798, 779

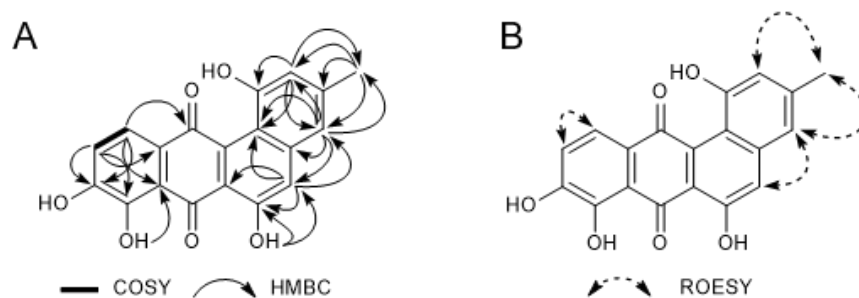


Fig. 14 (A) 6,9-DHT の COSY 及び HMBC 相関、(B) 6,9-DHT の ROESY 相関

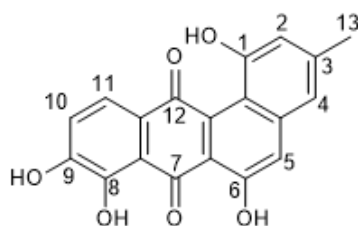


Fig. 15 6,9-DHT の化学構造

Table 6 6,9-DHT のケミカルシフト値 (DMSO-*d*₆)

<i>Position</i>	δ_C	<i>mult.</i>	δ_H (<i>int., mult., J in Hz</i>)	<i>HMBC</i>
1	154.7	C		
2	114.3	CH	6.70 (1H, s)	C-1, 4, 12b, 13
3	141.8	C		
4	117.6	CH	7.11 (1H, s)	C-2, 4a, 5, 12b, 13
4a	140.6	C		
5	118.8	CH	7.54 (1H, s)	C-4, 6, 6a, 12b
6	155.4	C		
6a	119.7	C		
7	192.4	C		
7a	115.5	C		
8	149.8	C		
9	152.7	C		
10	121.1	CH	7.21 (1H, d, <i>J</i> =8.3 Hz)	C-8, 9, 11a
11	121.6	CH	7.54 (1H, d, <i>J</i> =8.3 Hz)	C-7a, 9, 12
11a	125.7	C		
12	185.3	C		
12a	136.2	C		
12b	116.0	C		
13	21.2	CH ₃	2.36 (3H, s)	C-2, 3, 4
1-OH		OH	10.9 ^a (1H, br.s)	
6-OH		OH	11.8 (1H, s)	C-5, 6
8-OH		OH	10.6 (1H, s)	C-7a
9-OH		OH	11.6 ^a (1H, br.s)	

1D ¹H and ¹³C data were collected at 500 and 125 MHz, respectively.

^aExchangeable.

第3節 Feeding 実験による 6,9-DHT から KQ への変換

kiqO 遺伝子破壊により蓄積した 6,9-DHT は、アングサイクリン骨格を有する化合物であることが判明した。6,9-DHT が KQ 生合成中間体であることを検証するために、KQ 生合成初期段階の ketoreductase 反応に関与する *kiqG* 遺伝子破壊株を用いて、6,9-DHT の feeding 実験を行った (Fig. 16)。培養 2 日目に、終濃度 0.2 mM の 6,9-DHT を添加し、3 日目に培養液を回収、酢酸エチル抽出、UPLC/MS 分析を行った。その結果、24 時間以内に 6,9-DHT から KQ への変換が確認できた。以上のことから、6,9-DHT は KQ 生合成中間体であることが強く示唆された。

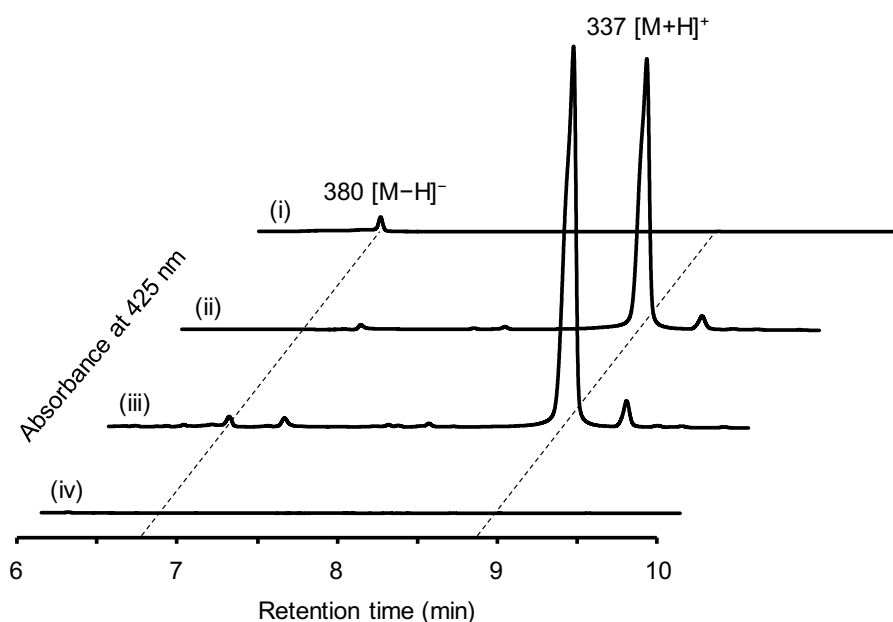


Fig. 16 *kiqG* 遺伝子破壊株による 6,9-DHT から KQ への変換
UPLC クロマトグラム、KQ 標準品 (i)、6,9-DHT 標準品 (ii)、
S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2ΔkiqG* (6,9-DHT 添加) (iii)、
S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2ΔkiqG* (6,9-DHT 無添加) (iv)

第4節 6,9-DHTの生物活性評価

6,9-DHTの有用性を検証するために、抗菌活性および動物細胞を用いた細胞毒性の評価を行った。その結果、*C. albicans* JCM1542に対し、中程度の活性を示すことが確認された。また、動物細胞、細菌および原虫に対しても広く毒性を示した。以上より、選択性の改善が課題として挙げられるものの、抗カンジダ物質としての可能性が示された (Table 7)。

Table 7 6,9-DHTの生物活性評価*

	6,9-DHT IC ₅₀ (μM)	PC** IC ₅₀ (μM)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1.9±0.5	5.9±0.3
<i>Escherichia coli</i>	>90	2.2±0
<i>Candida albicans</i>	1.1±0.1	0.028±0.007
<i>Plasmodium falciparum</i>	5.1±0.3	0.016±0.001

* データは3回の反復実験の平均値±SDを示す。

** ポジティブコントロール(PC)として、*S. aureus* および *E. coli* に対して chloramphenicol、*C. albicans* に対して amphotericin B そして *P. falciparum* に対して artemisinin を用いた。

	6,9-DHT IC ₅₀ (μM)	Taxol IC ₅₀ (nM)
HL-60	5.1±0	2.6±0.4
HeLa	12.5±3.3	1.8±0.2

第5節 配糖化経路の探索

kiq 遺伝子クラスター中には、rhodinose 生合成遺伝子群及び糖転移酵素遺伝子が存在しているが (Fig. 5 および Table 1,2)、生産菌及び異種発現株より配糖化産物は取得されていない。一般的に、配糖化は生物活性に重要であることが知られており、配糖化経路の探索は、さらなる生物活性化合物の取得に向けて重要な課題である。そこで、配糖化の足場となる水酸基形成が重要と考え、*O*-メチル基転移に関わると予想される各酵素遺伝子 (*kiqT1*, *kiqT2*) の破壊を行った (Fig. 17)。その結果、各破壊株で蓄積する代謝産物が確認できたが、この中から配糖化体を見出すことは出来なかった。両方の *O*-メチル基転移酵素遺伝子の破壊が、配糖化の前駆体として重要である可能性が考えられるが、二重遺伝子破壊株の作製は今後の課題である。また、*kiq* 遺伝子クラスター中の rhodinose 生合成遺伝子群の役割について理解するために、生合成への関連が予想される遺伝子 (*kiqS1*, *kiqS5*, *kiqS6*) の破壊を行った。その結果、KQ および KQB の生産性は維持されることが確認された (Fig. 18)。

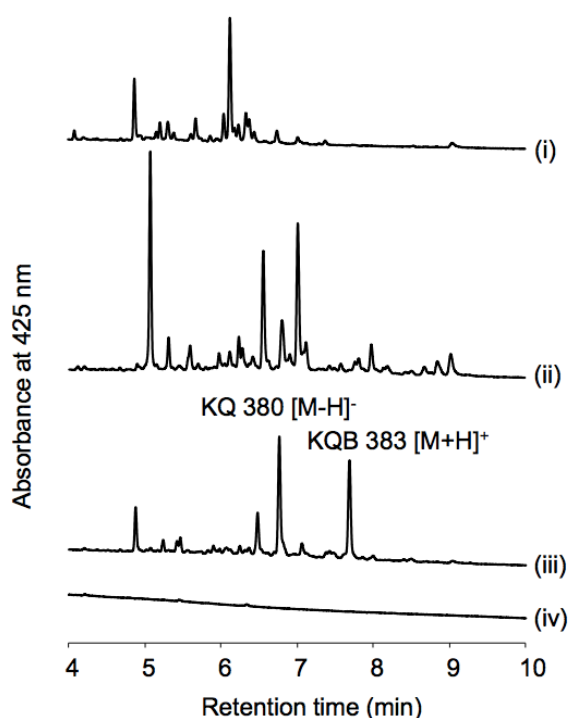


Fig. 17 メチル基転移酵素遺伝子破壊株の解析
UPLC/MS 分析後の UV クロマトグラム、
S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2ΔkiqT2* (i)、
S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2ΔkiqT1* (ii)、
S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2* (iii)、
S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV (iv)

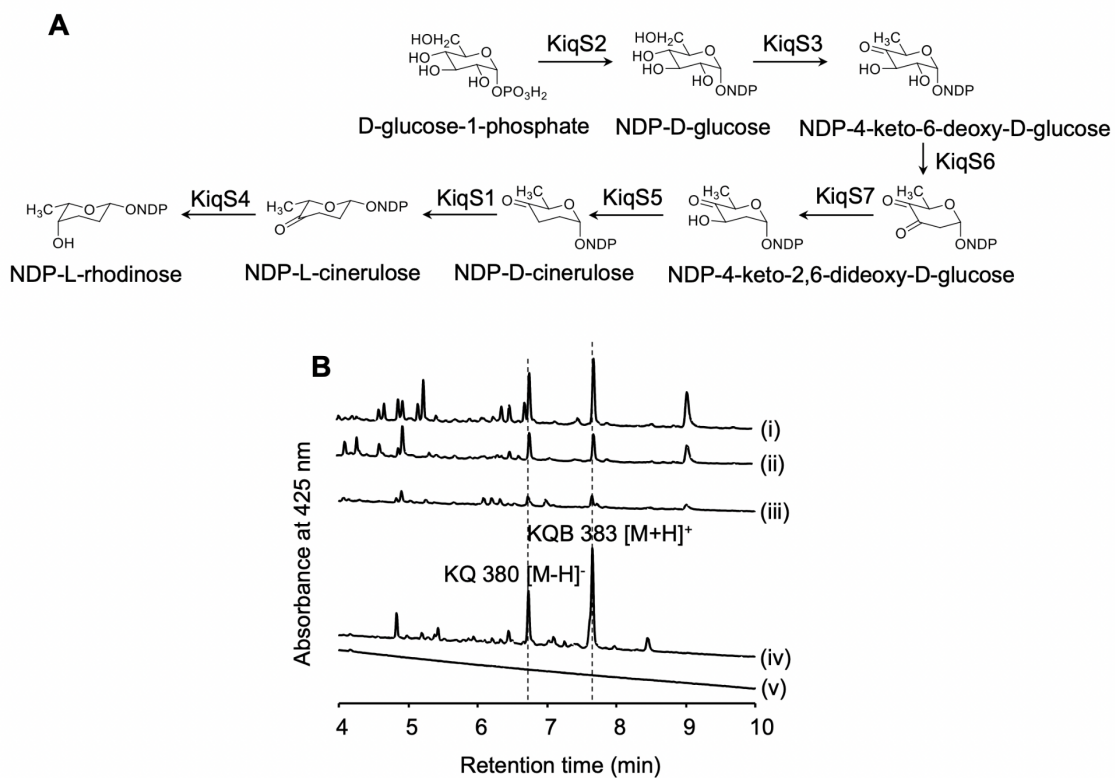


Fig. 18 Rhodinosyl-CoA 生合成遺伝子の破壊

(A) Rhodinosyl-CoA の予想生合成経路、

(B) *kiqS1*, *kiqS5*, *kiqS6* 遺伝子破壊株に蓄積する代謝産物の解析、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2ΔkiqS6* (i)、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2ΔkiqS5* (ii)、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2ΔkiqS1* (iii)、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::*kiq2* (iv)、

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV (v)、

第6節 考察

KQは3環構造のアントラキノン骨格を有している。同様の構造を有するmitoxantroneは抗悪性腫瘍剤として用いられているが、医薬品として用いられているアントラキノン系化合物の殆どは4環構造のアングサイクリン骨格を有している。また、アングサイクリン骨格を有する化合物は、抗菌活性を有することが知られている。*Mycobacterium smegmatis* ATCC607 および *Staphylococcus aureus* ATCC25923 に対して抗菌活性を示す rabelomycin [53]、*Micrococcus luteus* CMCC(B)28001 に対して抗菌活性を有する mayamycin B [54] などが報告されている。KQについては、HL-60 および HeLa 細胞、*Staphylococcus aureus* 209、*Escherichia coli* HO141、*Aspergillus fumigatus* Af293、*Pyricularia oryzae* kita-1、*Candida albicans* JCM1542 に対する活性評価が行われたが、顕著な生物活性は認められなかった [35]。このことから、アングサイクリン骨格を有する生合成中間体は、強い生物活性を示す化合物であると予想した。

アングサイクリン骨格及び開環したアントラキノン骨格 (シャント化合物) を生合成する *gcn* 遺伝子クラスターと *kiq* 遺伝子クラスターとの比較解析から、多くの遺伝子が相同性を有していることが確認された (21/27 遺伝子)。しかしながら、*kiq* 遺伝子クラスターからはアントラキノン骨格のみが生合成されるため、アングサイクリン骨格からアントラキノン骨格の変換に関与する機能未知の酵素遺伝子が *kiq* 遺伝子クラスター内に存在すると予想した。そこで、各アミノ酸配列を用いて BLAST 及び Pfam 検索を行い、機能未知の酵素のうち NAD(P)H 結合ドメインを有し、酸化還元反応を行うと推察される KiqO 及び KiqN、FAD/FMN 結合領域を有する KiqM に着目した。3つの遺伝子破壊株を解析したところ *kiqO* 遺伝子破壊株でのみ、代謝産物の蓄積を確認することが出来た。また、想定していたアングサイクリン骨格構造を有する生合成中間体 6,9-DHT であることが判明した。

アントラキノン系化合物の開環反応はこれまでに明らかにされていないが、開環反応の初期段階としてバイヤービリガー酸化が必要と予想している。現在、詳細なメカニズムは明らかになっていないが、KiqO が開環反応に関与するか否か、生化学的に解析することは今後の課題である。また、KQ 生合成初期段階に関与する *kiqG* 遺伝子破壊株を用いた 6,9-DHT の添加実験により 6,9-DHT は KQ 生合成中間体であることも示した。さらに、6,9-DHT の有用性を検証するために、抗菌活性および動物細胞を用いた細胞毒性評価を行った結果、抗カンジダ活性を見出した。以上の結果より、アングサイクリン骨格を有する新規生合成中間体の取得は、生物活性化合物の取得に有効な手段であることが示唆された。さらに、6,9-DHT は種々の細胞、菌に対しても広くに活性を示していることから (Table 7)、類縁体の取得による構造活性相関が今後の研究展開の鍵となる。

gcn 遺伝子クラスターとのゲノム比較解析により、*kiq* 遺伝子クラスター中には L-rhodinose 合成への関与が予想される遺伝子群の存在が確認されたが、配糖化された化合物の生産は確認できていない。これより、配糖化の足場となる水酸基形成が重要であると予想し、O-

メチル基転移酵素遺伝子 (*kiqT1*, *kiqT2*) をそれぞれ破壊し、蓄積する代謝産物を解析したが、配糖化された化合物は検出されなかった。このことから、両方の *O*-メチル基転移酵素遺伝子の破壊が、配糖化の前駆体として重要である可能性が考えられるため、二重遺伝子破壊株の作製は今後の課題である。また、一般に配糖化は生物活性の強化、溶解性の向上が知られているため、KQ および 6,9-DHT への糖付加研究は今後の展望である。

実験の部

・試薬

抗生物質

Ampicillin (Amp)、kanamycin (Kan)、及び chloramphenicol (Cm) は、NACALAI TESQUE, INC. (京都、日本) から購入した。Apramycin (Apr) 及び thiostrepton (Tsr) は、Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入した。

制限酵素

Takara Bio, Inc. (滋賀、日本) 及び New England BioLabs (MA, USA) から購入した。

・機器、溶媒

分析用の溶媒は、FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (大阪、日本) 及び JUNSEI (東京、日本) から購入した。UPLC/MS 分析は、API-3200 mass spectrometer (AB SCIEX) が接続された ACQUITY UPLC H-Class PLUS system (waters)、および ACQUITY QDa 検出器が接続された ACQUITY UPLC H-Class PLUS system を用いた。いずれの場合も ACQUITY UPLC BEH C18 カラム (2.1 i.d. × 50 mm、1.7 μm) (waters) を使用した。Medium-Pressure Liquid Chromatography (MPLC) 精製は、Teredyne ISCO CombiFlash Companion (Teredyne ISCO, Lincoln, NE, USA) を用いて行った。

KQB の分取 HPLC は、Waters 600E pump system を用い、カラムは PEGASIL ODS (20 i.d. × 250 mm、センシユール科学) を使用した。検出器は、Waters 2420 ELS Detector を用いた。6,9-DHT の分取 HPLC は、Waters 2535 Quaternary Gradient Module pump system を用い、カラムは PEGASIL ODS (20 i.d. × 250 mm、センシユール科学) を使用した。検出器は、Waters 2998 Photodiode Array Detector を用いた。

高分解能 ESIMS は、IMS Vion QToF system (waters) を用いて測定した。

NMR データは、ECA-500 spectrometer (JEOL) 及び ECA600 spectrometer (JEOL) を用いて測定した。¹H NMR 及び ¹³C NMR データの解析では、重 DMSO 中のそれぞれ残留する未重水素化溶媒及び重水素化溶媒に対する化学シフト値 (¹H: 2.48 ppm、¹³C: 39.5 ppm) を参照した。UV スペクトルは、JASCO V-630 BIO 分光光度計で測定した。IR スペクトルは、FT-IR フーリエ変換赤外分光光度計 FT-720 (HORIBA) と DuraSample IR II™ 装置で ATR 法により測定した。

・DNA 操作

大腸菌を用いた低コピープラスミド精製には、アルカリ SDS 法を用いた [55]。PCR 反応は、T100 thermal cycler (Bio-Rad) を用いた。目的の遺伝子クローニング及びコロニーPCR

には、それぞれ PrimeStar[®] HS DNA polymerase (Takara Bio, Inc.) 及び KOD-FX (TOYOBO) を使用した。PrimeStar[®]を用いた PCR 条件は、98°C 10 秒、58–68°C 10 秒、68°C 0.5–3.5 分、26–31 サイクルを繰り返して増幅後、68°C で 3 分反応を行った。KOD-FX を用いた PCR 条件は、98°C 2 分、63°C 30 秒、72°C 30 秒の 35 サイクルを繰り返して増幅後、72°C で 2 分反応を行った。オリゴヌクレオチドプライマーは、Eurofins Genomics (東京, 日本) から購入した。PCR 産物及び制限酵素処理後の DNA 精製は、QIAquick PCR Purification Kit を用いた。*kiq* 遺伝子クラスター全長クローニング及びインフレームでの遺伝子破壊は λ -Red 組み換え法を用いた [56]。DNA シークエンスには、BigDye terminator version 3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。DNA 配列解析には Geneious software package (Biomatters) を用いた。

・菌株、プラスミド、培地

使用した菌株、及びプラスミドは、Table 8 に記載した。PCR プライマーは、Table 9 に記載した。各遺伝子のクローニングには、*E. coli* DH5 α 及び NEB10- β を宿主として用いた。Luria-Bertani (LB) 培地 (NACALAI TESQUE, INC., 京都, 日本) を用いて 28°C 及び 37°C で培養した。LB 培地に対して、適切な濃度で抗生物質 (100 μ g/mL Amp, 50 μ g/mL Kan, 50 μ g/mL Apr, 又は 30 μ g/mL Cm) を添加した。*Streptomyces* sp. SN-593 の培養は、SK2 及び reveromycin 生産培地を用いた [30]。*S. lividans* TK23 は、M4YE プレートで調製し、プロトプラスト作製時には、YEME 培地 [36] で培養した。プロトプラスト法 [36] による形質転換には、R5 プレートを使用した。特に記載がない場合、*S. lividans* TK23 の形質転換体は、24 ϕ の試験管 (10 mL, 250 rpm) 又は K1 フラスコ (70 mL, 155 rpm) を用いて、適切な抗生物質 (5 μ g/mL Apr 又は 5 μ g/mL Tsr) を添加した SK2 培地で 28°C 培養した。各形質転換体は、TSB 培地 (Becton, Dickinson and Company, USA) で培養後に、代謝産物を解析した。

・異種発現ベクターの構築

Streptomyces sp. SN-593 を用いた *kiq* 遺伝子クラスターを含む BAC クローン (pKU503_21E1) は、3 セットの PCR プライマー (2885F/2885R, 2914F/2914R, 2945F/2945R) (Table 9) を用いてスクリーニングした。組み込みベクターである pKU592*aac*(3)*IV* は、*kiq* 遺伝子クラスターに隣接する 49 あるいは 50 bp の相同領域を含むプライマーセット (*kiq*1-pKU592-Nhe-F/*kiq*1-pKU592-Hind-R 及び *kiq*2-pKU592-Nhe-F/*kiq*2-pKU592-Hind-R) (Table 9) を用いて DNA 断片を増幅し、DpnI 処理によって鋳型 DNA を除去した。pKU503_21E1 を保有する *E. coli* NEB10- β に pKD78 を導入した後、それぞれ増幅した DNA 断片を導入し、 λ Red 組み換えにより発現ベクター (pKU592*aac*(3)*IV*::*kiq*1 及び pKU592*aac*(3)*IV*::*kiq*2) を得た。*kiq*1 領域 (43,415 bp) は、目的としている *kiq* 遺伝子クラスターの両端に *orf*(-4)-*orf*(-1)

と *orf(+1)-orf(+6)* 遺伝子を含んでおり、*kiq2* 領域 (31,930 bp) は *orf(-4)-orf(-1)* と *orf(+1)-orf(+6)* 遺伝子が含まれていない (Table 1)。

・ *kiq* 遺伝子破壊

pkD13 由来の FRT-*aph(3')II* 遺伝子カセットを Table 9 記載のプライマーを用いて PCR 増幅し、各 *kiq* 遺伝子の両端に 39 bp の組み換え領域を付加した。次に、PCR 溶液を DpnI 処理し、各 *kiq* 遺伝子断片 (*kiqA*, *kiqG*, *kiqO*, *kiqS1*, *kiqS5*, *kiqS6*, *kiqT1*, *kiqT2*) を精製した。pKD78 を保有する *E. coli* NEB 10-β に対して、pKU592*aac(3)IV::kiq2* をエレクトロポレーション法により導入した後に、上記の組み換え領域を含む *kiq* 遺伝子断片を導入した。Table 9 記載のプライマーを用いてコロニーPCR を行い、ヒットクローンからプラスミドを精製した。次に、pCP20 を含んだ *E. coli* XL1-Blue MRF' へ導入し FRT-*aph(3')II* 遺伝子カセットを除去した。破壊カセット除去後の配列が正しいことは、DNA シークエンス解析により確認した。

・ *kiqA* 遺伝子の発現

Table 9 に示したプライマーセット (*kiqA*-NdeI-F/*kiqA*-Hind-R) を用いて *kiqA* 遺伝子を増幅した。その後、NdeI 及び HindIII で制限酵素消化し、T4 DNA ligase (HC) (Promega) を用いて pKU460::*sav2794p-aac(3)I* [24] にライゲーション、*E. coli* DH5α を形質転換した。構築したプラスミド及びプライマーセット (EcoRI-2794p-F/*kiqA*-Hind-R) を用いて、*sav2794p::kiqA* 遺伝子を PCR 増幅し EcoRI 及び HindIII で制限酵素消化を行った。pTYM19 を EcoRI 及び HindIII で制限酵素消化、CIAP 処理後、T4 DNA ligase を用いて制限酵素消化処理した PCR 断片とライゲーションし、*E. coli* DH5α 形質転換を行った。次に、構築したプラスミド(pTYM19::*sav2794-kiqA*)の DNA 配列の確認を行った。

・ *S. lividans* TK23 への異種発現ベクターの導入

S. lividans TK23 への異種発現ベクターの導入には、プロトプラスト法を用いた [36]。Apr 耐性遺伝子を含む発現ベクターを導入する場合には、一次選択で、Apr (終濃度 20 µg/mL) を添加した R5 軟寒天培地 2.5 mL を R5 プレートに播種した。一次選択で生育したクローンを Apr (終濃度 5 µg/mL) を含む M4YE プレート上で 2-7 日間培養し、二次選択を行った。得られた形質転換体は、Apr (終濃度 5 µg/mL) を含む 70 mL の SK2 培地 (K1 フラスコ) で 2-3 日培養を行い、対数増殖期の培養液 (O.D.₆₀₀=3) を 70 mL の TSB 培地 (K1 フラスコ) に 1 mL 添加し、28°C で 3 日間本培養を行った。

Thiostrepton 耐性遺伝子を含む発現ベクターを導入する場合には、一次選択で、Tsr (終濃度 1 µg/mL) を添加した R5 軟寒天培地 2.5 mL を R5 プレートに播種した。一次選択で生育

したクローンを Tsr (終濃度 1 µg/mL) を含む M4YE プレート上で 2 日間培養し、二次選択を行った。得られた形質転換体は、Tsr (終濃度 5 µg/mL) を含む 70 mL の SK2 培地 (K1 フラスコ) で 2-3 日培養を行い、対数増殖期の培養液 (O.D.₆₀₀ = 3) を 70 mL の TSB 培地 (K1 フラスコ) に 1 mL 添加し、28°C で 3 日間本培養を行った。

・培養、抽出、UPLC/MS 分析による代謝産物解析

本培養の培養液 (5 mL) に対して等量のアセトンを添加し、15 秒間超音波処理を行った (TOMY UD-200)。アセトン抽出液を遠心分離 (4,000 × g, 10 分) し、上清を回収後、アセトンを減圧留去した。続いて 4 mL の酢酸エチルで 2 回抽出後、有機層を回収し、溶媒を減圧留去した後、200 µL の MeOH で溶解した。抽出サンプルは、フィルター (Millex-LG syringe-driven filter unit 0.20 µm, 4 mm, Millipore) 処理により固形物を除去し、ACQUITY UPLC system に API-3200 質量分析計を接続した UPLC/MS で分析を行った。分析条件は、ACQUITY UPLC BEH C18 column (2.1 x 50 mm, 1.7 µm) を用い、5% 溶媒 B (溶媒 A: 0.05% ギ酸水溶液、溶媒 B: acetonitrile) 平衡化後、1 µL MeOH 溶液を注入し、流速 0.5 mL/分、溶媒 B を 15 分で 5-100% (v/v) の濃度勾配で溶出後、さらに 5 分間 100% 溶媒 B を流した。

・KQB 単離のための培養および精製

M4YE (Apr 5 µg/mL, Tsr 1 µg/mL) プレート上で生育させた *S. lividans* TK23/pKU592 *aac(3)IV::kiq2/pTYM19::sav2794p-kiqA* (Table 8) をそれぞれ 終濃度 5 µg/mL の Tsr と Apr を含む SK2 培地 (K1 フラスコ, 70 ml) で、3 日間前培養 (28°C, 150 rpm) を行った。対数増殖期の培養液 (O.D.₆₀₀=3) を TSB 培地 (ジャーファーメンター, 8×2 L) に 1/70 量を添加し、28°C、3 日間本培養を行った。

KQB の生産が確認された生産培養液 (16 L) に対して、等量のアセトンを添加した。アセトンを添加後、吸引ろ過により菌体残渣を取り除いた。ろ液からアセトンを減圧留去した後、アセトン留去液 (16 L) を pH 2 に合わせ、等量のアセトン抽出液で二回抽出した。UPLC/MS の解析により、有機層に KQB が確認できたため、有機層を減圧留去し、酢酸エチル抽出物を 9.8 g を得た。次に、酢酸エチル抽出物は、シリカゲルカラムを用いた MPLC で精製した。MPLC は、クロロホルム/メタノール=100/0, 99/1, 98/2, 95/5, 90/10, 80/20, 50/50, 0/100 の溶媒組成でステップワイズにて行った。目的物は、100/0 画分に確認できたため、溶媒を減圧留去し粗抽出物を 1.4 g 得た。粗抽出物を少量のメタノールに溶解させた後、HPLC で精製した。HPLC 条件を以下に示す。

- ・カラム: PEGASIL ODS 20 Φ × 250 mm
- ・移動相: 0.05% ギ酸入り 50% アセトニトリル
- ・流量: 10 mL/min
- ・検出波長: 425 nm

HPLC 精製において KQB は 27.5 min から 29.5 min に検出された。KQB のピークを分取し、濃縮した結果、7 mg の KQB を得た。

・6,9-DHT 単離のための培養および精製

M4YE (Apr 5 µg/mL, Tsr 1 µg/mL) プレート上で生育させた *S. lividans* TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqO/pTYM19::sav2794p-kiqA (Table 8) をそれぞれ 終濃度 5 µg/mL の Tsr と Apr を含む SK2 培地 (K1 フラスコ, 70 ml) で、3 日間前培養 (28°C, 150 rpm) を行った。対数増殖期の培養液 (O.D.₆₀₀ = 3) を 70 mL の TSB 培地 (K1 フラスコ) に 1 mL 添加し、3 日間本培養を行った。

本培養液 (17 L, K1 フラスコ 238 本) に対して、等量のアセトンを添加した後、吸引ろ過により菌体残渣を取り除いた。ろ液からアセトンを減圧留去した留去液 (24 L) に対して等量の酢酸エチルを加え二回抽出した。UPLC/MS の解析により、6,9-DHT は有機層に確認できたため、有機層を減圧留去し、酢酸エチル抽出物を 4.1 g 得た。次に、酢酸エチル抽出物を少量の MeOH に溶解させた後、Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィー (40Φ×215 mm) で分画した。Sephadex LH20 カラムクロマトグラフィーは、100% MeOH で溶出させ、Fraction 1 から 9 は各 300 mL ずつ、Fraction 10 から 14 は各 900 mL ずつ分画した。

6,9-DHT が含まれていた Fraction 10 (18.8 mg) を 1.5 mL の MeOH に溶解させ、HPLC で精製した。HPLC 条件を以下に示す。

- ・カラム: PEGASIL ODS 20 Φ × 250 mm
- ・移動相: 0.02%ギ酸入り 60%アセトニトリル
- ・流量: 10 mL/min
- ・検出波長: 425 nm

HPLC 精製において 6,9-DHT は 27 min から 34.5 min に検出された。6,9-DHT のピークを分取し、濃縮した結果、6.3 mg の 6,9-DHT を得た。

・KQB 及び 6,9-DHT の feeding 実験

KQB

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV を Apr (5 µg/mL) を含む M4YE プレート上で 28°C、3 日間培養し、Apr (5 µg/mL) を含む SK2 培地 (24Φ 試験管) 10 ml に寒天ピース 5 つを添加し、2 日間培養した。続いて、前培養液 3 mL (O.D.₆₀₀=3) を 200 mL の TSB 培地に添加し、よく混合した後、10 mL ずつ 24Φ 試験管に分注した。培養 2 日目に KQB (終濃度 0.05 mM) を添加し、24 時間培養した後、酢酸エチル抽出を行い、代謝産物を UPLC/MS 解析した。

6,9-DHT

S. lividans TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqG を Apr (5 μg/mL) を含む M4YE プレート上で 28°C、3 日間培養し、Apr (5 μg/mL) を含む SK2 培地 (24Φ 試験管) 10 ml に寒天ピース 5 つを添加し、3 日間培養した。続いて、前培養液 3 mL (O.D.₆₀₀=3) を 200 mL の TSB 培地に添加し、よく混合した後、10 mL ずつ 24Φ 試験管に分注した。培養 2 日目に 6,9-DHT (終濃度 0.05 mM) を添加し、24 時間培養した後、酢酸エチル抽出を行い、代謝産物を UPLC/MS 解析した。

・動物細胞を用いた生物活性評価

ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa [57]は、10%ウシ胎児血清 (FBS; Sigma-Aldrich) を含む DMEM (Thermo Fisher Scientific) 中、37°C 培養した。ヒト前骨髄球性白血病細胞由来細胞株 HL-60 [57] は、10% FBS を含む RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) 中、37°C 培養した。各細胞株は、384 well プレートに播種 (HeLa については 1×10^3 細胞/well、HL-60 については 3.75×10^3 細胞/well) し、48 時間サンプルを曝露後、製造元の手法に従い Cell Count Reagent SF (ナカライテスク) を用いて細胞増殖を測定した。1/10 容量の WST-8 溶液を各 well に添加し、1 時間保温した。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 の吸光度を測定した。

・抗菌活性測定

試験株は、*Staphylococcus aureus* 209、*Escherichia coli* HO141、*Candida albicans* JCM1542、および *Plasmodium falciparum* 3D7 [58]の 4 株を使用した。これらの微生物に対する試料の抗菌活性は、標準的な微量希釈法によって行った。*S. aureus* 209 および *E. coli* HO141 については、0.1%の 0.5 McFarland 標準懸濁液を含有する 50 μl の細胞懸濁液を 384 well 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、24 時間保温した。*C. albicans* JCM1542 については、0.1%の 0.5 McFarland 標準懸濁液を含有する 50 μl の接種懸濁液を 384 well プレートに播種し、28°C、24 時間 (*C. albicans* JCM1542) で保温した。これらの微生物の増殖は、600 nm の吸光度で測定した。

Table 8 使用したベクター/プラスミド及び菌株

Vectors/plasmids	Relevant characteristics	Source/ references
pKD13	Vector for preparing the <i>FRT-aph(3')II-FRT</i> gene	CGSC [56]
pKD78	Red recombinase expression plasmid with chloramphenicol resistance	CGSC
pCP20	Ampicillin and chloramphenicol resistant plasmid that shows temperature-sensitive replication and thermal induction of FLP synthesis	CGSC [59]
pKU503	BAC vector containing neomycin resistant gene, <i>aph(3')II</i> , and an ampicillin resistance gene, for heterologous gene expression	[20]
pKU503 <i>kiq</i>	Selected BAC clone (pKU503_21E1) containing the entire <i>kiq</i> biosynthetic gene cluster	this study
pKU592 <i>aac(3)IV</i>	Integrating vector pKU592 <i>Acos</i> containing <i>TG1</i> integrase, apramycin resistant gene, and <i>aac(3)IV</i> for heterologous gene expression	[24]
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq1</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster containing the border region (<i>rvr2896-rvr2944</i> : 43,415 base)	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster (<i>rvr2900-rvr2938</i> : 31,930 base)	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqA</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqA</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqG</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqG</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqM</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqM</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqN</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqN</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqO</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqO</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqS1</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqS1</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqS5</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqS5</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqS6</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqS6</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqT1</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqT1</i> gene was disrupted	this study
pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqT2</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>kiq</i> cluster, in which the <i>kiqT2</i> gene was disrupted	this study
pKU460:: <i>sav2794p-aac(3)I</i>	Vector to obtain the <i>sav2794</i> promoter (the sequence consisted of the region from 3,427,321 to 3,427,705 nt of <i>S. avermitilis</i> genome)- <i>kiqA</i> gene cassette (<i>sav2794p-kiqA</i>), the promoter of the gene encoding secreted metalloprotease, <i>SAV_2794</i> . The <i>sav2794</i> promoter has been utilized for expression of secondary metabolite gene cluster.*	[24] [25, 60]*
pKU460:: <i>sav2794p-kiqA-aac(3)I</i>	Vector to obtain pTYM19:: <i>sav2794p-kiqA</i>	this study
pTYM19	Integration vector containing ΦC31 integrase and a thiostrepton resistant gene for heterologous gene expression	[61]
pTYM19:: <i>sav2794p-kiqA</i>	Plasmid for heterologous expression of the <i>OmpR</i> family regulator gene, <i>kiqA</i> , under control of the <i>sav2794</i> promoter	this study
pET-28b(+)	Plasmid used for protein expression in <i>E. coli</i>	Novagen,

Strains	Relevant characteristics	Source/ references
<i>E. coli</i> DH5α	Host for general cloning	Takara
<i>E. coli</i> NEB10-β	Construction of BAC DNA library and cloning	New England Biolabs
<i>E. coli</i> BL21 Star TM (DE3)	Host for protein expression	Invitrogen
<i>E. coli</i> NEB10-β/pKU503_21E1	Selected clone containing <i>kiq</i> gene cluster from BAC DNA library	this study
<i>E. coli</i> NEB10-β/pKD78/pKU503_21E1	Construction of pKU592 <i>aac(3)IV::kiq1</i> and pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2</i>	this study
<i>E. coli</i> NEB10-β/pKD78/pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2</i>	Construction of pKU592 <i>aac(3)IV::kiq2ΔkiqA</i>	this study
<i>E. coli</i> XL1-Blue MRF'	Strain used for FLP-mediated excision of the disruption cassette	Stratagene
<i>Streptomyces</i> sp. SN-593 ^a	Wild-type reveromycin A-producing strain, which is identical to <i>Streptomyces reveromyceticus</i> SN-593 ^b .	^a [29, 30] ^b [17]
<i>Streptomyces reveromyceticus</i> SN-593-44	<i>Streptomyces reveromyceticus</i> SN-593 clone #44, which was screened as the reveromycin high producing strain.	[35]

<i>S. lividans</i> TK23	Host for heterologous gene expression	[36]
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq1	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq1	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqA	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqA	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqG	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqG	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqM	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqM	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqN	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqN	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqO	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqO	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqS1	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqS1	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqS5	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqS5	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqS6	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqS6	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqT1	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqT1	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqT2	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqT2	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2/pTYM19::sav2794p-kiqA	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2 and pTYM19::sav2794p-kiqA	this study
<i>S. lividans</i> TK23/pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqO/pTYM19::sav2794p-kiqA	<i>S. lividans</i> TK23 transformed with pKU592aac(3)IV::kiq2ΔkiqO and pTYM19::sav2794p-kiqA	this study

Table 9 使用したプライマー

Primers used for screening of <i>kiq</i> gene cluster	
Target gene (template DNA)	Primers (size of amplified DNA)
<i>rvr2945</i> (pKU503 <i>kiq</i>)	2945F: 5'-TCACCGGAGCCCTGGTCGGTTT-3' 2945R: 5'-TGTTTCGAGGTGCCCCAGTCGCT-3' (293 bp)
<i>rvr2914, kiqK</i> (pKU503 <i>kiq</i>)	2914F: 5'-ACGGGAACCTGGTCGACCGCTA-3' 2914R: 5'-TCCAGACCACCTCGAACGCGA-3' (578 bp)
<i>rvr2885</i> (pKU503 <i>kiq</i>)	2885F: 5'-TACGCCGTCGGGGTGCCTACT-3' 2885R: 5'-ATGCCGCCGTTGTCGCGGATGT-3' (743 bp)
Primers used for target gene inactivation using the λ -Red system	
Target gene (template DNA) *	Primers**
<i>kiq1</i> (pKU592 <i>aac(3)IV</i>)	kiq1-pKU592-Nhe-F: 5'-GTAGGCGTCCAGGAGTCCCGCAGAATCTGAGTGAGGAAGGGTGGAGCC <u>ATAAGCTAGCTTCACGCTGCC-3'</u> kiq1-pKU592-Hind-R: 5'-GGTGGTCCGTCGGGTGGTCGGCCGTCGGCGGGCGGCGGTCCGGCGTCA <u>GCAAGCTTGGCGTAATCATGG-3'</u>
<i>kiq2</i> (pKU592 <i>aac(3)IV</i>)	kiq2-pKU592-Nhe-F: 5'-TTGACGACGTCGAGGACGAGCAGTGCCTGAACCTGAACATC <u>TGGTCCACATAAGCTAGCTTCACGCTGCC-3'</u> kiq2-pKU592-Hind-R: 5'-ATGGTGAAGCCGTGGATGGTGTCTCGGGATAGACCTCCATCG <u>TGTAGTCGAGCAAGCTTGGCGTAATCATGG-3'</u>
<i>kiqA, rvr2900</i> (pKD13)	kiqA-P4-F: 5'-GAGGGAGCTCACGTGCGTGTCTATGGTGC GGCTCGCCTCATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqA-P1-R: 5'-TACGACGCGATGTCGGCGTTCGAAGGAGGCGGATCTCGTGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'
<i>kiqG, rvr2907</i> (pKD13)	kiqG-P4-F : 5'-AGCGTGACGCGTACCGTCAAGGAACTCGTCGACGAGGGAATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqG-P1-R : 5'-CTGGAACCTCTCCAGGATCGCGTCCCTCGCTCGTGTGCTATGTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'
<i>kiqM, rvr2919</i> (pKD13)	kiqM-P4-F : 5'-CGCCACGACGACCAGACCGACCCCTACACCATTTCCTTCATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqM-P1-R : 5'-GATCCGACGACCGGTCGACCGCGCCGATCAGCATCTGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'
<i>kiqN, rvr2921</i> (pKD13)	kiqN-P4-F : 5'-CTGGTAACCGGAGCCACCGGCCATGTCGGCAGGCCGCTGATTCCGGG GATCCGTCGACC -3' kiqN-P1-R : 5'-GTCGACCGGTGAGATCTCGTGC GGGTGCCCGACCAGCCGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC -3'
<i>kiqO, rvr2922</i> (pKD13)	kiqO-P4-F : 5'-CAGTCCCTCATCGGCAGGATGCACCGGGAGGCGGAGCTCATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqO-P1-R : 5'-GAAGTCCGCGCCGGCGTCCCGGTCACCTTCTCGACGGTGTAGGC TGGAGCTGCTTC -3'

<i>kiqS1</i> , <i>rvr2917</i> (pKD13)	kiqS1-P4-F : 5'- <u>ACGTCGTCGAGACCACCGTGCCGGGCGCGTTTCGTGTTCA</u> ATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqS1-P1-R : 5'- <u>GTCCTTCTCCGACATCAGCGGCGGCTCGTCGAACTCCC</u> ATGTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'
<i>kiqS5</i> , <i>rvr2935</i> (pKD13)	kiqS5-P4-F : 5'- <u>GAACGGGAGTTCGTGCCCGGCACGACGGAGATCTGGCCG</u> ATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqS5-P1-R : 5'- <u>GATCCAGAAGGTGTGGTCGGCGATGACGTCGCTGTTCTCT</u> GTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'
<i>kiqS6</i> , <i>rvr2936</i> (pKD13)	kiqS6-P4-F : 5'- <u>GACTTCCGCGTGGAGCGCATCCCGTTCGCGGAGCTGGAC</u> ATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqS6-P1-R : 5'- <u>CGCGTCCACGATCAGGTAGCGGCTCTCCGCGTTGAGGA</u> ATGTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'
<i>kiqT1</i> , <i>rvr2927</i> (pKD13)	kiqT1-P4-F : 5'- <u>CACGACGTCGAGTCGCTCGCGAAGGCGACCGGCTCCCAC</u> ATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqT1-P1-R : 5'- <u>CTCGAAGTAGACCATCATCCGCAGGTCGCCGCTGGTGA</u> ATGTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'
<i>kiqT2</i> , <i>rvr2929</i> (pKD13)	kiqT2-P4-F : 5'- <u>CTGCACGCGGCCGTCGAGCTGAGGATCGTCGAGCTGATC</u> ATTCCGGG GATCCGTCGACC-3' kiqT2-P1-R : 5'- <u>ATCGACCGCCTCCGCCAGCACGGGTTCCACGATCAGCA</u> CTGTAGGC TGGAGCTGCTTC-3'

* DNA was amplified from the template plasmid with 39 bp homologous flanking region on both sides of the target gene. ** Homologous sequences are underlined and restriction enzyme sites are shown in bold.

Primers used for cloning the *sav2794* promoter and *kiqA* gene

Template DNA	Primers ^{***}
pKU592 <i>aac(3)IV_kiq2</i>	kiqA-NdeI-F: 5'-GGAATTCCATATGCGCCTGCTATTGGTTGAGGA-3' kiqA-Hind-R: 5'-CCCAAGCTTTCACCCGTGGCCGAAGCG-3'
pKU460:: <i>sav2794p-aac(3)I</i>	EcoRI-2794p-F: 5'-CCGGAATTCGGCGGCCTTGTACGC-3' kiqA-Hind-R: 5'-CCCAAGCTTTCACCCGTGGCCGAA-3'

参考文献

- 1 Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod* 2012; 75: 311-335.
- 2 Berdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot* 2005; 58: 1-26.
- 3 Chater KF. Multilevel regulation of *Streptomyces* differentiation. *Trends Genet* 1989; 5: 372-377.
- 4 Yamada Y, Sugamura K, Kondo K, Yanagimoto M, Okada H. The structure of inducing factors for virginiamycin production in *Streptomyces virginiae*. *J Antibiot* 1987; 40: 496-504.
- 5 Horinouchi S, Beppu T. Autoregulatory factors and communication in actinomycetes. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46: 377-398.
- 6 Kitani S, Miyamoto KT, Takamatsu S, Herawati E, Iguchi H, Nishitomi K *et al.* Avenolide, a *Streptomyces* hormone controlling antibiotic production in *Streptomyces avermitilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 16410-16415.
- 7 Onaka H, Tabata H, Igarashi Y, Sato Y, Furumai T. Goadsporin, a chemical substance which promotes secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. I. Purification and characterization. *J Antibiot* 2001; 54: 1036-1044.
- 8 Panthee S, Takahashi S, Hayashi T, Shimizu T, Osada H. beta-carboline biomediators induce reveromycin production in *Streptomyces* sp. SN-593. *Sci Rep* 2019; 9: 5802.
- 9 Panthee S, Kito N, Hayashi T, Shimizu T, Ishikawa J, Hamamoto H *et al.* beta-carboline chemical signals induce reveromycin production through a LuxR family regulator in *Streptomyces* sp. SN-593. *Sci Rep* 2020; 10: 10230.
- 10 Nodwell JR, Cuthbertson L. Better chemistry through regulation. *Chem Biol* 2011; 18: 1515-1516.

- 11 Kawai K, Wang G, Okamoto S, Ochi K. The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 274: 311-315.
- 12 Hosaka T, Ohnishi-Kameyama M, Muramatsu H, Murakami K, Tsurumi Y, Kodani S *et al.* Antibacterial discovery in actinomycetes strains with mutations in RNA polymerase or ribosomal protein S12. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 462-464.
- 13 Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T. Mycolic acid-containing bacteria induce natural-product biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 400-406.
- 14 Stutzman-Engwall KJ, Otten SL, Hutchinson CR. Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J Bacteriol* 1992; 174: 144-154.
- 15 Kerr AR, Peden JF, Sharp PM. Systematic base composition variation around the genome of *Mycoplasma genitalium*, but not *Mycoplasma pneumoniae*. *Mol Microbiol* 1997; 25: 1177-1179.
- 16 Arias P, Fernandez-Moreno MA, Malpartida F. Characterization of the pathway-specific positive transcriptional regulator for actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2) as a DNA-binding protein. *J Bacteriol* 1999; 181: 6958-6968.
- 17 Panthee S, Takahashi S, Takagi H, Nogawa T, Oowada E, Uramoto M *et al.* Furaquinocins I and J: novel polyketide isoprenoid hybrid compounds from *Streptomyces reveromyceticus* SN-593. *J Antibiot* 2011; 64: 509-513.
- 18 Schrijver A, Mot R. A subfamily of MalT-related ATP-dependent regulators in the LuxR family. *Microbiology* 1999; 145: 1287-1288.
- 19 Laureti L, Song L, Huang S, Corre C, Leblond P, Challis GL *et al.* Identification of a bioactive 51-membered macrolide complex by activation of

- a silent polyketide synthase in *Streptomyces ambofaciens*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 6258-6263.
- 20 Komatsu M, Uchiyama T, Omura S, Cane DE, Ikeda H. Genome-minimized *Streptomyces* host for the heterologous expression of secondary metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 2646-2651.
- 21 Komatsu M, Komatsu K, Koiwai H, Yamada Y, Kozone I, Izumikawa M *et al.* Engineered *Streptomyces avermitilis* host for heterologous expression of biosynthetic gene cluster for secondary metabolites. *ACS Synth Biol* 2013; 2: 384-396.
- 22 Nah JH, Kim HJ, Lee HN, Lee MJ, Choi SS, Kim ES. Identification and biotechnological application of novel regulatory genes involved in *Streptomyces* polyketide overproduction through reverse engineering strategy. *Biomed Res Int* 2013; 2013: 549737.
- 23 Zhang L, Hashimoto T, Qin B, Hashimoto J, Kozone I, Kawahara T *et al.* Characterization of giant modular PKSs provides insight into genetic mechanism for structural diversification of aminopolyol polyketides. *Angew Chem Int Ed Engl* 2017; 56: 1740-1745.
- 24 Amagai K, Ikeda H, Hashimoto J, Kozone I, Izumikawa M, Kudo F *et al.* Identification of a gene cluster for telomestatin biosynthesis and heterologous expression using a specific promoter in a clean host. *Sci Rep* 2017; 7: 3382.
- 25 Hashimoto T, Hashimoto J, Kozone I, Amagai K, Kawahara T, Takahashi S *et al.* Biosynthesis of quinolidomicin, the largest known macrolide of terrestrial origin: identification and heterologous expression of a biosynthetic gene cluster over 200 kb. *Org Lett* 2018; 20: 7996-7999.
- 26 Myronovskiy M, Luzhetskyy A. Heterologous production of small molecules in the optimized *Streptomyces* hosts. *Nat Prod Rep* 2019; 36: 1281-1294.
- 27 Nepal KK, Wang G. *Streptomyces*: Surrogate hosts for the genetic manipulation of biosynthetic gene clusters and production of natural products.

- Biotechnol Adv* 2019; 37: 1-20.
- 28 Nett M, Ikeda H, Moore BS. Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Nat Prod Rep* 2009; 26: 1362-1384.
- 29 Osada H, Koshino H, Isono K, Takahashi H, Kawanishi G. Reveromycin A, a new antibiotic which inhibits the mitogenic activity of epidermal growth factor. *J Antibiot* 1991; 44: 259-261.
- 30 Takahashi S, Toyoda A, Sekiyama Y, Takagi H, Nogawa T, Uramoto M *et al.* Reveromycin A biosynthesis uses RevG and RevJ for stereospecific spiroacetal formation. *Nat Chem Biol* 2011; 7: 461-468.
- 31 Nogawa T, Takahashi S, Sekiyama Y, Takagi H, Uramoto M, Koshino H *et al.* Creation of novel reveromycin derivatives by alcohol-added fermentation. *J Antibiot* 2013; 66: 247-250.
- 32 Ishibashi M, Funayama S, Anraku Y, Komiyama K, Omura S. Novel antibiotics, furaquinocins C, D, E, F, G and H. *J Antibiot* 1991; 44: 390-395.
- 33 Takahashi S, Takagi H, Toyoda A, Uramoto M, Nogawa T, Ueki M *et al.* Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J Bacteriol* 2010; 192: 2839-2851.
- 34 Aizawa T, Kim SY, Takahashi S, Koshita M, Tani M, Futamura Y *et al.* Alkyldihydropyrones, new polyketides synthesized by a type III polyketide synthase from *Streptomyces reveromyceticus*. *J Antibiot* 2014; 67: 819-823.
- 35 Takagi H, Nogawa T, Futamura Y, Takahashi S, Osada H. Kinanthraquinone, a new anthraquinone carboxamide isolated from *Streptomyces reveromyceticus* SN-593-44. *J Antibiot* 2018; 71: 480-482.
- 36 Hopwood DA, Hintermann G, Kieser T, Wright HM. Integrated DNA sequences in three streptomycetes form related autonomous plasmids after transfer to *Streptomyces lividans*. *Plasmid* 1984; 11: 1-16.

- 37 Shen B. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Opin Chem Biol* 2003; 7: 285-295.
- 38 Zhang Y, Huang H, Chen Q, Luo M, Sun A, Song Y *et al.* Identification of the grincamycin gene cluster unveils divergent roles for GcnQ in different hosts, tailoring the L-rhodinose moiety. *Org Lett* 2013; 15: 3254-3257.
- 39 Hall MN, Silhavy TJ. Genetic analysis of the ompB locus in Escherichia coli K-12. *J Mol Biol* 1981; 151: 1-15.
- 40 Itou H, Tanaka I. The OmpR-family of proteins: insight into the tertiary structure and functions of two-component regulator proteins. *J Biochem* 2001; 129: 343-350.
- 41 Chin AWTF, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ, Bloemberg GV. Introduction of the *phzH* gene of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 extends the range of biocontrol ability of phenazine-1-carboxylic acid-producing *Pseudomonas* spp. strains. *Mol Plant Microbe Interact* 2001; 14: 1006-1015.
- 42 Chen Y, Wendt-Pienkowski E, Ju J, Lin S, Rajske SR, Shen B. Characterization of FdmV as an amide synthetase for fredericamycin A biosynthesis in *Streptomyces griseus* ATCC 43944. *J Biol Chem* 2010; 285: 38853-38860.
- 43 Liu G, Chater KF, Chandra G, Niu G, Tan H. Molecular regulation of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiol Mol Biol Rev* 2013; 77: 112-143.
- 44 Wietzorrek A, Bibb M. A novel family of proteins that regulates antibiotic production in *streptomycetes* appears to contain an OmpR-like DNA-binding fold. *Mol Microbiol* 1997; 25: 1181-1184.
- 45 Yang K, Han L, He J, Wang L, Vining LC. A repressor-response regulator gene pair controlling jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *Gene* 2001; 279: 165-173.
- 46 Novakova R, Homerova D, Feckova L, Kormanec J. Characterization of a

- regulatory gene essential for the production of the angucycline-like polyketide antibiotic auricin in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Microbiology* 2005; 151: 2693-2706.
- 47 Kormanec J, Novakova R, Mingyar E, Feckova L. Intriguing properties of the angucycline antibiotic auricin and complex regulation of its biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 45-60.
- 48 Novakova R, Kutas P, Feckova L, Kormanec J. The role of the TetR-family transcriptional regulator Aur1R in negative regulation of the auricin gene cluster in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239. *Microbiology (Reading)* 2010; 156: 2374-2383.
- 49 Yang K, Han L, Vining LC. Regulation of jadomycin B production in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: involvement of a repressor gene, jadR2. *J Bacteriol* 1995; 177: 6111-6117.
- 50 Zhang Y, Zou Z, Niu G, Tan H. JadR and jadR2 act synergistically to repress jadomycin biosynthesis. *Sci China Life Sci* 2013; 56: 584-590.
- 51 Wang L, Tian X, Wang J, Yang H, Fan K, Xu G *et al.* Autoregulation of antibiotic biosynthesis by binding of the end product to an atypical response regulator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 8617-8622.
- 52 Kutas P, Feckova L, Rehakova A, Novakova R, Homerova D, Mingyar E *et al.* Strict control of auricin production in *Streptomyces aureofaciens* CCM 3239 involves a feedback mechanism. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 2413-2421.
- 53 Bao J, He F, Li Y, Fang L, Wang K, Song J *et al.* Cytotoxic antibiotic angucyclines and actinomycins from the *Streptomyces* sp. XZHG99T. *J Antibiot* 2018; 71: 1018-1024.
- 54 Bo ST, Xu ZF, Yang L, Cheng P, Tan RX, Jiao RH *et al.* Structure and biosynthesis of mayamycin B, a new polyketide with antibacterial activity from *Streptomyces* sp. 120454. *J Antibiot* 2018; 71: 601-605.

- 55 Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; 12: 19-36.
- 56 Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6640-6645.
- 57 Lim CL, Nogawa T, Uramoto M, Okano A, Hongo Y, Nakamura T *et al.* RK-1355A and B, novel quinomycin derivatives isolated from a microbial metabolites fraction library based on NPPlot screening. *J Antibiot* 2014; 67: 323-329.
- 58 Nogawa T, Okano A, Lim CL, Futamura Y, Shimizu T, Takahashi S *et al.* Opantimycin A, a new metabolite isolated from *Streptomyces* sp. RK88-1355. *J Antibiot* 2017; 70: 222-225.
- 59 Cherepanov PP, Wackernagel W. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 1995; 158: 9-14.
- 60 Kim JH, Komatsu M, Shin-Ya K, Omura S, Ikeda H. Distribution and functional analysis of the phosphopantetheinyl transferase superfamily in Actinomycetales microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115: 6828-6833.
- 61 Onaka H, Taniguchi S, Ikeda H, Igarashi Y, Furumai T. pTOYAMAcos, pTYM18, and pTYM19, actinomycete-*Escherichia coli* integrating vectors for heterologous gene expression. *J Antibiot* 2003; 56: 950-956.

補遺

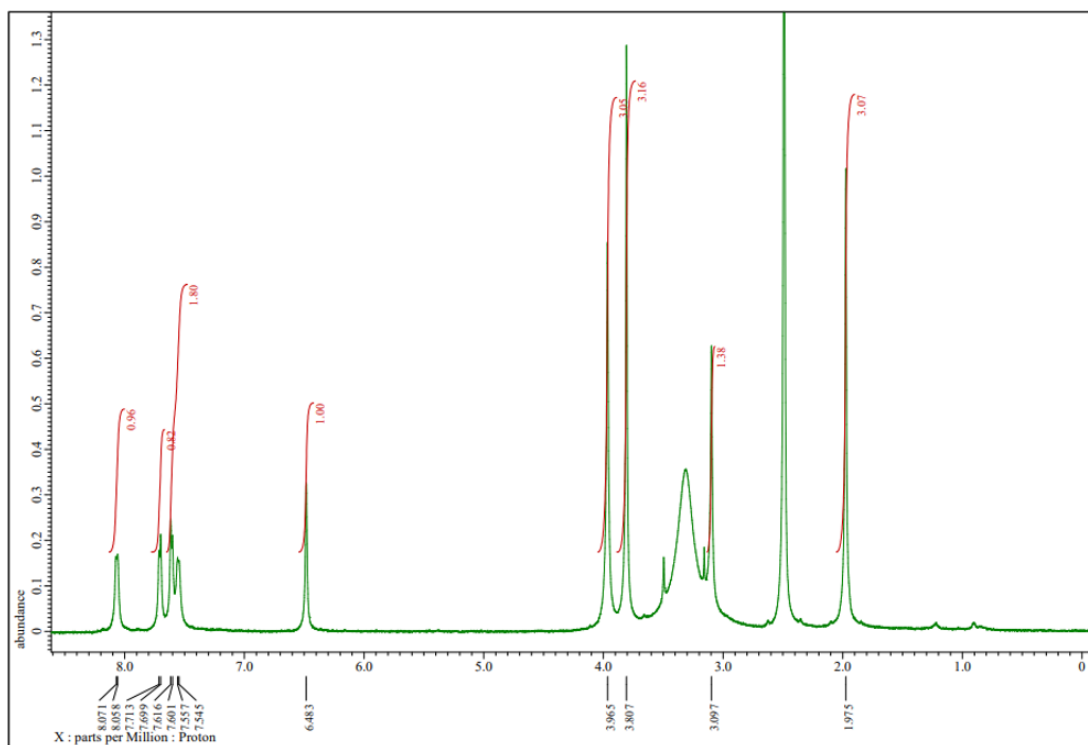


Fig. S1 ^1H NMR spectrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) of KQB

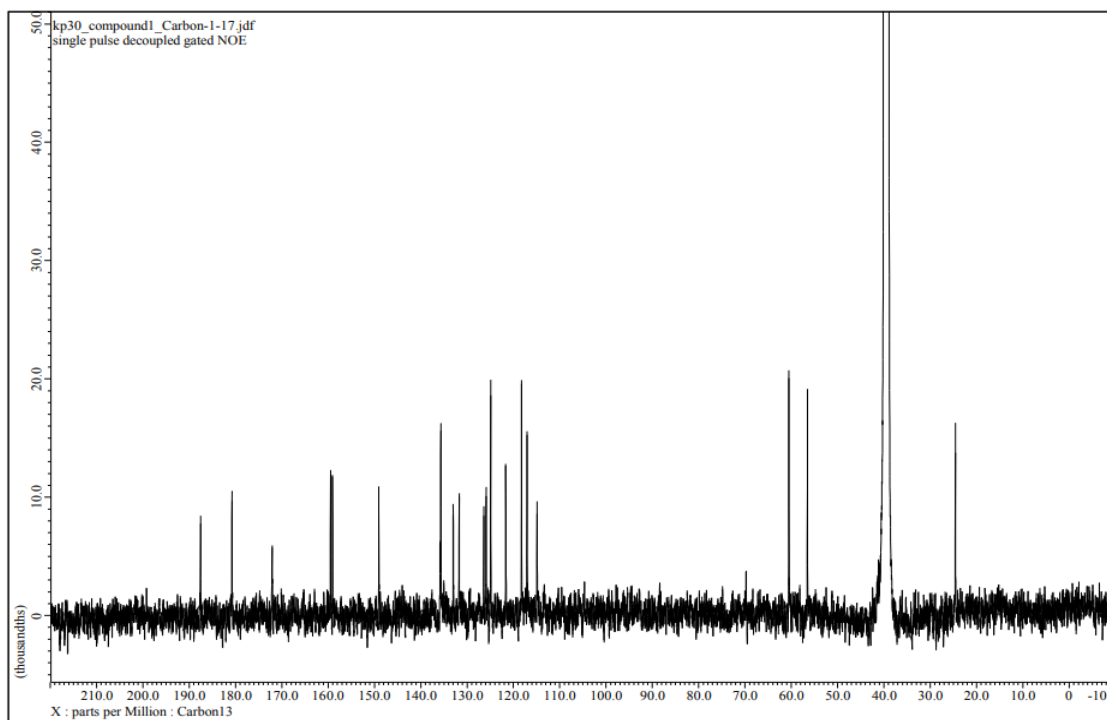


Fig. S2 ^{13}C NMR spectrum (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) of KQB

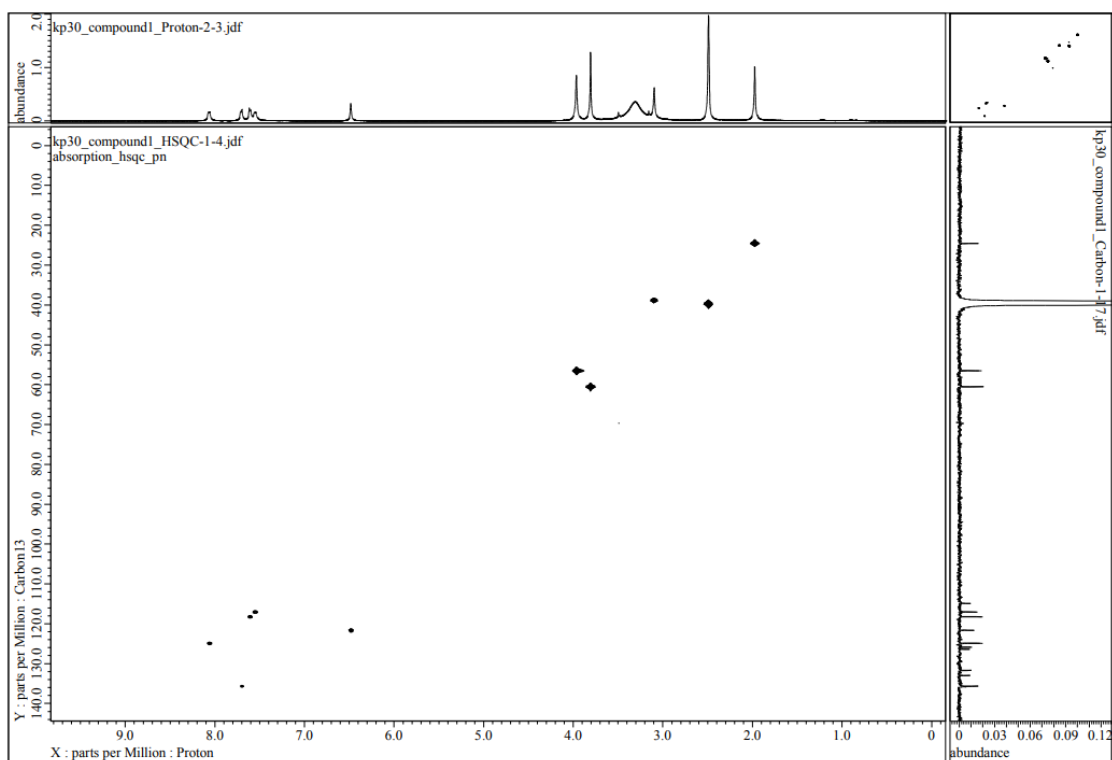


Fig. S3 HSQC spectrum (500 MHz, DMSO- d_6) of KQB

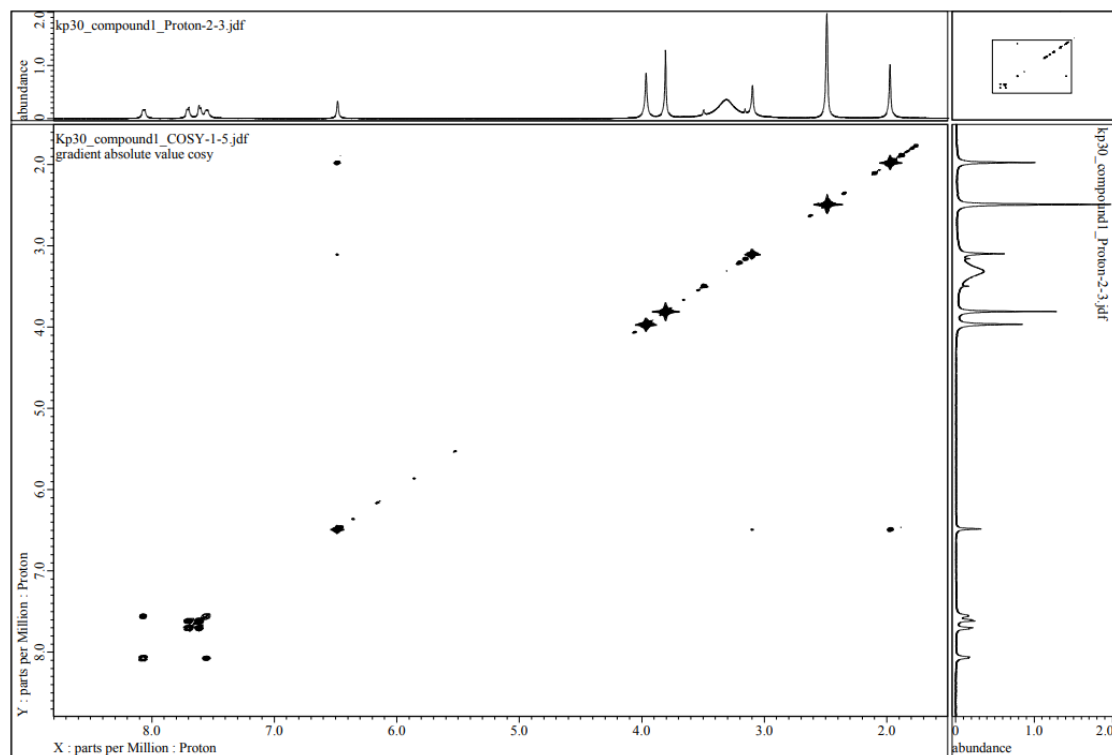


Fig. S4 COSY spectrum (500 MHz, DMSO- d_6) of KQB

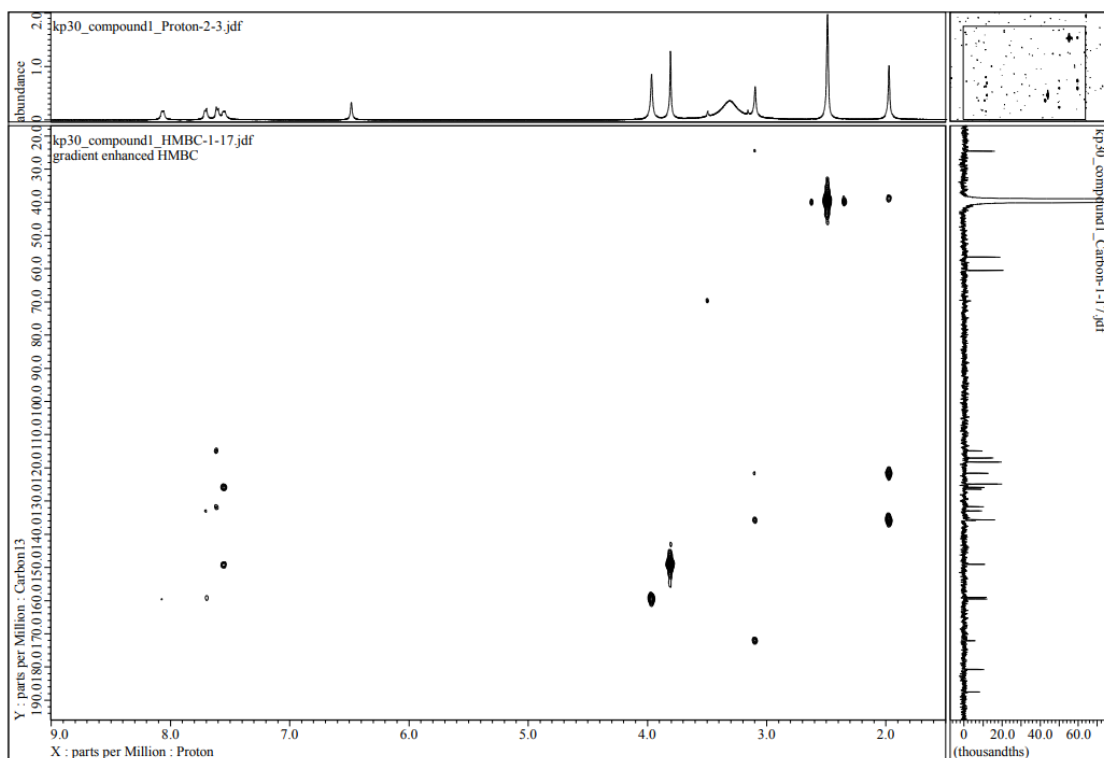


Fig. S5 HMBC spectrum (500 MHz, DMSO- d_6) of KQB

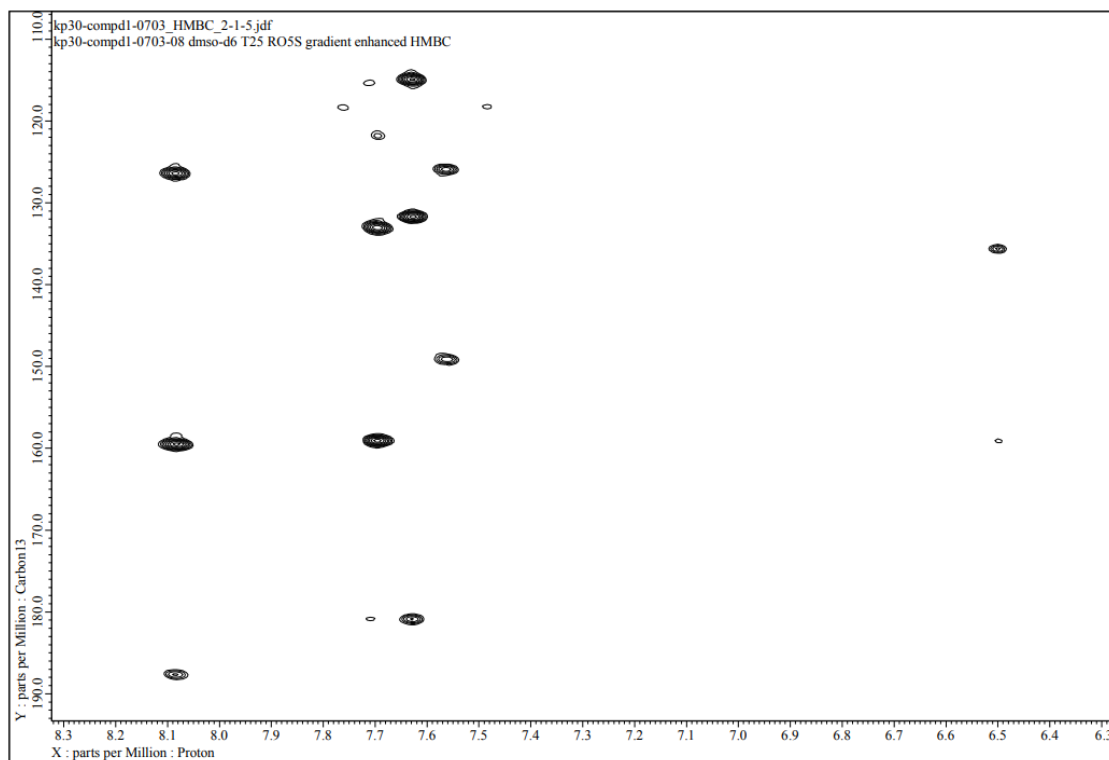


Fig. S6 HMBC spectrum (600 MHz, DMSO- d_6) of KQB

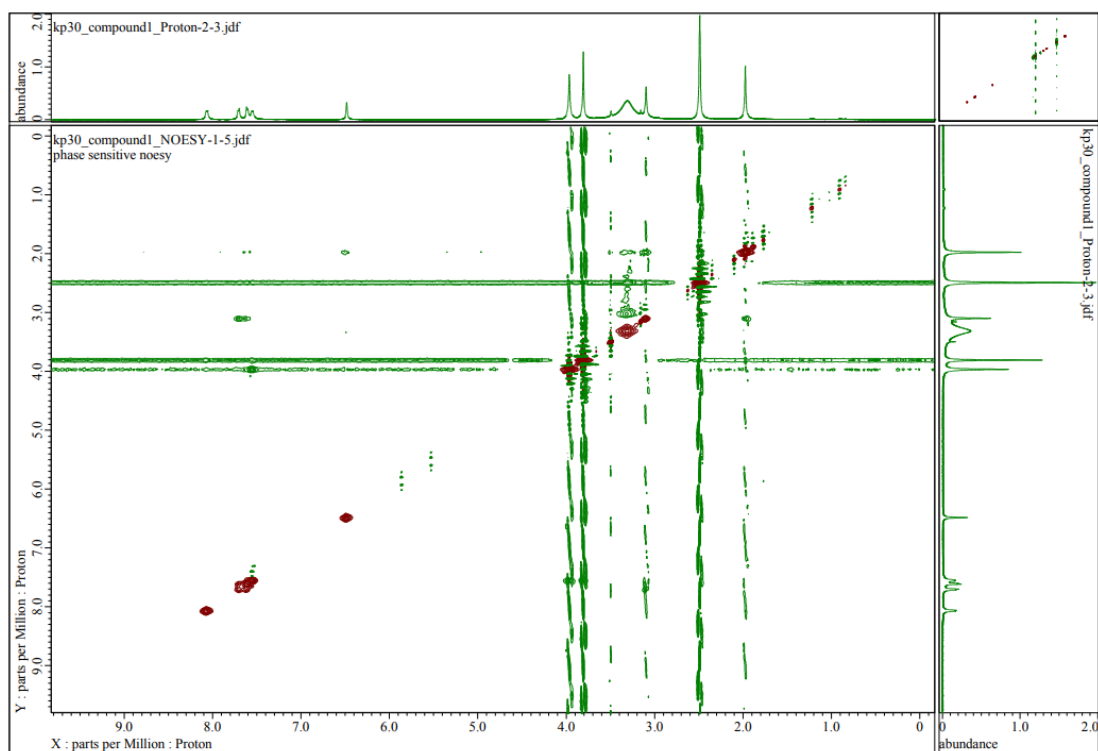


Fig. S7 NOESY spectrum (500 MHz, DMSO- d_6) of KQB

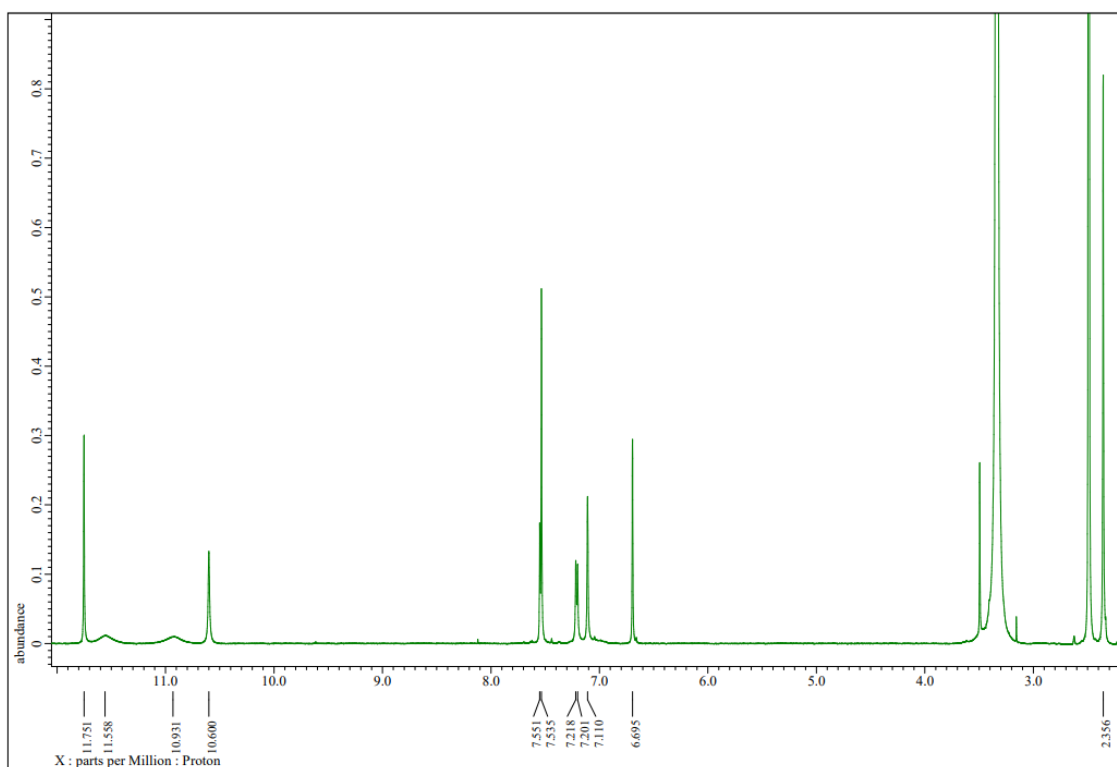


Fig. S8 ^1H NMR spectrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) of 6,9-DHT

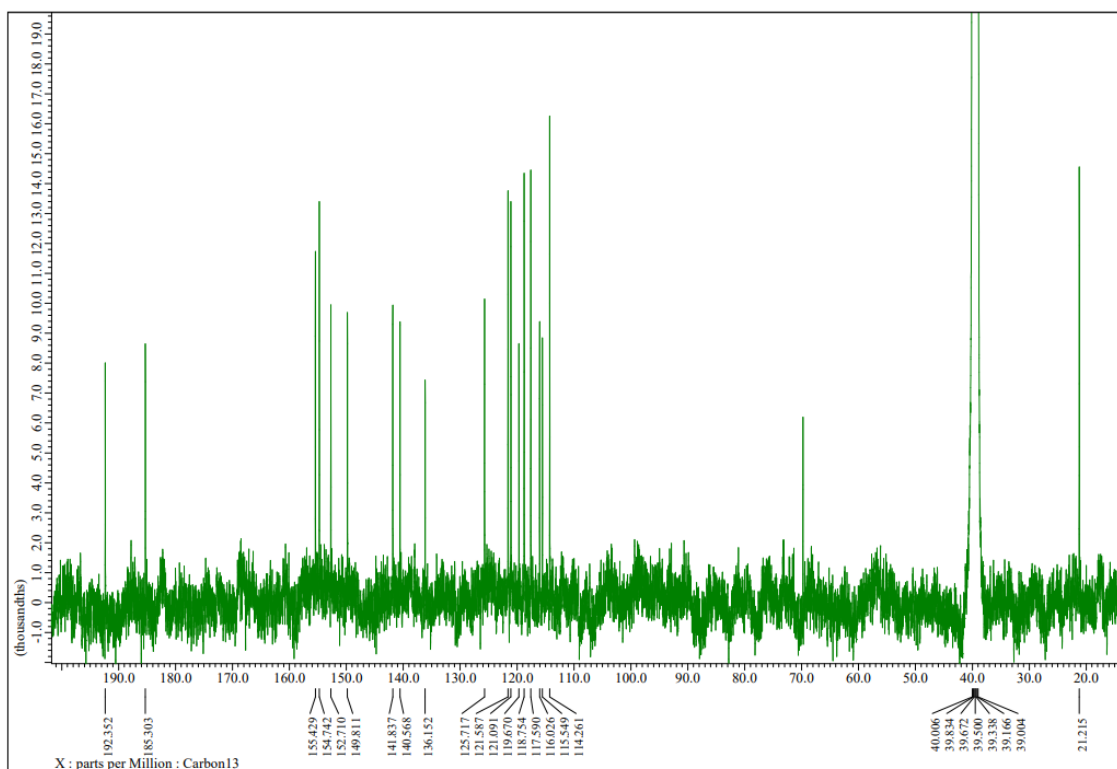


Fig. S9 ^{13}C NMR spectrum (125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) of 6,9-DHT

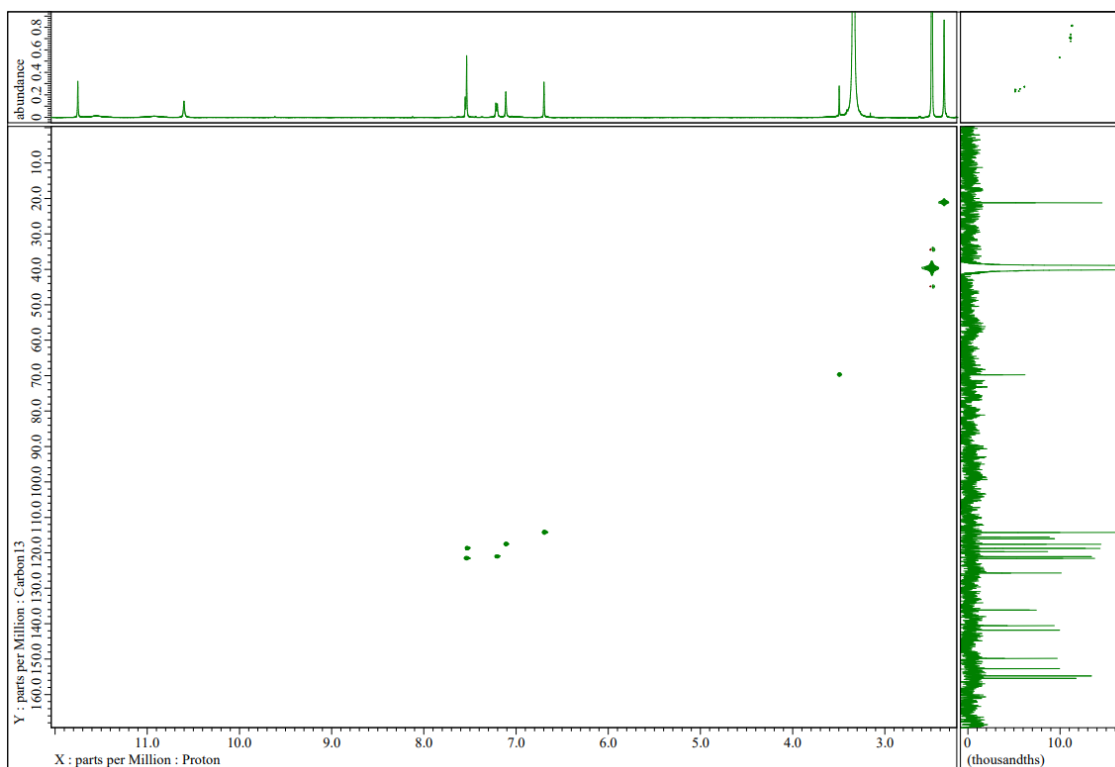


Fig. S10 HSQC spectrum (500 MHz, DMSO- d_6) of 6,9-DHT

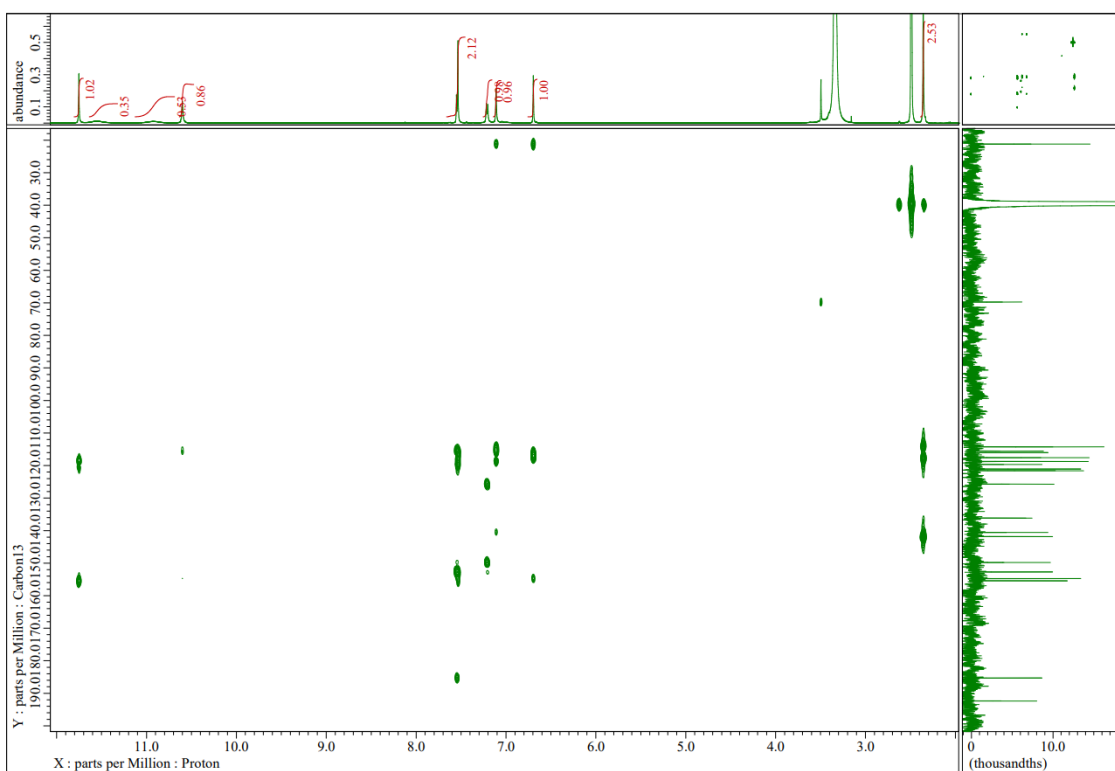


Fig. S11 ^1H - ^{13}C HMBC spectrum (500 MHz, DMSO- d_6) of 6,9-DHT

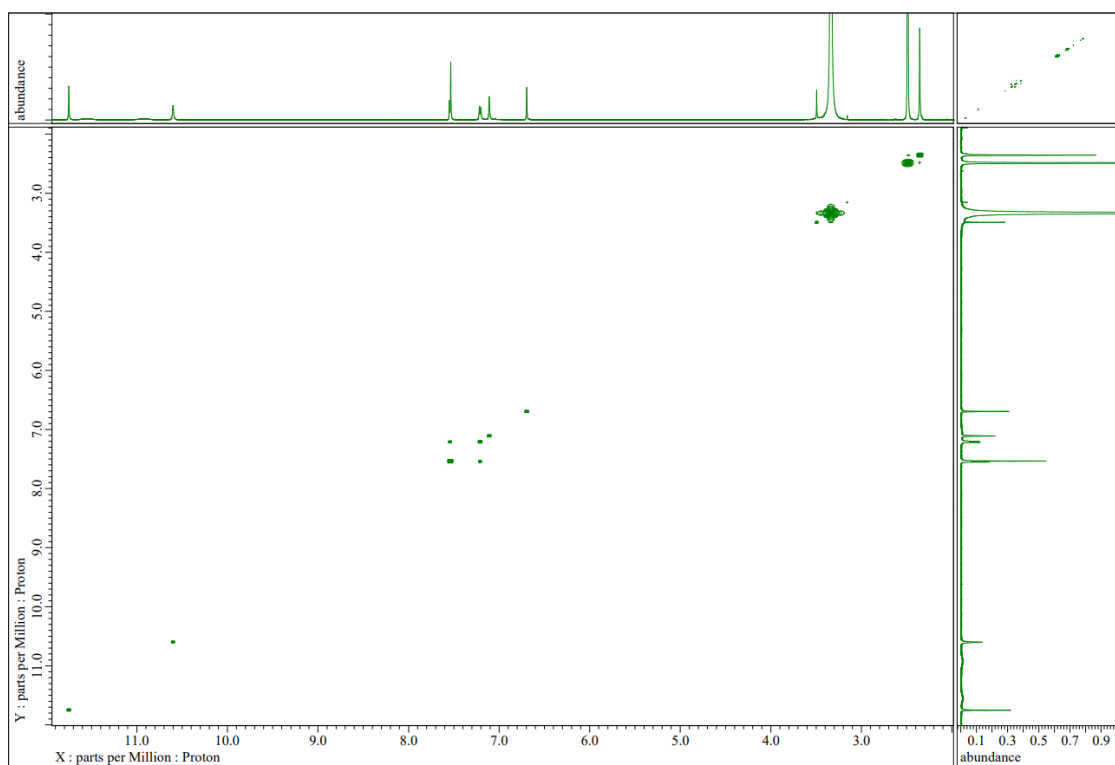


Fig. S12 ^1H - ^1H COSY spectrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) of 6,9-DHT

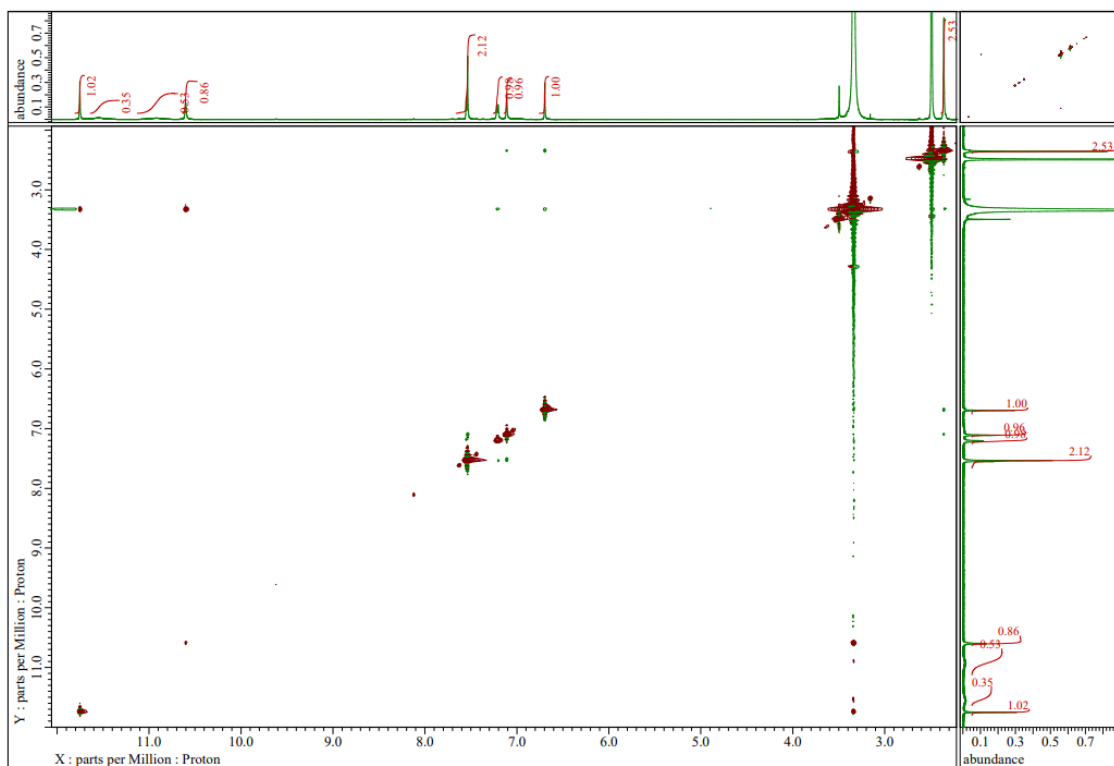


Fig. S13 ROESY spectrum (500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) of 6,9-DHT

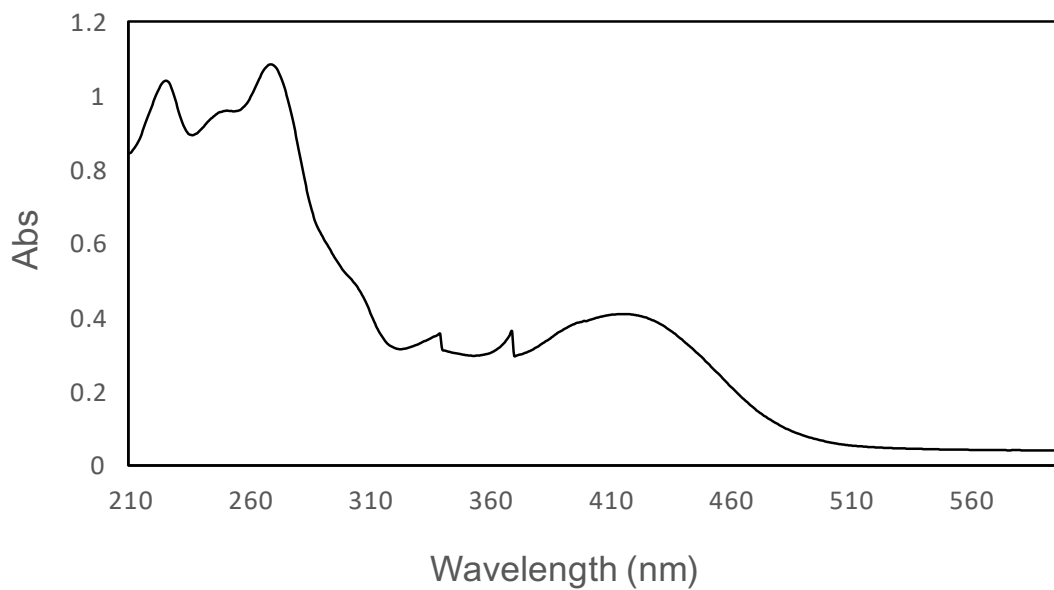


Fig. S14 UV spectrum of KQB

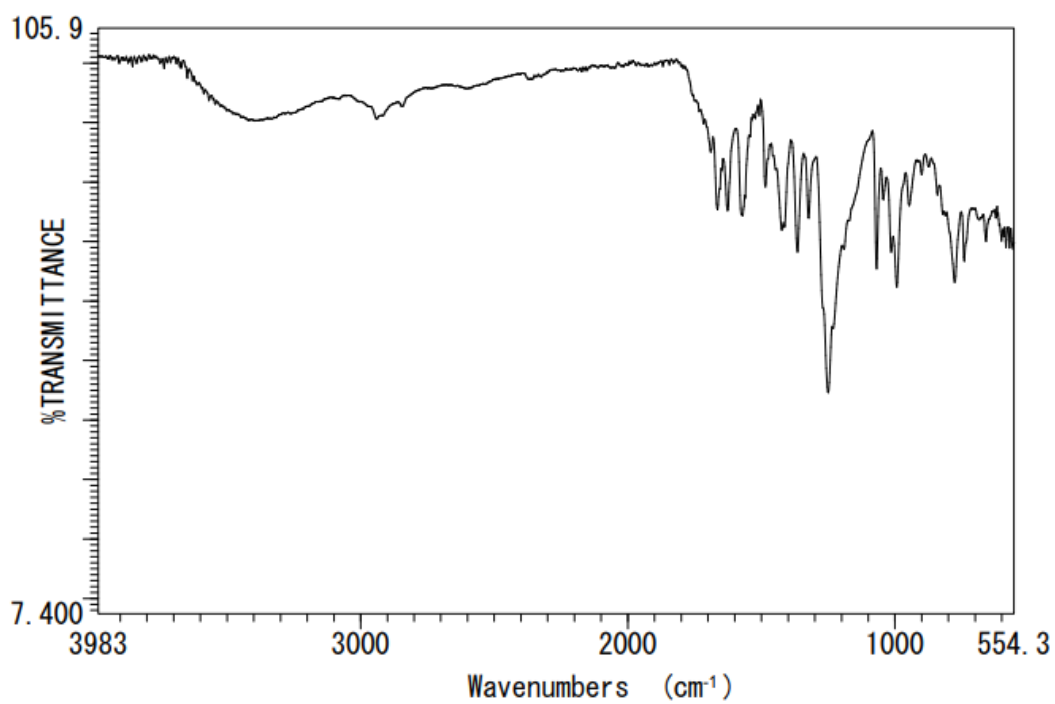
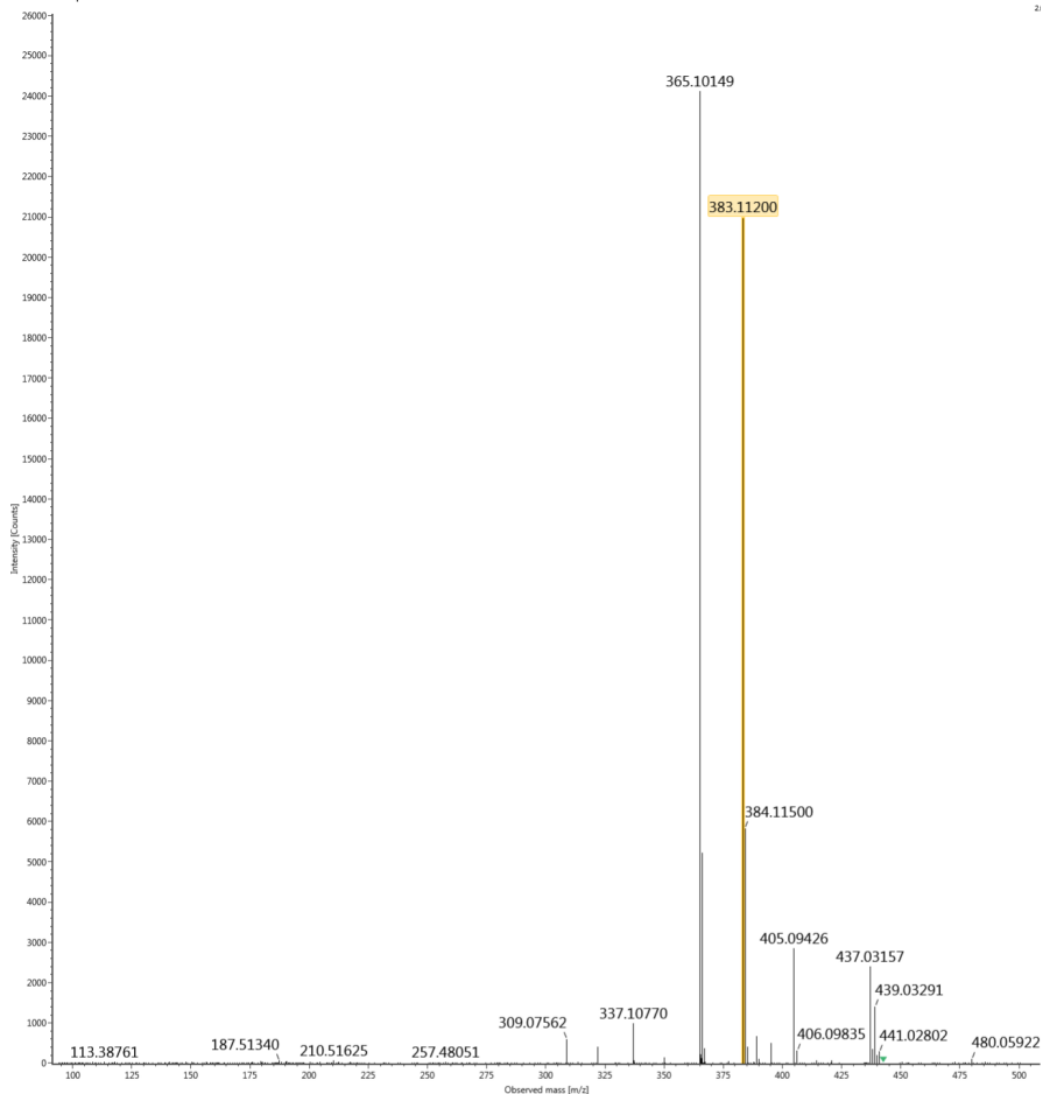


Fig. S15 IR spectrum of KQB

Item name: Takao_pos
Item description:

Channel name: 2: Average Time 2.9572 min : HD TOF MSe (50-1500) 4eV ESI+ : Centroided : Combined

2.9e4



m/z : 383.11200 $[M+H]^+$

Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
C18H10N10O	53.685352	2.582304	8.976976	383.111181	2.142169	0.818533	19.000000
C21H18O7	43.780148	1.638938	12.638206	383.112529	-1.385438	-0.529382	13.000000
C22H14N4O3	1.780024	4.888726	9.374483	383.113867	-4.885559	-1.866795	18.000000
C6H14N12O8	0.438545	2.686312	41.931552	383.113032	-2.700741	-1.031966	6.000000
C5H18N8O12	0.315930	1.769912	55.956666	383.111695	0.799380	0.305447	1.000000

Fig. S16 HRESIMS data of KQB

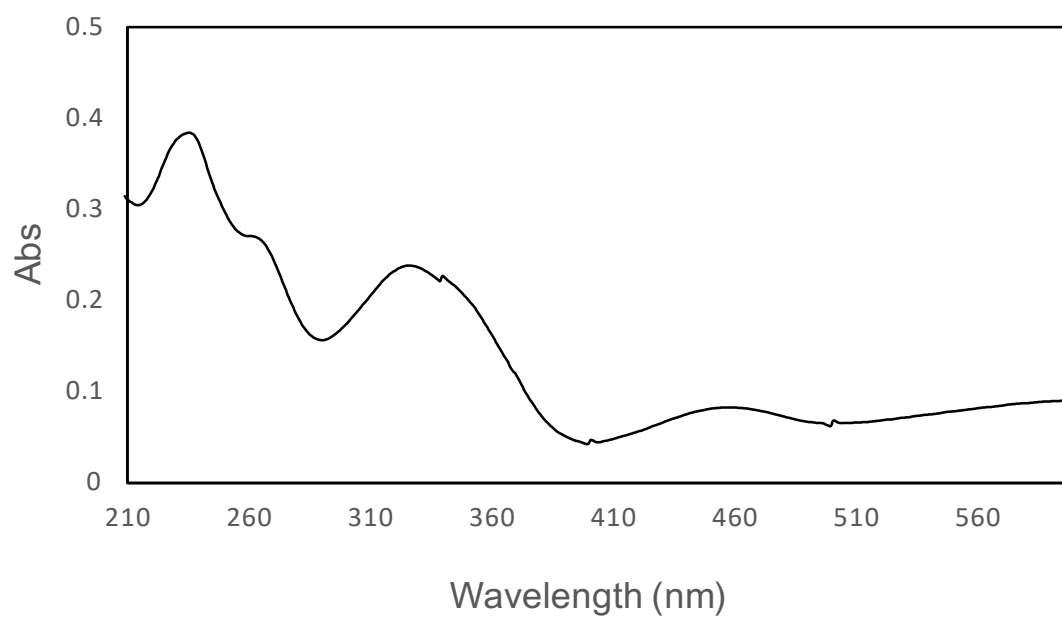


Fig. S17 UV spectrum of 6,9-DHT

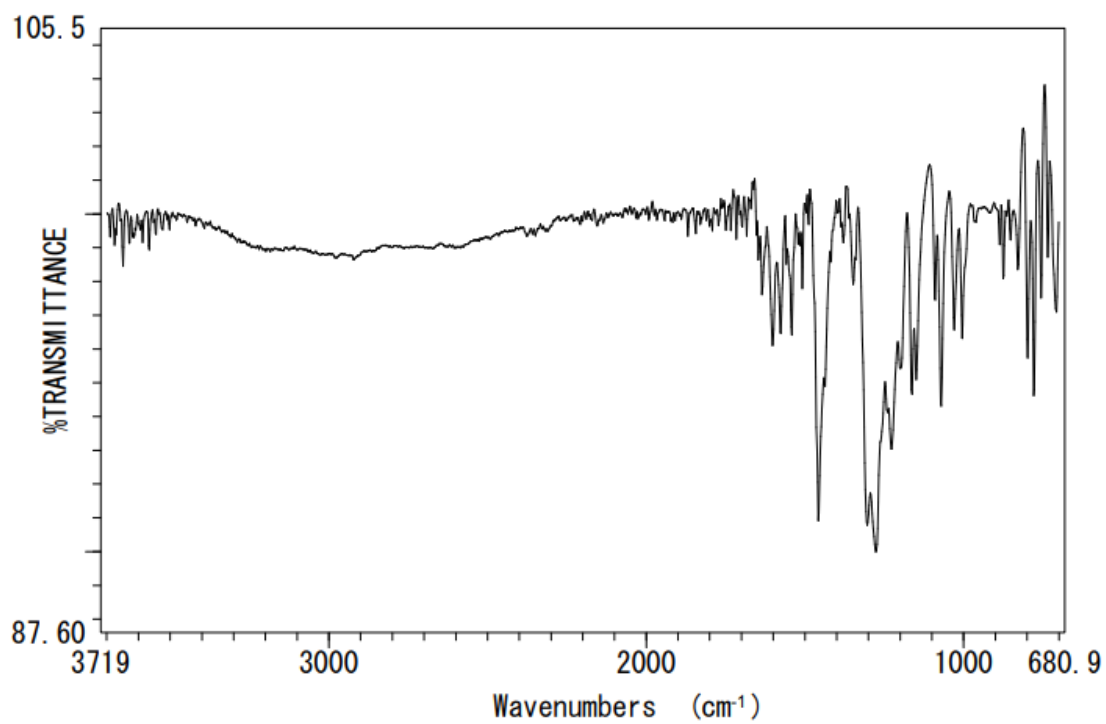
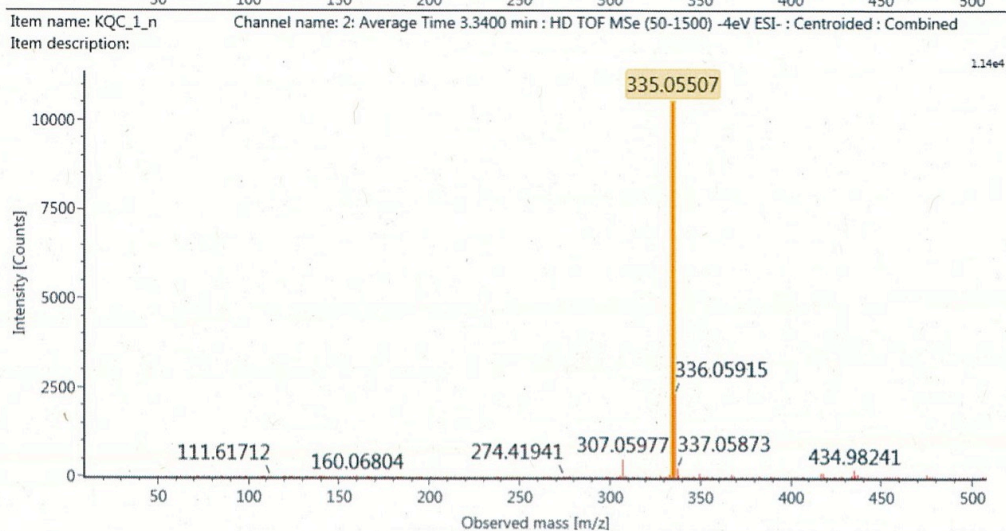
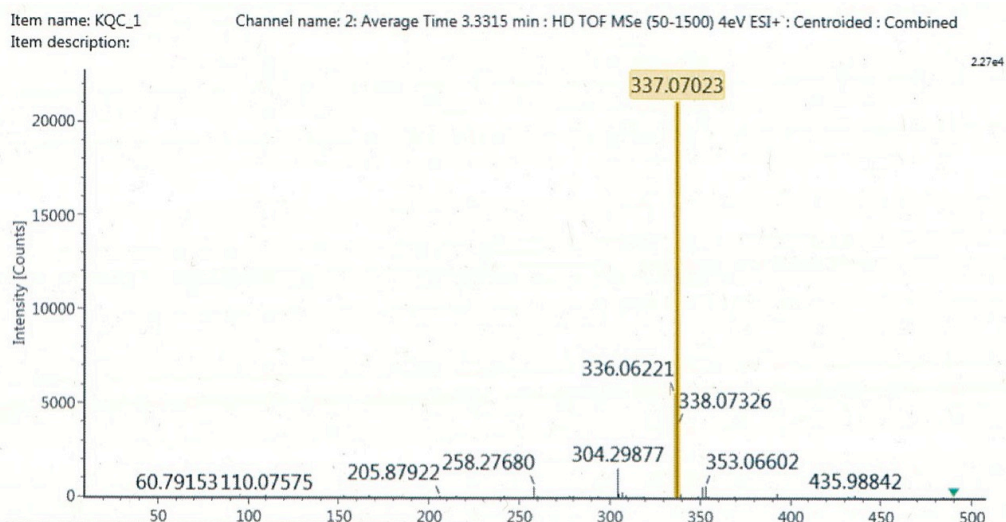


Fig. S18 IR spectrum of 6,9-DHT



m/z : 337.07023 [M+H]⁺

Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
C19H12O6	64.839621	1.662896	15.458554	337.070665	-1.293117	-0.434569	14.000000
C16H4N10	31.618112	3.561063	9.724212	337.069317	2.717784	0.913346	20.000000
C4H8N12O7	2.616406	3.274438	29.503020	337.071167	-2.788621	-0.937152	7.000000
C20H8N4O2	0.925861	5.172042	15.709340	337.072002	-5.272766	-1.771981	19.000000

m/z : 335.05507 [M-H]⁻

Composition	i-FIT Confidence (%)	m/z RMS (PPM)	Intensity RMS (%)	Predicted m/z	m/z error (PPM)	m/z error (mDa)	DBE
C16H4N10	74.334394	2.746748	3.891660	335.054764	0.911290	0.306250	20.000000
C19H12O6	25.164598	3.226917	4.348247	335.056112	-3.099617	-1.041665	14.000000
C15H8N6O4	0.497640	5.733886	7.014112	335.053426	4.890947	1.643663	15.000000

Fig. S19 HRESIMS data of 6,9-DHT

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

OmpR/1-239

OmpR/1-239
PhoB/1-229
JadR1/1-259
Aur1P/1-256
LndI/1-261
LanI/1-261
AfsQ1/1-225
CutR/1-217
KiqA/1-218
ActII-ORF4/1-255
Fur22/1-273
RevQ/1-277

Fig. S20 OmpR ファミリー転写制御因子遺伝子のアミノ酸配列の比較

ClustalW による KiqA および OmpR、非典型 OmpR、SARP のアライメント。使用した各配列の Accession number を以下に示す。OmpR (EHV84278)、*Escherichia coli* DEC7C 由来; PhoB (ACJ50526)、*E. coli* 由来; JadR1 (AAB36584)、*Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 由来; Aur1P (AAX57187)、*Streptomyces lavendulae* subsp. *lavendulae* 由来; LndI (AAU04840)、*Streptomyces globisporus* 由来; LanI (AAO32359)、*Streptomyces cyanogenus* 由来; AfsQ1 (BAA01502)、CutR (CAA16471)、ActII-ORF4 (AAK32147)、*Streptomyces coelicolor* A3(2)由来; Fur22 (BBA98082)、RevQ (BBB01290)、KiqA (BBA97247)、*Streptomyces* sp. SN-593 由来

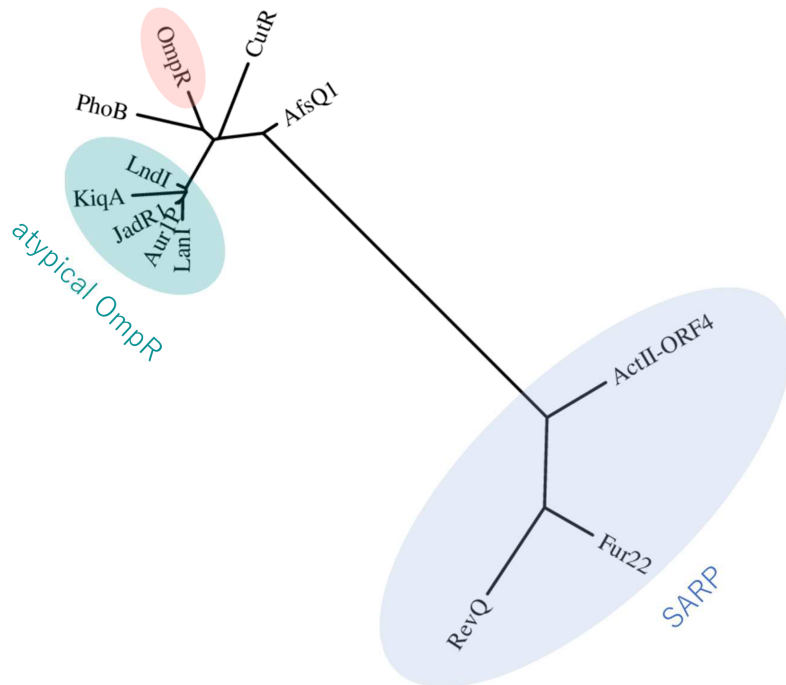


Fig. S21 OmpR ファミリー転写制御因子の系統解析

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)

謝辞

本研究の遂行、本論文の作成にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました理化学研究所 環境資源科学研究センター 天然物生合成研究ユニット ユニットリーダー 兼、埼玉大学大学院理工学研究科連携教授 高橋俊二先生に甚大なる謝意を申し上げます。

本研究の遂行にあたりご指導、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 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 長田裕之博士に心より感謝申し上げます。

KQB 及びその他化合物の精製、NMR 測定、構造解析に関して多くのご指導、御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 技術基盤部門 分子構造解析 ユニット ユニットリーダー 越野広雪博士、環境資源科学研究センター 天然物生合成研究ユニット 特別研究員 坂井克行博士、テクニカルスタッフ 高木海氏に厚く御礼申し上げます。

KQB 及びの HR-MS 測定及び MPLC 精製、IR 測定時に多くのご指導を賜りましたケミカルバイオロジー研究グループ 研究員 野川俊彦博士に心より感謝申し上げます。

遺伝子破壊実験において多くのお力添えをいただきました、環境資源科学研究センター 天然物生合成研究ユニット 佐藤裕美氏に深く感謝申し上げます。

生物活性評価実験において標準評価系システムでの生物活性評価を行って下さった、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、テクニカルスタッフ 高木晴美氏、Rachael Lopez 博士に深く感謝いたします。

本研究の遂行に大きく寄与したベクター (pKU460, pKU503, pKU592) ならびに *sav2794* プロモーターを供与していただいた北里大学 大村智記念研究所 微生物制御工学研究室 教授 池田治生先生、pTYM19 ベクターを供与していただいた東京大学大学院農学生命科学研究科 応用生命工学専攻微生物潜在酵素 (天野エンザイム) 寄付講座 特任教授 尾仲宏康先生、BAC ベクター構築にご協力いただいた産業技術総合研究所 創薬基盤研究部門 最先端バイオ技術探求グループ 研究グループ長 新家一男博士に深く感謝申し上げます。

多岐にわたるご指導を賜りました 埼玉大学 理工学研究科 生命科学専攻分子生物学
コース 戸澤讓教授、仲本準教授、高橋康弘教授、大塚裕一准教授に感謝いたします。

また、所属していた環境資源科学研究センター 天然物生合成研究ユニットの皆様には研
究生活を続けるうえで、多くのアドバイスをいただいた上、精神的にも支えていただき、
大変お話になりました。

最後に、これまでの研究生生活を支えてくれた両親、祖父母に心から感謝いたします。