

# ゲノム情報を利用した新規微生物資源の開拓

菊池 雄太

2024 年 6 月 17 日

# 目次

略語一覧	4
使用機器、試薬、培地一覧	5
緒言	12
第 1 章 未利用細菌からの新規微生物資源の開拓	22
1.1 二次代謝産物生合成遺伝子クラスター解析に基づく各細菌属の天然物生産能力比較 . . . . .	22
1.1.1 細菌の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの網羅的解析 . . . . .	22
1.2 未利用微生物資源 <i>Tumebacillus</i> 属細菌からの天然物探索 . . . . .	24
1.2.1 <i>Tumebacillus</i> 属細菌培養液のスクリーニング . . . . .	24
1.2.2 <i>T. permanentifrigoris</i> JCM 14557 <sup>T</sup> が生産する tumebacin (1) と 4-(2-nitroethyl)phenol (2) の単離 . . . . .	26
1.2.3 <i>T. permanentifrigoris</i> JCM 14557 <sup>T</sup> が生産する Le-pyrrolopyrazine B (3) と tumepyrzazine (4) の単離 . . . . .	27
1.2.4 Tumebacin (1) の構造解析 . . . . .	28
1.2.5 4-(2-Nitroethyl)phenol (2) の構造解析 . . . . .	31
1.2.6 Le-pyrrolopyrazine B (3) の構造解析 . . . . .	32
1.2.7 Tumepyrzazine (4) の構造解析 . . . . .	33
1.2.8 Tumebacin (1) の抗菌活性試験 . . . . .	34
1.3 <i>Tumebacillus</i> 属細菌の選択的分離 . . . . .	35
1.3.1 <i>Tumebacillus</i> 属細菌が示す EtOH 及び熱耐性の検討 . . . . .	35
1.3.2 <i>Tumebacillus</i> 属細菌の 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーの設計とプライマーを用いた PCR の条件検討 . . . . .	36
1.3.3 <i>Tumebacillus</i> 属細菌特異的なプライマーを用いた <i>Tumebacillus</i> 属細菌を含む土壌の選出 . . . . .	41
1.3.4 土壌からの <i>Tumebacillus</i> 属細菌の分離 . . . . .	43
1.4 小括及び考察 . . . . .	48
1.5 実験項 . . . . .	50
1.5.1 antiSMASH を用いた二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの解析 . . . . .	50
1.5.2 新規天然物獲得のための <i>Tumebacillus</i> 属細菌培養液のスクリーニング . . . . .	50
1.5.3 <i>T. permanentifrigoris</i> JCM 14557 <sup>T</sup> が生産する天然物取得 . . . . .	51
1.5.4 取得した化合物の物性測定 . . . . .	52
1.5.5 取得した化合物の構造解析 . . . . .	52
1.5.6 Tumebacin (1) の抗菌活性試験 . . . . .	52
1.5.7 <i>Tumebacillus</i> 属細菌の選択的分離法の開発 . . . . .	53
1.5.8 <i>Tumebacillus</i> 属細菌特異的なプライマーを用いた PCR によって増幅された塩基配列の解析 . . . . .	55
1.5.9 <i>Tumebacillus</i> 属細菌の分離 . . . . .	55

第 2 章	希少放線菌からの新規微生物資源の開拓	57
2.1	二次代謝産物生合成遺伝子クラスターに基づく希少放線菌属の天然物生産能力の比較 . . .	57
2.1.1	二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの統計解析 . . . . .	57
2.1.2	二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの多様性解析 . . . . .	61
2.2	<i>Pseudonocardiaceae</i> 科希少放線菌からの新規天然物探索 . . . . .	64
2.2.1	分子ネットワーク解析を用いた新規天然物の探索 . . . . .	64
2.2.2	<i>Lentzea</i> sp. OK19-0192 が生産する化合物の単離 . . . . .	68
2.2.3	Lentindole (8) の構造解析 . . . . .	70
2.2.4	<i>Kibdelosporangium</i> sp. OK19-0223 が生産する化合物の単離 . . . . .	77
2.2.5	Saccharocarcin A (9) 及び saccharocarcin B (10) の同定 . . . . .	79
2.3	小括及び考察 . . . . .	82
2.3.1	二次代謝産物生合成遺伝子クラスターに基づく希少放線菌属の天然物生産能力の比較	82
2.3.2	<i>Pseudonocardiaceae</i> 科希少放線菌からの新規天然物探索 . . . . .	83
2.4	実験項 . . . . .	85
2.4.1	放線菌の sBGC 解析 . . . . .	85
2.4.2	分子ネットワーク解析を用いた新規天然物の探索 . . . . .	85
2.4.3	<i>Pseudonocardiaceae</i> 科希少放線菌が生産する天然物の取得 . . . . .	89
2.4.4	取得した化合物の物性測定 . . . . .	90
2.4.5	取得した化合物の構造解析 . . . . .	90
総括		92
補足資料		94
謝辞		154
参考文献		155

## 略語一覽

D-FDLA	<i>N</i> <sup>α</sup> -(5-Fluoro-2,4-dinitrophenyl)-D-leucinamide
antiSMASH	Antibiotics and secondary metabolites analysis shell
ATR	Attenuated total reflection
BGC	Biosynthetic gene cluster
BLAST	Basic Local Alingment Tool
COSY	Correlation spectroscopy
DAD	Diode array detector
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNP	Dictionary of Natural Products
ED	Electron diffraction
ESI	Electron spray ionization
EtOAc	Ethyl acetate
EtOH	Ethanol
FBMN	Feature based molecular networking
GCC	Gene cluster clan
GCF	Gene custer family
GNPS	Global natural product social molecular networking
HMBC	Heteronuclear multiple bond quantum coherence
HPLC	High performance liquid chromatography
HR-MS	High resolution mass spectrometry
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HTML	Hyper text markup langage
i.d.	Inner diameter
IR	Infrared absorption
KMN	Known metabolite molecular network
LC-HRMS	Liquid chromatography/high resolution mass spectrometry
MeOH	Methanol
MIC	Minimum inhibitory concentration
MMN	Mediumd molecular network
MN	Molecular network(ing)
MS	Mass spectrometry
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NMR	Nuclear magnetic resonance
NRP	Nonribosomal peptide(s)
NRPS	Nonribosomal peptide synthetase(s)
ODS	Octa Decyl Silyl
PK	Polyketide(s)
PKS	Polyketide synthase(s)
R.T.	Retention time
RiPP	Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide(s)
rpm	Rotation per minute
TS	Terpene synthase(s)
UMN	Unknown metabolite molecular network
UV-vis	Ultraviolet-visible



## 使用機器、試薬、培地一覧

### 分析装置と分析条件

#### NMR 測定装置 (1)

Tumebacin (**1**)、lentindole (**8**)、saccharocarcin A (**9**)、saccharocarcin B (**10**) の NMR 測定は以下の条件で行った。

装置 JNM-ECA-500 (日本電子株式会社)

測定周波数  $^1\text{H}$  NMR 500MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR 125MHz

重溶媒 DMSO- $d_6$  (基準ピーク;  $^1\text{H}$ :2.50 ppm,  $^{13}\text{C}$ :39.52 ppm, D 化率:99.9%、関東化学)

$\text{CDCl}_3$  (基準ピーク;  $^1\text{H}$ :7.26 ppm、 $^{13}\text{C}$ :77.16 ppm、D 化率:99.9%、関東化学)

#### NMR 測定装置 (2)

Tumepyrzine (**4**)、4-(2-nitroethyl)phenol (**2**)、Le-pyrrolopyrazine B (**3**) の NMR 測定は以下の条件で行った。

装置 Agilent 400-MR DD2 (Agilent Technologies)

測定周波数  $^1\text{H}$  NMR 400MHz、 $^{13}\text{C}$  NMR 100MHz

重溶媒 DMSO- $d_6$  (基準ピーク;  $^1\text{H}$ :2.48 ppm、 $^{13}\text{C}$ :39.5 ppm、D 化率:99.9%、関東化学)

$\text{CDCl}_3$  (基準ピーク;  $^1\text{H}$ :7.26 ppm、 $^{13}\text{C}$ :77.00 ppm、D 化率:99.9%、関東化学)

$\text{CD}_3\text{OD}$  (基準ピーク;  $^1\text{H}$ :3.31 ppm、 $^{13}\text{C}$ :49.00 ppm、D 化率:99.8%、関東化学)

#### HPLC 分析装置

システム名 LaChrom Elite (株式会社日立ハイテク)

ポンプ LaChrom Elite L-2130 (株式会社日立ハイテク)

DAD LaChrom Elite L-2455 (株式会社日立ハイテク)

移動相溶媒 MeOH (鹿 1 級、関東化学株式会社)

精製水

ギ酸 (特級、関東化学)

グラジエント 0–12 min: 5–100% MeOH aq. + 0.1% ギ酸

12–14 min: 100% MeOH + 0.1% ギ酸

カラム Capcell Core  $\text{C}_{18}$  3.0 i.d.  $\times$  100 mm (株式会社大阪ソーダ)

## LC-HRMS 分析装置

LC ExionLC (株式会社エービー・サイエックス)

移動相溶媒 MeOH (HPLC-SOL 規格、関東化学株式会社)

蒸留水 (LC/MS 用、富士フイルム和光純薬株式会社)

ギ酸 (LC/MS 用、富士フイルム和光純薬株式会社)

グラジエント 0–2 min: 5% MeOH aq. + 0.1% ギ酸

2–10 min: 5–100% MeOH aq. + 0.1% ギ酸

10–13 min: 100% MeOH + 0.1% ギ酸

流速 0.5 mL L<sup>-1</sup>

カラム Capcell Core C18 3.0 i.d. × 100 mm (株式会社大阪ソーダ)

カラム温度 40°C

MS Triple TOF 5600+ LC-MS/MS System (株式会社エービー・サイエックス)

イオン化モード ESI

## HR-MS 分析装置

装置 Xevo G2-XS Qtof (Waters 株式会社)

イオン化モード ESI

## IR 分光器

装置 フーリエ変換赤外分光器 FT-4600 (株式会社ジャスコ)

測定方式 ATR

プリズム ダイヤモンドプリズム

## UV-Vis 分光器

装置 Spectra Max Quick Drop 分光計 (Molecular Devices)

## 旋光計

装置 デジタル旋光計 P-2200 (株式会社ジャスコ)

ランプ ナトリウムランプ

観測管長 5 cm

## 分取用 HPLC 装置 (1)

*Turebacillus permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> が生産する代謝産物の精製には、以下の分取 HPLC システムを用いた。

システム名 LaChrom Elite (株式会社日立ハイテク)

ポンプ LaChrom Elite L-2130 (株式会社日立ハイテク)

DAD LaChrom Elite L-2455 (株式会社日立ハイテク)

カラム PEGASIL-ODS-SP100 20 i.d. × 250 mm (株式会社センシュー科学)

## 分取用 HPLC 装置 (2)

*Lentzea* sp. OK19-0192 及び *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 が生産する代謝産物の精製には、以下の分取 HPLC システムを用いた。

システム名 Nexera シリーズ (株式会社島津製作所)

脱気装置 DGU-405 (株式会社島津製作所)

ポンプ LC-20AR (株式会社島津製作所)

DAD SPD-M40 (株式会社島津製作所)

カラム PEGASIL-ODS-SP100 20 i.d. × 250 mm (株式会社センシュー科学)

## MicroED (ED 結晶構造解析装置)

電子回折系 XtalAB Synergy-ED (株式会社リガク、日本電子株式会社)

グリッド microgrid Cu200 (日本電子株式会社)

測定温度 293 K

加速電圧 200 keV electrons  $\lambda = 0.0251 \text{ \AA}$

制御ソフトウェア CrysAlisPro for ED (ver. 1.171.43.27a)

## マイクロ融点装置 (融点測定装置)

装置 MP-500P (アナテックヤナコ株式会社)

カバーガラス 角カバーガラス No.1

(厚み:0.12–0.17 mm、18 × 18 mm) (松浪硝子工業株式会社)

## 培地の調整

**Table 1.** 培地組成

Name (Conditions <sup>a</sup> )	Composition	Concentration <sup>b</sup>	Supplier
1 培地	Glucose	1.0%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Starch	2.0%	朝日食品株式会社
	Yeast extract	0.5%	オリエンタル酵母工業株式会社
	Peptone	0.5%	極東製薬工業株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.4%	関東化学株式会社
4 培地	Mannitol	3.0%	関東化学株式会社
	Glucose	1.0%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Yeast extract	0.2%	オリエンタル酵母工業株式会社
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1%	関東化学株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.1%	関東化学株式会社
	Ammonium succinate	0.5%	関東化学株式会社
	Trace metal sol.	1 mL L <sup>-1</sup>	
6 培地	Dextrin	2.0%	関東化学株式会社
	Glucose	0.2%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Soy bean meal	1.5%	農工田中竜商店
	Yeast extract	0.3%	オリエンタル酵母工業株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.3%	関東化学株式会社
8 培地	Peptone	5.0%	極東製薬工業株式会社
	NaCl	0.5%	関東化学株式会社
	Trace metal sol.	1 mL L <sup>-1</sup>	
22 培地	Soluble starch	2.0%	関東化学株式会社
	Glucose	1.0%	富士フイルム和光純薬株式会社
	NZ-amine	0.5%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Yeast extract	0.5%	オリエンタル酵母工業株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.1%	関東化学株式会社
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	0.2 ppm	関東化学株式会社
30 培地	Starch	2.4%	朝日食品株式会社
	Glucose	0.1%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Peptone	0.3%	極東製薬工業株式会社
	Ehrlich bonito extract	0.3%	極東製薬工業株式会社
	Yeast extract	0.5%	オリエンタル酵母工業株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.4%	関東化学株式会社
	Trace metal sol.	5 mL L <sup>-1</sup>	
35 培地	Starch	2.0%	朝日食品株式会社
	Soy bean meal	1.0%	農工田中竜商店
	NaCl	0.3%	関東化学株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.3%	関東化学株式会社
38 培地	Oat meal	2.0%	日本食品製造合資会社
40 培地	Glycerol	3.0%	関東化学株式会社
	Ehrlich bonito extract	2.0%	極東製薬工業株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.2%	関東化学株式会社

<sup>a</sup> 断りがない限り水道水で調製し、pHは無調整とした。

<sup>b</sup> % 濃度は断りがない限り w/v で表した。

**Table 1. 培地組成 (続き)**

Name (Conditions <sup>a</sup> )	Composition	Concentration <sup>b</sup>	Supplier
43 培地	Maltose	5.0%	株式会社 林原
	Fermipan red(Dry yeast)	1.5%	DSM Bakery Ingredients 社
	Ebios tablets	2.5%	アサヒグループ食品株式会社
	KBr	1.0%	富士フイルム和光純薬株式会社
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.05%	関東化学株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.05%	関東化学株式会社
44 培地	Glucose	2.0%	富士フイルム和光純薬株式会社
	L-asparagine	0.5%	富士フイルム和光純薬株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.01%	関東化学株式会社
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.07%	関東化学株式会社
	Yeast extract	0.1%	オリエンタル酵母工業株式会社
51 培地	Glucose	0.5%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Corn steep lequie powder	0.5%	いわき株式会社
	Oat meal	1.0%	日本食品製造合資会社
	Pharmamedia	1.0%	ADM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5%	関東化学株式会社
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.5%	関東化学株式会社
	Trace metal sol.	1 mL L <sup>-1</sup>	
53 培地	Glycerol	2.0%	関東化学株式会社
	Soluble starch	2.0%	関東化学株式会社
	Nutrient broth	2.0%	日水製薬株式会社
	Defatted wheat germ	1.0%	日清ファルマ株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.3%	関東化学株式会社
57 培地	Glucose	2.0%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Peptone	0.5%	極東製薬工業株式会社
	Fermipan red(Dry yeast)	0.3%	DSM Bakery Ingredients 社
	Ehrlich bonito extract	0.5%	極東製薬工業株式会社
	NaCl	0.5%	関東化学株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.3%	関東化学株式会社
60 培地	Soluble starch	2.0%	関東化学株式会社
	Glycerol	0.5%	関東化学株式会社
	Hi-gy B (defatted wheat germ)	1.0%	日清製粉株式会社
	Ehrlich bonito extract	0.3%	極東製薬工業株式会社
	Fermipan red(Dry yeast)	0.3%	DSM Bakery Ingredients 社
	CaCO <sub>3</sub>	0.3%	関東化学株式会社
61 培地	Soluble starch	2.0%	関東化学株式会社
	Yeast extract	0.3%	オリエンタル酵母工業株式会社
	New Silver (Gelatin)	0.3%	新田ゼラチン
65 培地	Soluble starch	1.0%	関東化学株式会社
	Sucrose	2.0%	関東化学株式会社
	Yeast extract	0.3%	オリエンタル酵母工業株式会社
	New Silver (Gelatin)	0.3%	新田ゼラチン
	Trace metal sol.	0.5 mL L <sup>-1</sup>	
66 培地	Glucose	1.0%	関東化学株式会社
	Maltose	2.0%	株式会社林原
	Yeast ext.	0.3%	関東化学株式会社
	New Silver (Gelatin)	0.3%	新田ゼラチン
	Trace metal sol.	0.5 mL L <sup>-1</sup>	関東化学株式会社

<sup>a</sup> 断りが無い限り水道水で調製し、pH は無調整とした。

<sup>b</sup> % 濃度は断りが無い限り w/v で表した。

**Table 1. 培地組成 (続き)**

Name (Conditions <sup>a</sup> )	Composition	Concentration <sup>b</sup>	Supplier
K 培地	Glycerol	2.0%	関東化学株式会社
	Soy Bean Meal	2.0%	農工田中竜商店
	NaCl	0.3%	関東化学株式会社
PDB 培地	Difco PDB	2.4%	BD Difco
Q 培地	Glycerol	2.0%	関東化学株式会社
	Molasses	1.0%	株式会社 EM 生活
	Casein	0.5%	関東化学株式会社
	Polypeptone	0.5%	武田薬品工業株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.1%	関東化学株式会社
B1 培地 (pH 7.0)	Glucose	2.0%	関東化学株式会社
	Soy Bean Meal	2.0%	農工田中竜商店
	Fermipan red(Dry yeast)	0.3%	DSM Bakery Ingredients 社
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1%	関東化学株式会社
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.05%	関東化学株式会社
	KCl	0.05%	関東化学株式会社
	NaCl	0.3%	関東化学株式会社
B2 培地 (pH 7.0)	Glucose	1.0%	関東化学株式会社
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0 %	関東化学株式会社
	Yeast extract	0.5%	オリエンタル酵母工業株式会社
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2%	関東化学株式会社
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.05%	関東化学株式会社
B10 培地	Nutrient broth	3.0%	日水製薬株式会社
301 培地 (pH 7.0, 精製水)	Starch	2.40%	朝日食品株式会社
	Glucose	0.10%	関東化学株式会社
	Peptone	0.30%	極東製薬工業株式会社
	Ehrlich bonito extractt	0.30%	極東製薬工業株式会社
	Yeast extract	0.50%	オリエンタル酵母工業株式会社
	CaCO <sub>3</sub>	0.40%	関東化学株式会社
nbrc-702 培地	Hi-Polypeptone	1.0%	富士フイルム和光純薬株式会社
	Yeast extract	2.0%	オリエンタル酵母工業株式会社
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1.0%	関東化学株式会社
jcm-663 培地	Peptone	0.5%	極東製薬工業株式会社
	Difco beef extract	0.3%	BD Difco
Nutrient broth (NB) 培地 (pH 7.0, 精製水)	Peptone	0.5%	極東製薬工業株式会社
	Difco beef extract	0.3%	BD Difco
ミューラーヒントン培地 (精製水)	Difco Mueller Hinton II Broth	2.2%	BD Difco
R2A 寒天培地 (pH 7.0, 精製水)	R2A broth DAIGO	3.20%	富士フイルム和光純薬株式会社
	TAIYO-AGAR BSL700 (agar)	2%	清水食品株式会社
清野氏寒天培地 (pH 7.0, 精製水)	Starch	1.0%	朝日食品株式会社
	NZ-amine	0.30%	和光純薬工業株式会社
	Yeast extract	0.10%	オリエンタル酵母工業株式会社
	Ehrlich bonito extractt	0.10%	極東製薬株式会社
	TAIYO-AGAR BSL700 (agar)	1.2%	清水食品株式会社

<sup>a</sup> 断りが無い限り水道水で調製し、pH は無調整とした。

<sup>b</sup> % 濃度は断りが無い限り w/v で表した。

**Table 1. 培地組成 (続き)**

Name (Conditions <sup>a</sup> )	Composition	Concentration <sup>b</sup>	Supplier
7 寒天培地 (pH 7.0)	Peptone	0.5%	極東製薬工業株式会社
	Ehrlich bonito extractt	0.5%	極東製薬株式会社
	TAIYO-AGAR BSL700 (agar)	0.8%	清水食品株式会社
GY 寒天培地 (pH 6.0, 精製水)	Glucose	1.0%	関東化学株式会社
	Yeast extract	0.5%	オリエンタル酵母工業株式会社
	TAIYO-AGAR BSL700 (agar)	0.8%	清水食品株式会社

<sup>a</sup> 断りが無い限り水道水で調製し、pH は無調整とした。

<sup>b</sup> % 濃度は断りが無い限り w/v で表した。

**Table 2. Trace metal sol. の組成**

Name (Conditions)	Composition	Concentration	Supplier
Trace metal sol. (精製水, pH 無調整)	FeSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 ppm	関東化学株式会社
	MnCl <sub>2</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	1 ppm	関東化学株式会社
	ZnSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1 ppm	富士フイルム和光純薬株式会社
	CuSO <sub>2</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1 ppm	関東化学株式会社
	CoCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O	1 ppm	関東化学株式会社

## 緒言

### 天然物創薬の始まりと今

生物は生存、生育、種の保存のために炭水化物、タンパク質、脂質、核酸等膨大な数の有機物を変換、合成しており、これらを総称して一次代謝と呼ぶ。また、一次代謝において出発物質から最終産物が作られるまでの経路を一次代謝経路と呼ぶ。これらの代謝経路は基本的に全ての生物種においてほぼ共通しており、この経路に含まれる化合物を一次代謝産物という [1,2]。一方、一次代謝産物以外の化合物を二次代謝産物という [3,4]。二次代謝産物の多くは植物や微生物から発見されており、生産する生物における機能や存在意義が未解明なものが殆どであるが、生薬成分や抗生物質として応用されてきた [3-5]。

1928 年、Fleming が青カビ *Penicillium notatum* から発見した抗菌薬 penicillin は感染症治療薬として広く普及し、多くの人命を救った。この penicillin の発見以降、微生物によって生産される二次代謝産物が有する多様な化学構造と生物活性は注目されるようになり、微生物由来二次代謝産物の探索が始まった [6,7]。1939 年には、Dudlos によって細菌 *Brevibacillus brevis* から最初の細菌由来抗菌活性物質である tyrothricin が発見された [8]。後に、この化合物は抗菌活性を示すペプチドである gramicidin 類と tyrocidine の混合物であることが示されている [9,10]。1940 年代以降、streptomycin (アミノグリコシド系)、erythromycin (マクロライド系) 及び chloramphenicol (アンフェニコール系) 等様々なクラスの抗生物質が相次いで発見され、それらの一部は現代の臨床現場でも継続利用されている [6,7,11]。一方、1970 年代には、微生物が生産する天然物から取得される生物活性物質が既知化合物に同定される傾向が強まり、微生物由来の新規生物活性物質探索は低迷の一途を辿った [7,12]。1990 年代からは、新たな薬剤候補を網羅的に探索する手法として、膨大な合成化合物ライブラリーを構築するコンビナトリアルケミストリーの様な新たな化学合成分野が台頭しつつある [13,14]。その上、不斉触媒による合成 [15,16]、生合成経路を模倣するバイオミメティック合成 [17]、及び生合成酵素を反応触媒として利用するケモエンザイマティック合成 [18-21] 等の開発が進み、有機合成化学がカバーできる化学空間は大きく拡張されてきた。このような技術発展に伴い、合成化学分野の創薬展開がますます重要視されるようになった。しかし、二次代謝産物が有する化学空間は合成化合物を未だに凌駕している上、医薬品のそれに近いとされる [22,23]。そのため、微生物由来二次代謝産物は医薬品開発の重要な基盤の一つであり続けており、今後も新たな化合物の供給が期待されている [5,11-14,24,25]。

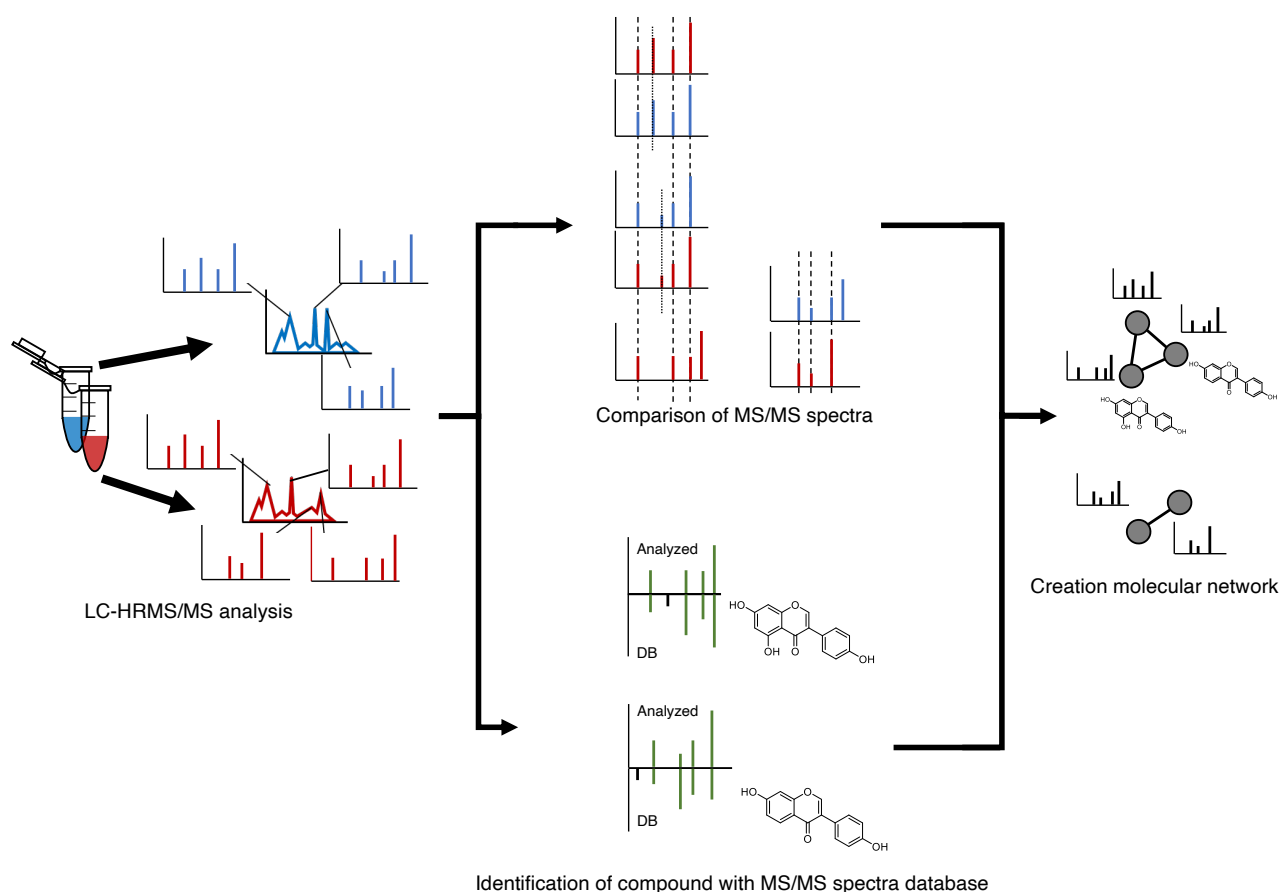
### 微生物由来二次代謝産物の探索

微生物由来の新規二次代謝産物を供給し続ける為には、新規二次代謝産物探索における探索手法の改善と探索源の拡張が求められる。微生物由来二次代謝産物を探索する手法は、生物活性スクリーニングと physico-chemical (PC) スクリーニングの 2 つに大別される [26]。生物活性スクリーニングでは、ペーパーディスク法や微量液体希釈法等を用いて微生物培養液やその抽出物等のサンプルが示す生物活性を評価し、これを指標として生物活性化合物を探索する。生物活性スクリーニングは、主に抗生物質を探索することを目的に、微生物由来二次代謝産物探索が始まった頃から実施される所謂伝統的な手法であるが、近年においてはロボティクス技術と組み合わせることでこれまで以上のスループットを実現している等、近代的な発展が見られる [27]。一方、PC スクリーニングでは、呈色試薬、各種クロマトグラフ、分光器及び質量分析装置等を用いてサンプルに含まれる化合物が示す物性を分析し、これを指標として新規性が高い二次代謝



産物を探索する。また、近年の分析装置、演算装置、データ解析技術及びデータベースの発展により、PC スクリーニングとオミクス解析を組み合わせることが可能となり、より網羅的な二次代謝産物探索が実現している [12,28–30]。

それら網羅的な探索手法の 1 つに、高速液体クロマトグラフィー-高分解能タンデム質量分析計 (LC-HRMS/MS) より得られた化合物のフラグメントパターン (MSMS スペクトル) を解析することで化合物間の類似性を明らかにする、分子ネットワーク解析がある (Fig. 1) [29,31]。本解析手法は、MSMS スペクトルデータベースを用いることでサンプルの中化合物の同定を同時に実施できる。これにより、既知化合物やそれらの類縁体の予測を可能とし、多種多様な化合物が含まれる微生物培養液からの新規天然物探索を効率化する。本手法を実用化するためには、高分解能を有するタンデム質量分析装置、膨大な MSMS スペクトルデータを処理可能な解析ソフトウェアと高性能演算装置及び充実した MSMS スペクトルデータベースが要求される。従って、分子ネットワーク解析は、近年の様々な技術発展により実現した網羅的解析手法の一つであると言える。以上の様に、新規二次代謝産物探索の探索手法は、技術的な発展と共に確かな進化を遂げてきた。



**Fig. 1.** LC-HRMS/MS 分析結果から分子ネットワークが構築されるまでの流れ

## 二次代謝産物探索における微生物資源としての細菌

新規二次代謝産物の探索手法は近代の技術発展に伴い改善されてきた一方、二次代謝産物探索における微生物資源はあまり拡張されていない。Fig. 2 に、細菌属毎の天然物報告数をまとめた。細菌からはこれまでに 20,000 以上の天然物が発見されており、これは微生物由来天然物の 4 割程度であることから、細菌は天然物の重要な探索源であるといえる [32]。List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature の統

計によると、2005 年頃からは毎年 100 属程の細菌が新たに発見及び報告され、現在では合計 3,000 属以上が報告されている [33,34]。一方、二次代謝産物をはじめとする細菌由来天然物が発見されている属はその僅か 1 割ほどである。さらに、そのような化合物の 5 割以上はこれまで、*Streptomyces* 属、*Bacillus* 属及び *Pseudomonas* 属といった限られた分類群から発見されてきた (Fig. 2) [32]。これらのことから、細菌は天然物の探索源として未だ十分に活用されてなく、未利用微生物資源が残されていると言える。粘液細菌において細菌の多様性と二次代謝産物の多様性の関係を調査した研究では、これら二つは正の相関にあることが示唆されている [35]。このことから、未利用微生物資源を探索源として開拓することで新規天然物の取得が期待されるが、限られた時間と費用の中で、全ての未利用細菌について網羅的な代謝産物解析を実施することは事実上不可能に近い。従って、天然物生産能を有する細菌を予測し、予測した細菌から天然物を探索することが微生物資源の開拓において重要であると考えられる。

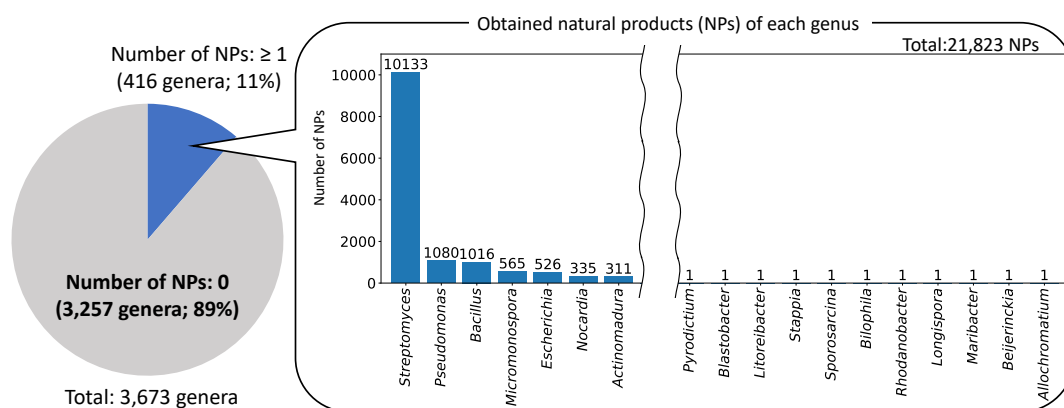


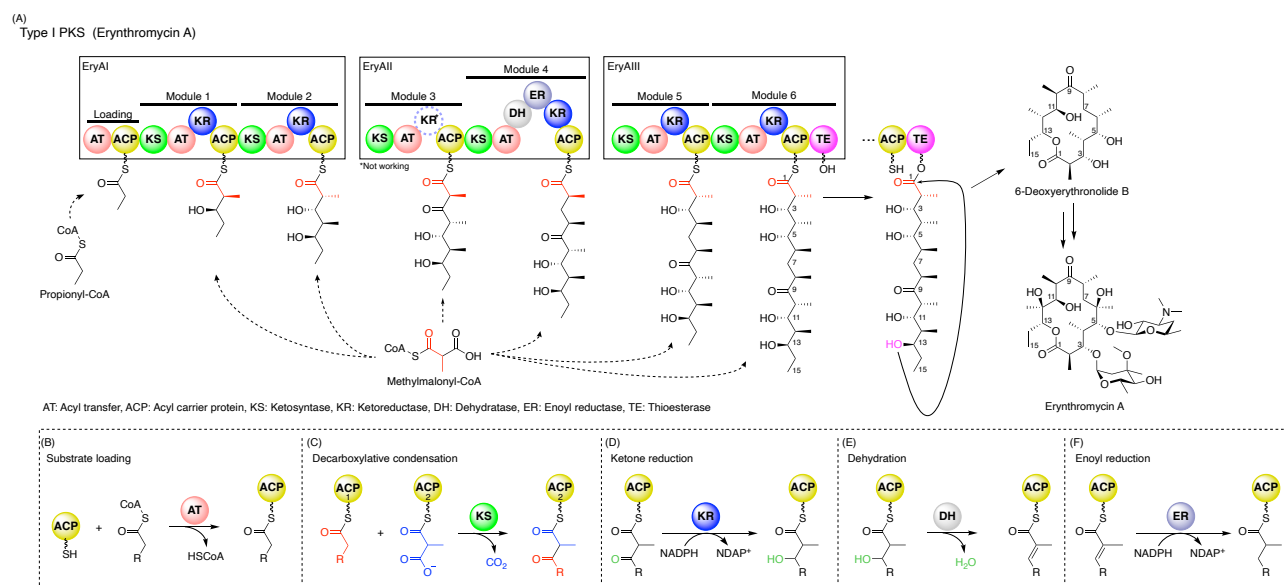
Fig. 2. 細菌属毎の天然物 (NPs) 報告数

## 二次代謝産物のクラスと生合成様式

冒頭でも述べた通り、抗生物質等に応用される有用な天然物は二次代謝産物が殆どである。また、それら二次代謝産物は、生合成様式に基づいてクラス分けされる。多数知られるクラスの中でもポリケチド (polyketide; PK)、非リボソームペプチド (nonribosomal peptide; NRP)、テルペン (terpene; TP) 及びリボソーム翻訳後修飾ペプチド (ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide; RiPP) は、構造的多様性に富み様々な生物活性物質を含むため、細菌由来二次代謝産物の探索において特に重要なクラスである。

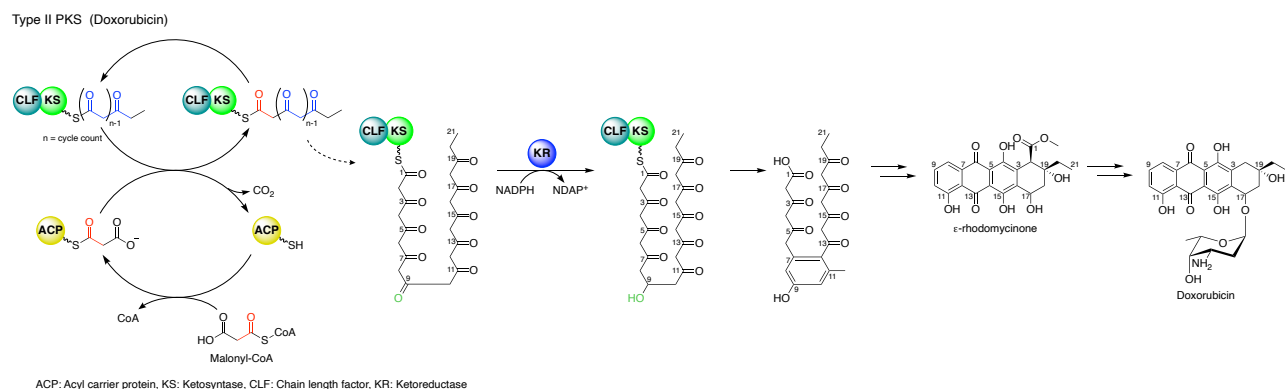
PK は、酢酸ユニットを基本単位としたポリケチド鎖を骨格とする化合物の総称であり、このポリケチド鎖はポリケチド合成酵素 (polyketide synthase; PKS) によって合成される。また、erythromycin の様なマクロライド系抗生物質やテトラサイクリン系抗生物質等は本クラスに分類される。PKS は、アシル基質およびマロニル酸類の脱炭酸を伴うクライゼン様縮合を触媒することでポリケチド鎖合成を開始し、合成したポリケチド鎖に対して同様の機構でマロニル酸類を段階的に縮合させることでポリケチド鎖を伸長させる [36]。さらに、I 型 PKS (後述) は、ポリケチド鎖の伸長過程で生じた  $\beta$ -ketone の修飾を触媒することで、ポリケチド鎖の構造を多様化する。PKS は、そのタンパク構造によって I 型、II 型及び III 型 PKS に大別される [37]。I 型 PKS は、1 つのタンパク上に 1 つ以上のモジュール (構造単位) が存在し、それらモジュールは複数のドメイン (機能単位) から構成されている (Fig. 3)。伸長モジュールのケトシンターゼ (ketosynthase; KS) ドメインは、前のモジュールのアシルキャリアプロテイン (acyl carrier protein; ACP) ドメイン上に存在する phosphopantetheinyl 基由来のチオール基にロードされたアシル基質 (もしくは伸長過程のポリケチド鎖) と、KS と同じモジュールの ACP にロードされたマロン酸類のクライゼン様縮合反応

を触媒する。この反応により、 $\beta$ -ketone を有する中間体が生じる。さらに、同モジュール内に存在する 修飾ドメイン (ケト還元ドメイン、脱水ドメイン等) により、 $\beta$ -ketone の還元反応等が触媒される。最後のモジュールまで伸長が繰り返された後、一般的には終止モジュールのチオエステラーゼ (thioesterase; TE) ドメインによって加水分解あるいは環化を伴いながらポリケチド鎖が PKS から切り出される。



**Fig. 3.** I 型 PKS による erythromycin A の生合成 (A)、AT ドメインによる基質の取り込み (B)、KS ドメインによる脱炭酸を伴うポリケチド鎖の伸長 (C)、KR ドメインによるケトン基の還元 (D)、DH ドメインによる脱水 (E) 及び ER ドメインによるエノイルの還元 (F) [38–41]

一方、II 型 PKS は I 型 PKS とは異なりドメインが 1 つのタンパク上に存在しているのではなく、サブユニットと呼ばれる個々の酵素に分かれており、それらが繰り返し縮合反応を触媒することでポリケチド鎖を伸長する (Fig. 4)。また、II 型 PKS では伸長過程で  $\beta$ -ketone の修飾は起きない。



**Fig. 4.** II 型 PKS による doxorubicin の生合成 [42]

III 型 PKS では、ホモ二量体を形成した KS が繰り返し縮合反応を触媒することでポリケチド鎖を伸長するだけでなく、クルクミン生合成で見られる様に伸長後のポリケチド鎖同士の縮合も触媒する (Fig. 5) [43,44]。これら PKS によって合成されたポリケチド鎖は、時に種々の修飾酵素による修飾を受けたり、環化されることで最終産物となる。

Type III PKS (Chalcon and Curcumin)  
 Chalcon biosynthesis pathway: R=OH  
 Curcumin biosynthesis pathway (major): R=H

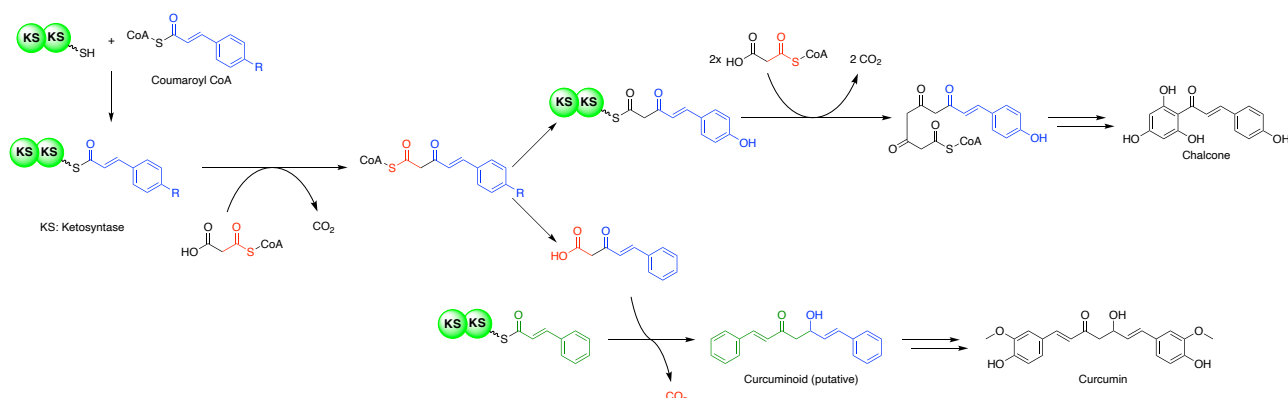
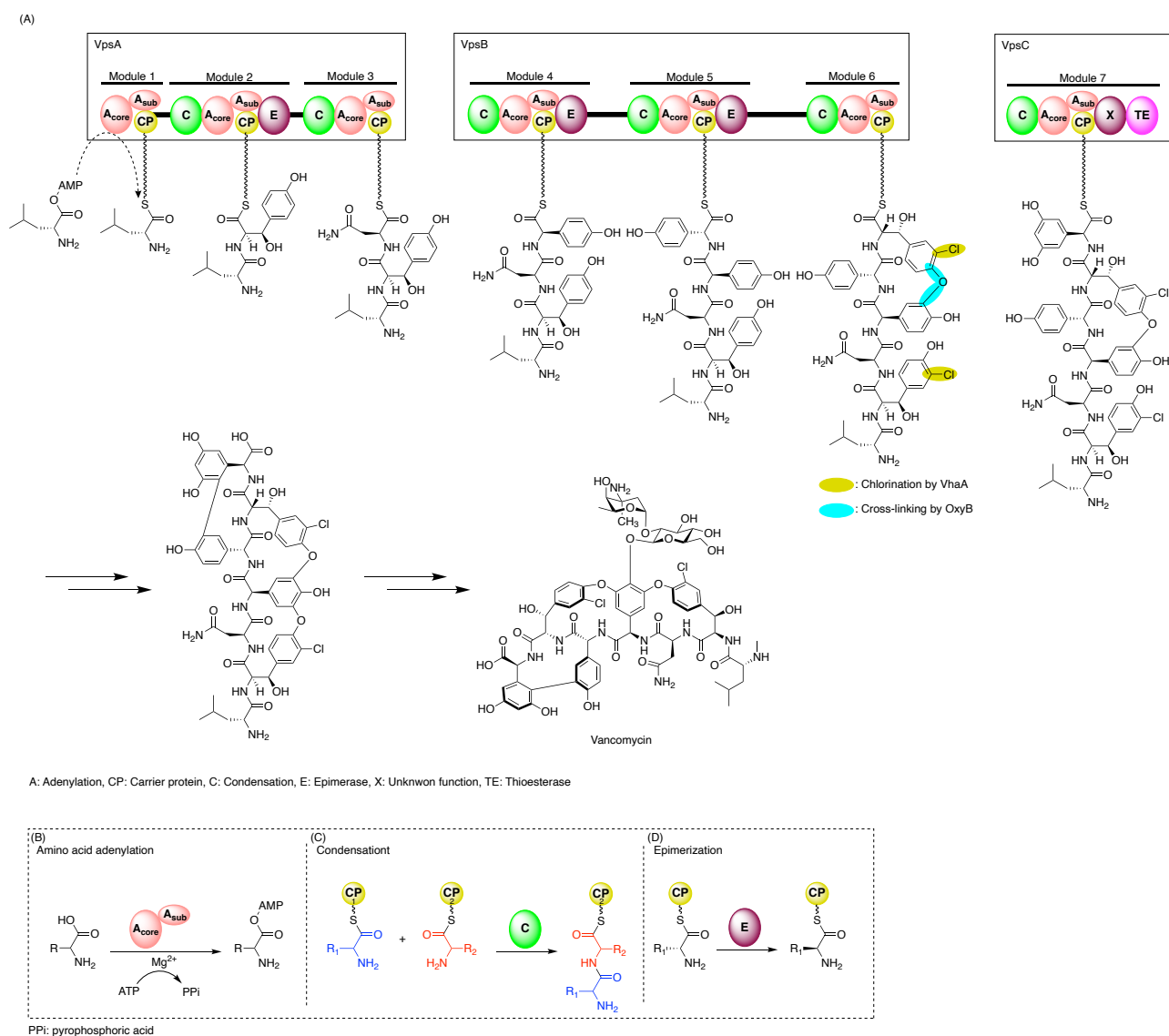


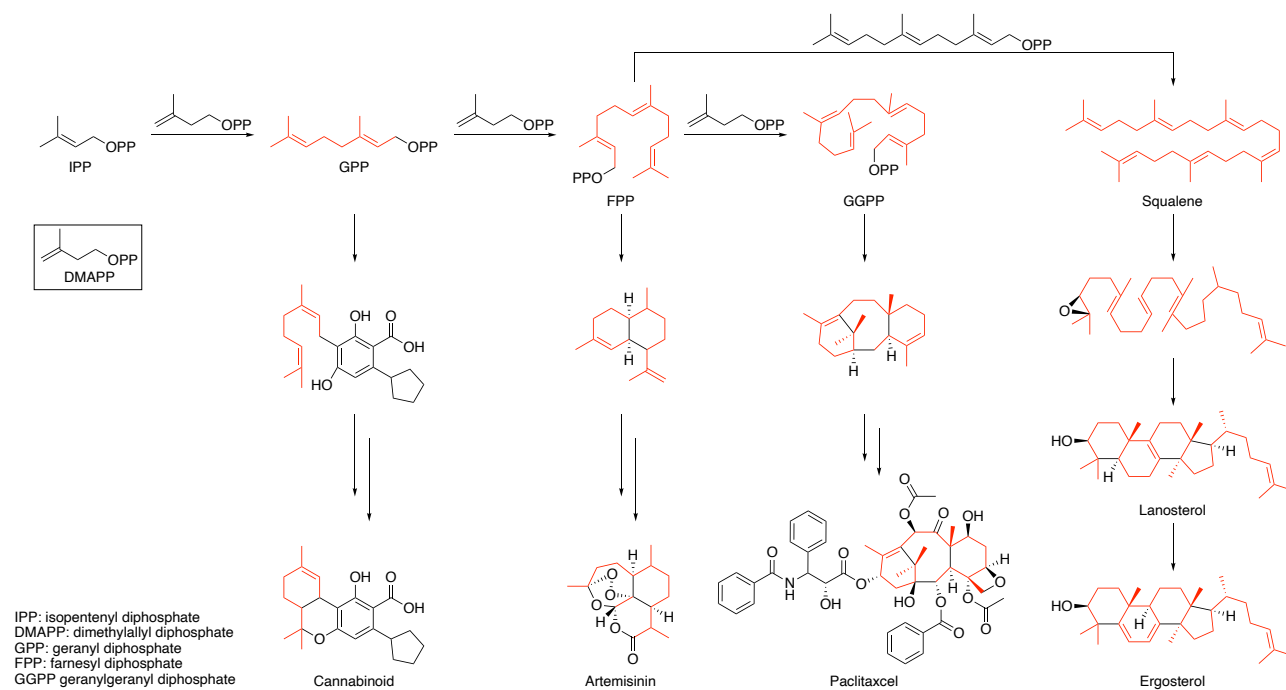
Fig. 5. III 型 PKS による chalcon および curcumin の生合成 [43–47]

NRP は、非リボソームペプチド合成酵素 (nonribosomal peptide synthetase; NRPS) によって合成されるペプチド鎖を骨格とする化合物の総称である。また、gramicidin 類や tyrocidine 類等のペプチド系抗生物質及び vancomycin 等のグリコペプチド系抗生物質等はこのクラスの化合物である。NRPS は、非タンパク構成アミノ酸を含むさまざまなアミノ酸を基質とし、それらのアミノ酸のペプチド結合形成を触媒することでペプチド鎖を合成する (Fig. 6) [48]。NRPS は、I 型 PKS と同様にモジュール型酵素であり、1 つのモジュールが 1 つのアミノ酸のペプチド結合形成反応を触媒する。NRPS によるペプチド鎖合成では、アデニレーション (adenylation; A) ドメインがアミノ酸を ATP を用いて AMP 化し、同モジュールのキャリアプロテイン (carrier protein; CP) 上に存在する phosphopantetheinyl 基由来のチオール基へと結合させる。コンデンセーション (condensation; C) ドメインは、同モジュールの CP ドメインに結合したアミノ酸と前のモジュールの CP ドメインに結合したアミノ酸 (もしくは伸長過程のペプチド) 間のペプチド結合形成を触媒することでペプチド鎖を伸長する。一連のペプチド結合形成がモジュール分繰り返された後、一般的には最後のモジュール上の TE ドメインによってペプチド鎖が加水分解あるいは環化を伴いながら NRPS から切り出される。また、切り出されたペプチド鎖はその後、種々の修飾酵素により修飾されることがある。



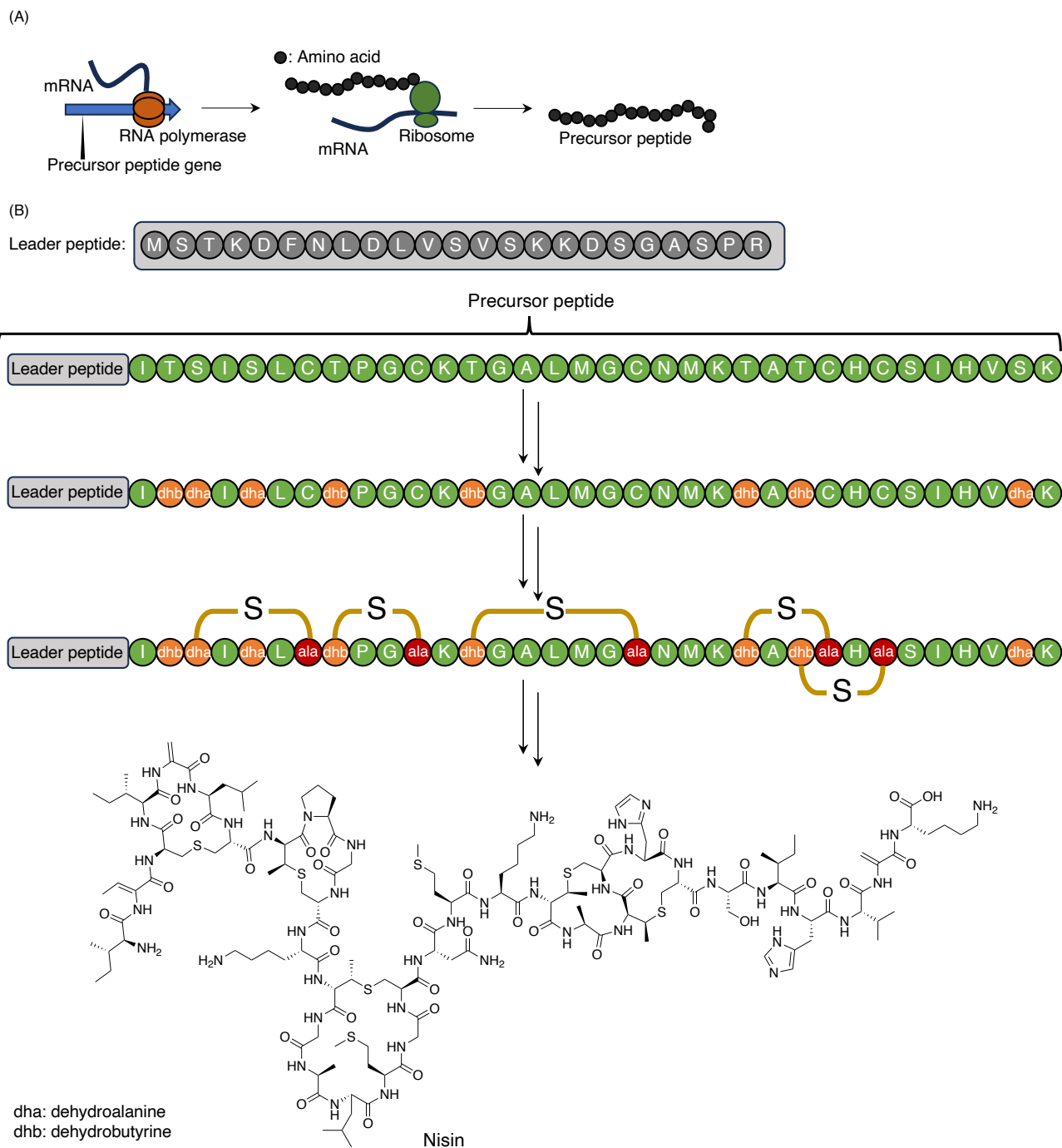
**Fig. 6.** NRPS による vancomycin の生合成 (A)、A ドメインによるアミノ酸のアデニル化 (B)、C ドメインによるペプチド鎖の伸長 (C) 及び E ドメインによるエピメリ化 (D) [49]

TP は、多数のイソプレヌユニットから構成される化合物の総称である。それらイソプレヌユニットは、ジメチルアリルニリン酸とイソペンテニルニリン酸の縮合によって形成される [36]。TP に分類される生物活性物質は、artemisinin (抗マラリア薬) や paclitaxel (抗がん薬) 等、植物に由来する化合物が著名である。一方、幅広い細菌がテルペン合成酵素 (terpene synthase; TS) を有し、抗菌活性物質を含む様々なテルペン類を生産することが知られている [50,51]。TS はジメチルアリルニリン酸にイソペンテニルニリン酸を連続的に縮合させることでイソプレニル鎖を伸長させるが、伸長の段階毎に異なる TS が反応を触媒する (Fig. 7)。TP 合成の経路には、適当な長さまで伸長したイソプレニル鎖が種々の酵素による環化や修飾を受けることで最終産物が合成される経路の他、ergosterol 合成経路の様に合成されたイソプレニル鎖同士が結合し、その後環化や修飾を受ける経路も存在する。



**Fig. 7.** TS による cannabinoid、artemisinin、paclitaxel 及び ergosterol の生合成 [36]

RiPP はリボソームによって合成された前駆体ペプチドが修飾酵素によって修飾されたペプチド化合物の総称である。また、抗グラム陽性菌活性物質である thiostrepton や nisin 等は RiPP クラスの二次代謝産物である。RiPP の前駆体ペプチドはタンパク合成と同様に、ゲノム上に存在する遺伝子領域から転写された mRNA がリボソームによって翻訳されることで合成される (Fig. 8) [52]。



**Fig. 8.** RiPP 前駆体ペプチドの翻訳 (A) 及び前駆体ペプチドからの nisin の生合成 (B) [53–55]

以上の様に、多くの場合二次代謝産物は、骨格の合成及び修飾といった多段階な酵素反応によって生産される。



## ゲノム解析に基づいた天然物生産能力 (二次代謝産物生産能力) の推定

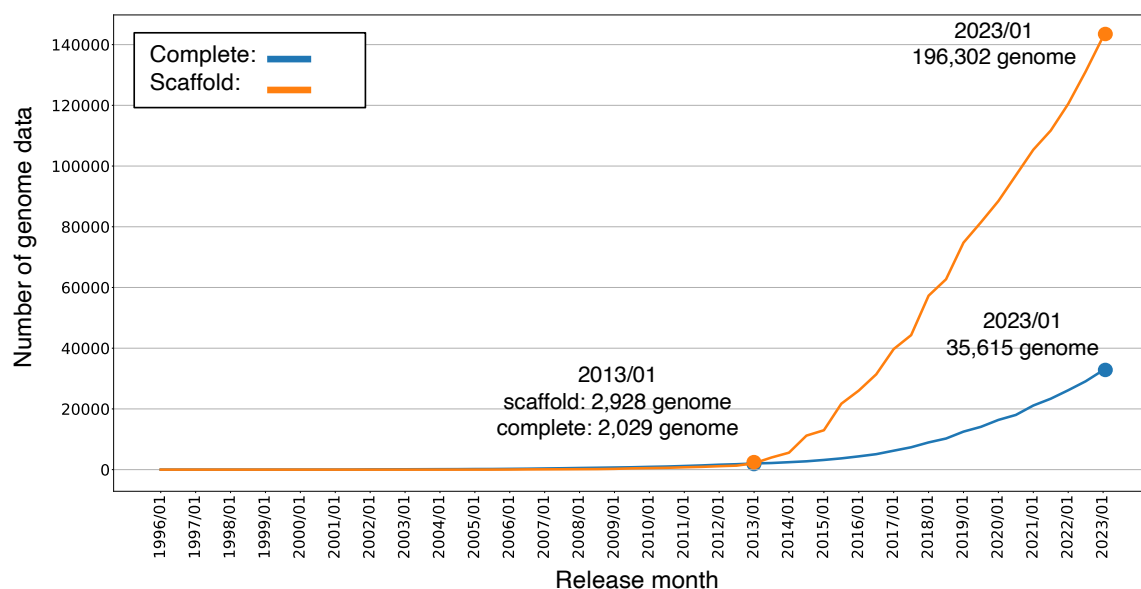
先に述べた様に、多くの二次代謝産物は他段階な酵素反応によって生産される。一般に、一つの二次代謝産物の生合成に関与する酵素をコードする生合成遺伝子は、互いに近傍に集まることで二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (secondary metabolite biosynthesis gene cluster; sBGC) を形成している [56]。すなわち、細菌ゲノム上に存在する sBGC を調べることで、その細菌がどのような二次代謝産物を生産するか予測可能である。近年のゲノム解析技術の発展並びに解析データの蓄積により、sBGC の解析ツールが生み出され、ゲノム中の sBGC を解析することが非常に容易になった。

Antibiotics & Secondary Metabolite Analysis SHell (antiSMASH) は sBGC 解析ツールの一つである [57]。本ツールは既知の sBGC 情報に基づき、入力されたゲノム配列から sBGC を予測及び検出する。この予測では隠れマルコフモデルを用い、各遺伝子が持つタンパクドメインから sBGC とその生合成コア遺伝子を予測する。そのため既知の sBGC と全体的な一致率が低い sBGC であっても、sBGC の領域と生合成タイプを推定することが可能である。すなわち、本ツールは、どのような二次代謝産物を生産するか不明な細菌を含めた広範な細菌について sBGC を解析することで、それら細菌の二次代謝産物生産能を予測することができる。

## 二次代謝産物生産能力を有する細菌の探索

塩基配列解析技術の発展により、低コストかつ短時間でゲノムシーケンスの解析が可能となり、データベースに保存されている細菌のゲノム数が急増している。例えば、National Center for Biotechnology Information が管理している塩基配列データベースである GenBank [58] に登録されているゲノム数は、2013 年頃では complete ゲノムが約 2,000、scaffold ゲノムは約 3,000 であるのに対し、2023 年には complete ゲノムが約 35,000 (17 倍)、scaffold ゲノムは約 200,000 (60 倍) となる等、ここ 10 年の間にデータベースから利用できるゲノムデータの数は一急増した (Fig. 9) [59]。そして、アクセス可能なゲノムデータ数の増加と前述したゲノム解析ツールの発展により、多種多様な細菌ゲノムの解析が実施されるようになった。これに伴い、どのような細菌群がどれだけの sBGC を有するか徐々に明らかになり、これまで二次代謝産物の供給源として認識されていなかった一部の細菌が実際には様々な sBGC を持つことが示されている。Brinkmann らは、600 の *Bacteroidetes* 門 (現 *Bacteroidota* 門) ゲノムを antiSMASH を用いて解析し、*Chitinopfaga* 属が sBGC を豊富に有することを明らかにした [60]。さらに、質量分析に基づいた代謝産物解析により、本属細菌が天然物生産能に優れていることを示した。また、Ueoka らは、antiSMASH database に登録されているゲノム解析の結果から、transAT polyketide synthase の生合成遺伝子を含む sBGC を有する細菌を探索し、それまで天然物が取得されていない *Gyneria* 属細菌から新規天然物の取得を達成した [61]。これらのことから、sBGC の数や種類に基づいて天然物生産能に優れた細菌を予測し天然物を探索することで、新規微生物資源の開拓並びに新規天然物の取得が期待される。一方、これらの研究に用いられているゲノムは公開されているゲノムデータの一部であるため、新規微生物資源開拓には大幅な余地が残されている。また、一部細菌属が天然物生産能に優れている可能性に言及してはいるものの、それら細菌属を新たに環境から分離する試みは無く、既存微生物資源の利用に留まっている。





**Fig. 9. GenBank に登録されているゲノムデータ数の推移**  
GenBank の FTP サーバーから 2023/12/16 にダウンロードした prokaryotes.txt ファイルに基づく。

## 本研究について

本研究では、sBGC の数と取得天然物数を属毎に比較する事で、微生物資源の開拓を試みた。第 1 章では、List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature に正式な菌名として登録されており、GenBank に登録されている全ての細菌ゲノムについて sBGC を解析することで、天然物生産能力に優れた未利用細菌を予測した。さらに、それら細菌から天然物を探索することで天然物生産能力の裏付けを試みた。また、予測が裏付けられた属について選択的な分離法を開発し、土壌サンプルより新たな菌株の取得を試みた。第 2 章では、同様の手法を放線菌 (*Actinomycetota* 門細菌) に適用し、天然物生産能力に優れた希少放線菌 (*Streptomyces* 属以外の放線菌) を予測した。さらに、分子ネットワーク解析を応用する事でそれら希少放線菌の代謝産物を網羅的に解析し、新規天然物を探索した。

## 第1章

### 未利用細菌からの新規微生物資源の開拓

#### 1.1 二次代謝産物生合成遺伝子クラスター解析に基づく各細菌属の天然物生産能力比較

List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) によると、2020 年時点で約 3,000 属の細菌が報告されている。それら細菌の内、放線菌、藍藻及び粘液細菌と呼ばれる分類群は、二次代謝産物生産能力に優れていることが知られ、二次代謝産物の探索源として着目されてきた [62–68]。一方、放線菌、藍藻類及び粘液細菌以外のほとんどの細菌は、天然物が 1 つも得られていない、もしくは得られていてもわずかであり、それら細菌が有する天然物生産能力に関する知見は乏しい [69]。しかし、近年のゲノム解析技術の発展により、天然物未取得な細菌のゲノム情報が得られる様になり、ゲノムから天然物生産能力を解析することが可能となった。

一般に、一つの二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (sBGC) は一つの二次代謝産物 (誘導体を含む) の生合成に関与しているため、多種多様な sBGC を保有する細菌は多くの二次代謝産物を生産すると予想される [56]。Ueoka らは sBGC の種類や数を菌株間で比較することで、*Gynuella sunshinyii* YC6258<sup>T</sup> が様々な二次代謝産物を生産すると予想し、実際に本細菌より多数の新規天然物を取得した [61, 70]。このように、ゲノム解析に基づく二次代謝産物生産能力の予測は、一菌株から新規天然物を探索することを助ける強力な戦略である。一方、この戦略では、ゲノムデータを利用できない菌株について天然物生産能力を予測することが難しい。従って、本戦略を全ての細菌株に対して適用するためには、ゲノム配列が決定されていない細菌のゲノム配列決定を大規模に実施する必要がある。しかし、これは時間や費用の観点から非現実的である。そこで、本研究では、個々の菌株の sBGC 解析結果を属内で一度集計し、集計結果を属間で比較することで、二次代謝産物生産能力に優れた属の探索を試みた。

##### 1.1.1 細菌の二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの網羅的解析

###### 結果

Genbank [58] から得た 21,052 の complete ゲノム (1,388 属) を解析し、ゲノム毎にポリケチド、非リボソームペプチド及びテルペンの生合成に関与する sBGC (PNT-BGC) の数を集計した。次に、それらの数から各属毎の平均 PNT-BGC 数を算出した。

各属毎に PNT-BGC の平均数を算出した結果の内、Table 1.1 には放線菌 (*Actinomycetota* 門細菌)、藍藻類 (*Cyanobacteriota* 門細菌) 及び粘液細菌 (*Myxococcales* 目細菌) を除いた PNT-BGC 数上位 5 属を、Table S1 にはそれらも含めた上位 100 属を示した。

PNT-BGC の平均数が 15 個より多い殆どの属は、放線菌、藍藻類及び粘液細菌に分類される属であった (Table S1)。また、それらの分類群に次ぐ PNT-BGC を有する属は *Gynuella* 属、*Photorhabdus* 属、*Tumebacillus* 属、*Herpetosiphon* 属 及び *Methylocaldum* 属であり、それぞれ 15.0、13.2、13.0、12.0、12.0 の PNT-BGC を有していた [61] (Table 1.1、Table S1)。また、天然物データベースである Dictionary of Natural Products (DNP) を参照した結果、*Gynuella* 属及び *Tumebacillus* 属からは天然物が取得されていないことがわかった [71]。しかし、それら 2 属について文献を調査したところ、*Gynuella* 属からは複数の天然物が取

得されていた [61]。一方、*Tumebacillus* 属細菌からの天然物取得例は報告されていなかった。以上の結果より、*Tumebacillus* 属は、放線菌、藍藻類及び粘液細菌に次いで多くの PNT-BGC を有し、天然物探索には未利用な属であることがわかった (Table 1.1、Table S1)。

**Table 1.1.** PNT-BGC 及び報告されている天然物の数

Genus	Ave. of PNT-BGCs	NPs <sup>a</sup>	Genomes
<i>Gynuella</i>	15.0	6 <sup>b</sup>	1
<i>Photorhabdus</i>	13.2	18	6
<i>Tumebacillus</i>	13.0	0	2
<i>Herpetosiphon</i>	12.0	3	1
<i>Methylocaldum</i>	12.0	1	1

<sup>a</sup> Dictionary of Natural Products on USB (ver. 30.1) に登録されている天然物数。

<sup>b</sup> Ueoka らによって報告されている [61]。

次に、*Tumebacillus* 属細菌の sBGC についてより詳細に調べるため、complete ゲノムが登録されている *Tumebacillus* 属細菌 2 株 (*T. avium* JCM 32188<sup>T</sup>、*T. algifaecis* NBRC 108765<sup>T</sup> (=THMBR28<sup>T</sup>)) 及び scaffold ゲノムが登録されている 3 株 (*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> (=DSM 18773<sup>T</sup>)、*Tumebacillus* sp. BK434、*Tumebacillus amylolyticus* ITR2<sup>T</sup>) が有する sBGC を比較した。この時、scaffold ゲノムでは、本来 1 つの sBGC が 2 つ以上の scaffold に分割され、それぞれが異なる sBGC として解析されることがあるため、その様な sBGC の一方は除外した。その結果、それぞれの菌株が有する PNT-BGC は、*T. avium* JCM 32188<sup>T</sup> では 14 個、*T. algifaecis* NBRC 108765<sup>T</sup> では 12 個、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> では 13 (除外: 7) 個、*Tumebacillus* sp. BK434 では 15 (除外: 4) 個、*T. amylolyticus* ITR2<sup>T</sup> では 5 (除外: 5) 個であることがわかった (Table S2)。すなわち、scaffold ゲノムを含めた際の *Tumebacillus* 属細菌における PNT-BGC の平均数は 11.8 個であり、解析に scaffold ゲノムを追加しても本属細菌の PNT-BGC 平均数は大きく変動しないと言える。また、それら PNT-BGC には、ポリケチド及び非リボソームペプチドの生合成に関与する sBGC が多い一方、テルペンの生合成に関与する sBGC は無かった。従って、*Tumebacillus* 属細菌は様々なポリケチドや非リボソームペプチドを生産すると期待された。

## 1.2 未利用微生物資源 *Tumebacillus* 属細菌からの天然物探索

第 1.1 節で実施した sBGC 解析により、これまでに天然物が取得されていない *Tumebacillus* 属細菌は、様々なポリケチドや非リボソームペプチドを生産することが期待された。そこで、本属の菌株が生産する代謝産物から新規天然物の単離を試みた。

本研究では、抗菌活性試験によるスクリーニングを実施し、供試菌に活性を示す化合物を候補化合物とした。また、抗菌活性物質以外の天然物も探索するために、HPLC を用いて培養液中の代謝産物を解析し、*Tumebacillus* 属細菌の代謝産物生産に適した培地を検討した。その後、それらの結果に基づき、本属細菌の培養液から新規天然物の単離を試みた。

### 1.2.1 *Tumebacillus* 属細菌培養液のスクリーニング

#### 結果

*Tumebacillus* 属細菌から天然物を探索するために、*T. algifaecis* NBRC 108765<sup>T</sup>、*T. flagellatus* DSM 25748<sup>T</sup>、*T. avium* JCM 32188<sup>T</sup>、*T. ginsengisoli* DSM 18389<sup>T</sup>、*T. luteolus* JCM 19866<sup>T</sup> 及び *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> を菌株寄託機関より入手し 8 種類の異なる培地で培養後、培養液にエタノールを加え、遠心分離することで上清をエタノールブロスとして得た。このエタノールブロスを用いて、抗菌活性試験と代謝産物解析を実施した。

抗菌活性試験では、*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341、*Xanthomonas oryzae* KB88、*Escherichia coli* NIHJ、*Candida albicans* ATCC 64548 及び *Mucor racemosus* IFO 4581 に対する抗菌活性を試験した。その結果、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の 60 培地及び 61 培地は *B. subtilis* ATCC 6633 に抗菌活性を示した (Table 1.2)。

HPLC による代謝産物解析では、培養液サンプルを HPLC で分析し、検出された UV 吸光ピーク (210 nm 及び 254 nm) を培地コントロールサンプルの分析結果と比較した。そして、培養液サンプルの分析結果では見られ、培地コントロールサンプルの分析結果では見られ無いピークを代謝産物由来のピークとし、その数を数えた (Fig. 1.1)。その結果、各菌株で代謝産物の生産が認められた (Table 1.3、Table 1.4)。最も多くの代謝産物ピークが見出された菌株は、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> だった。また、本菌株は、51 培地、61 培地、B10 培地及び 301 培地で多くの代謝産物を生産していた。

**Table 1.2.** *Tumebacillus* 属細菌のエタノールブロスが示した抗菌活性

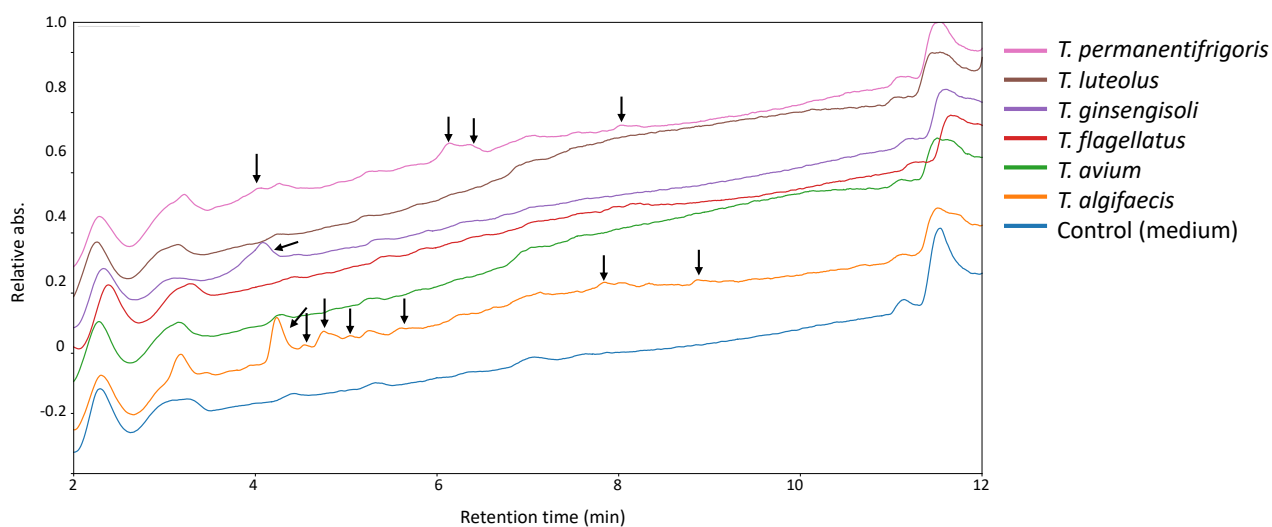
検定菌	抗菌活性 (阻止円形 (mm) 及び 明瞭度 (A-E))							
	51	57	60	61	301	B1	B2	B10
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	-	-	7.0 A	8.0 A	-	-	-	-
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>X. oryzae</i> KB88	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> NIHJ	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 64548	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. racemosus</i> IFO 4581	-	-	-	-	-	-	-	-

**Table 1.3.** LCUV 分析によって検出された UV 吸収波長 210 nm における代謝産物ピーク数

Strain	Number (210 nm)								
	51	57	60	61	301	B1	B2	B10	Total
<i>T. algifaecis</i> NBRC 108765 <sup>T</sup>	8	1	3	0	2	4	1	1	20
<i>T. flagellatus</i> DSM 25748 <sup>T</sup>	0	2	1	3	2	2	1	3	14
<i>T. avium</i> JCM 32188 <sup>T</sup>	0	1	1	1	1	3	1	1	9
<i>T. ginsengisoli</i> DSM 18389 <sup>T</sup>	1	0	0	3	0	0	3	0	7
<i>T. luteolus</i> JCM 19866 <sup>T</sup>	0	1	2	2	5	2	3	1	16
<i>T. permanentifrigoris</i> JCM 14557 <sup>T</sup>	3	1	6	1	3	4	0	3	21
Total	12	6	13	10	13	15	9	9	87

**Table 1.4.** LCUV 分析によって検出された UV 吸収波長 254 nm における代謝産物ピーク数

Strain	Peak number (254 nm)								
	51	57	60	61	301	B1	B2	B10	Total
<i>T. algifaecis</i> NBRC 108765 <sup>T</sup>	4	1	3	1	4	2	0	4	19
<i>T. flagellatus</i> DSM 25748 <sup>T</sup>	1	0	1	2	6	0	0	2	12
<i>T. avium</i> JCM 32188 <sup>T</sup>	0	0	2	1	2	4	1	4	14
<i>T. ginsengisoli</i> DSM 18389 <sup>T</sup>	1	0	0	2	0	0	3	0	6
<i>T. luteolus</i> JCM 19866 <sup>T</sup>	0	0	6	1	6	0	3	4	20
<i>T. permanentifrigoris</i> JCM 14557 <sup>T</sup>	6	0	6	4	6	3	0	7	29
Total	9	1	18	11	24	9	7	21	100

**Fig. 1.1.** 測定波長 210 nm における UV クロマトグラム の例 (51 培地)

矢印が代謝産物ピークを表す

## 1.2.2 *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> が生産する tumbacin (1) と 4-(2-nitroethyl)phenol (2) の単離

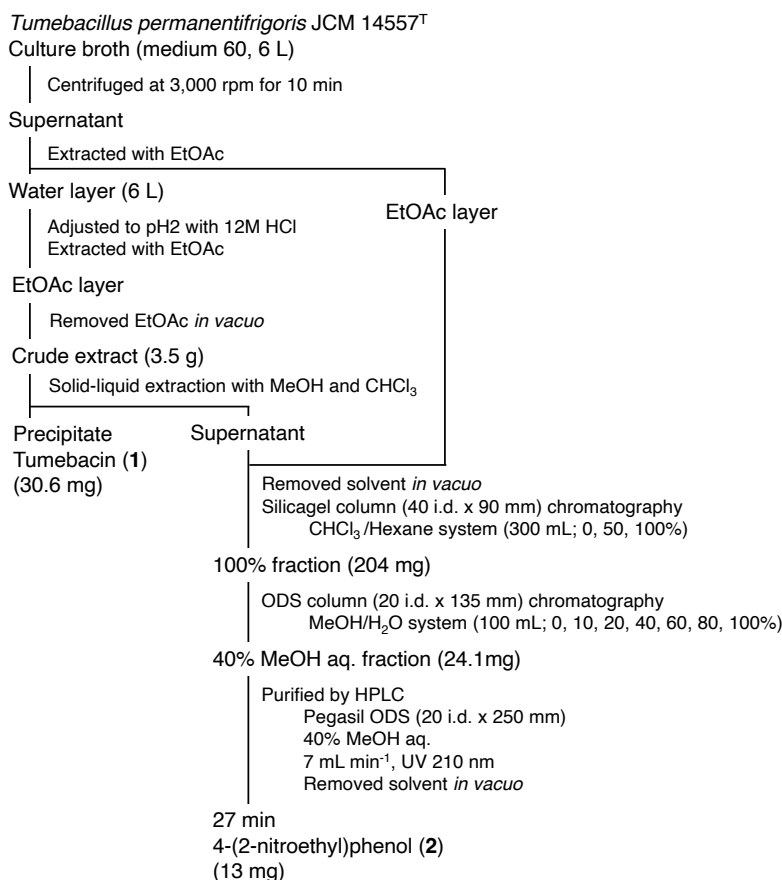
### 結果

#### *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の培養

*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の培養は、種培養と本培養の 2 段階培養で行った。R2A 寒天培地上で継代培養されていた *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> を一白金耳掻き取り、NB 培地 100 mL (500 mL 容三角フラスコ) に 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 2 日間振盪培養した。続いて、この種培養液を 60 培地 6 L (500 mL 容三角フラスコ 60 本) に 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 4 日間培養した。

#### 化合物の単離

化合物の単離は Scheme 1.1 に従った。また、tumbacin (1) は光に弱いため、下記の操作は遮光条件下で行った。培養液を EtOAc 抽出し、水層と EtOAc 層に分けた。次に、水層を酸性条件下で EtOAc 抽出し、EtOAc 層を得た。EtOAc 層を減圧乾固した後、MeOH、MeOH:CHCl<sub>3</sub> の 2:1 混合液及び MeOH で洗浄することにより、不溶物として 1 (30.6 mg) を得た。また、最初に得た EtOAc 層と各溶媒洗浄による溶液を混合し、濃縮することで 4-(2-nitroethyl)phenol (2) を含む乾固物を得た。Scheme 1.1 に示したように、得られた乾固物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー及び HPLC による精製に供することで、2 (13.0 mg) を得た。



**Scheme 1.1.** Tumbacin (1) 及び 4-(2-nitroethyl)phenol (2) の単離スキーム

### 1.2.3 *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> が生産する Le-pyrrolopyrazine B (3) と tumepyrzazine (4) の単離

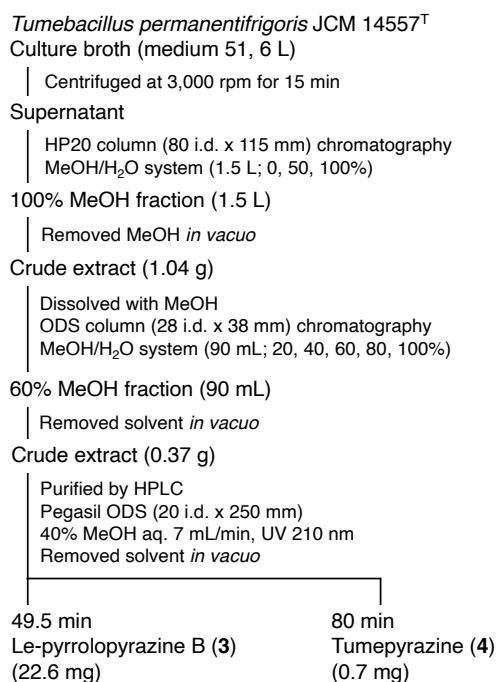
#### 結果

##### *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の培養

*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の種培養は第 1.2.2 節に従って行った。種培養液を 51 培地 1 L (500 mL 容三角フラスコ 10 本) に 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 4 日振盪培養した。同時に、51 培地 5 L (7 L 容ジャーファーマンター) に培養液 50 mL を接種し、150 rpm で回転翼を回転させつつ、0.2 VVM で通気しながら 27°C で 4 日間培養した。

#### 化合物の単離

Le-pyrrolopyrazine B (3) 及び tumepyrzazine (4) の単離は Scheme 1.2 に従って行った。培養液 6 L の上清を Scheme 1.2 に示した様に、HP20 カラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー及び HPLC を用いた精製に供することで、3 (22.6 mg) と 4 (0.7 mg) を得た。



**Scheme 1.2.** Tumepyrzazine (4) 及び Le-pyrrolopyrazine B (3) の単離スキーム

## 1.2.4 Tumbacin (1) の構造解析

### 結果

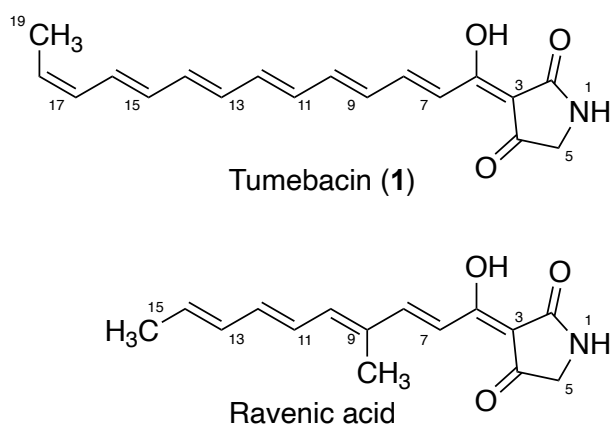
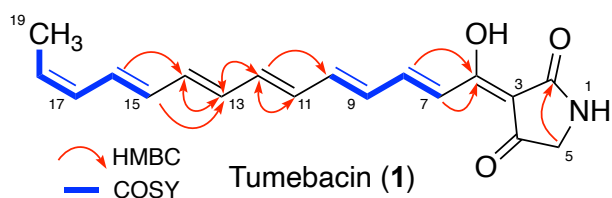
Table S3 に **1** の物理化学的特性を示した。**1** は赤色粉末として得られ、DMSO に可溶であり、UV 極大吸収を 400 nm に示した。MS スペクトル ( $m/z$  298.1437 [ $M + H$ ] $^+$ ) より、**1** の分子式を  $C_{18}H_{19}NO_3$  (不飽和度: 10) に決定した。**1** は 3,226、1,611、997 及び 802  $cm^{-1}$  に特徴的な IR 吸収を示し、ヒドロキシ基、ケトン基、アルケン基を持つことが示唆された。また、**1** の融点の測定を試みたが、本化合物は 145°C で分解した。

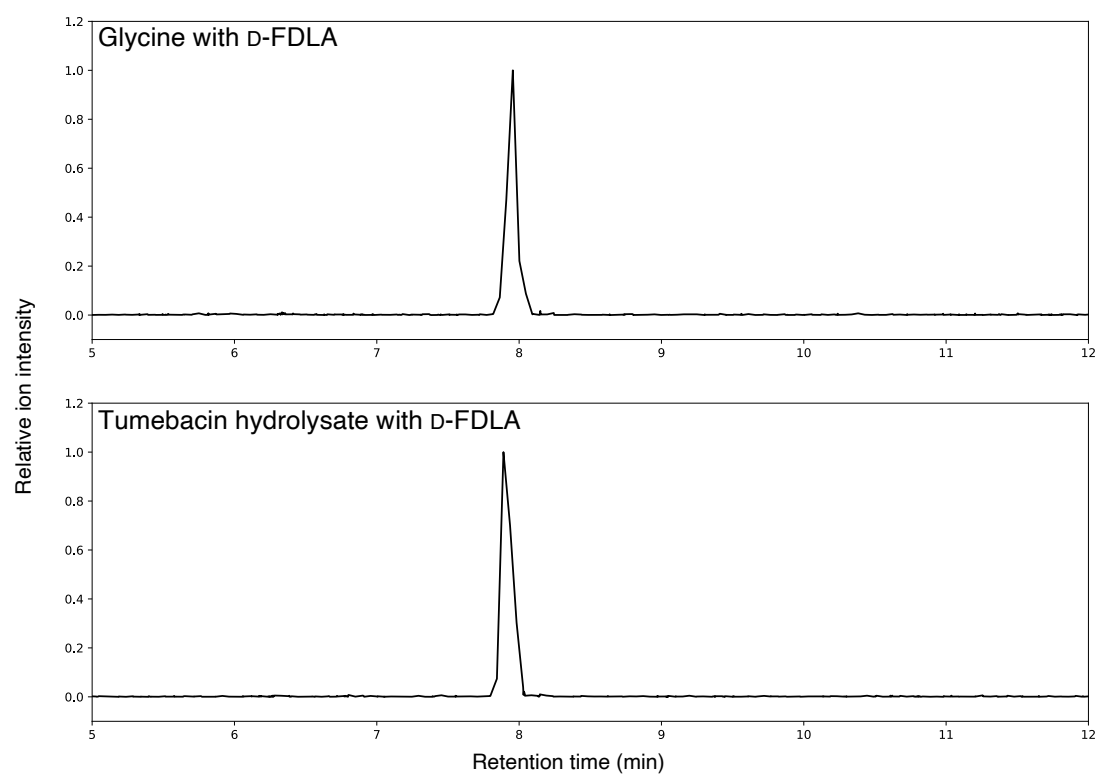
$^1H$ - $^1H$  COSY により、2 つのスピン系 H-7 ( $\delta_H$  7.10)/H-8 ( $\delta_H$  7.49)/H-9 ( $\delta_H$  6.60)/H-10 ( $\delta_H$  6.90) 及び H-15 ( $\delta_H$  6.33)/H-16 ( $\delta_H$  6.68)/H-17 ( $\delta_H$  6.10)/H-18 ( $\delta_H$  5.59)/H<sub>3</sub>-19 ( $\delta_H$  1.77) が観測された (Table 1.5、Fig. 1.3、Fig. S17)。また、H-11 ( $\delta_H$  6.49) から C-12 ( $\delta_C$  138.2)、H-12 ( $\delta_H$  6.63) から C-10 ( $\delta_C$  142.9)、C-11 ( $\delta_C$  132.1) と C-13 ( $\delta_C$  131.9)、H-13 ( $\delta_H$  6.42) から C-12 と C-14 ( $\delta_C$  136.3)、H-14 ( $\delta_H$  6.56) から C-13、H-15 から C-13、H-16 から C-14、及び H-7 と H-8 から C-6 ( $\delta_C$  172.4) に HMBC 相関が観測された。従って、**1** が tridecahexaene 構造を有することが示された (Table 1.5、Fig. S16)。次に、C-2 ( $\delta_C$  175.1) と C-4 ( $\delta_C$  193.0) の  $^{13}C$  ケミカルシフト、H<sub>2</sub>-5 ( $\delta_H$  3.72) から C-2 に観測された HMBC 相関、残った分子式 ( $C_4H_3NO_2$ ) と不飽和度より、**1** は tetramic acid 構造を有することが示された (Table 1.5、Fig. S14、Fig. S16)。また、3-methyltetramic acid 構造を加水分解すると alanine を生じることが報告されているため [72]、**1** を加水分解した場合は glycine が得られると考えられた。そこで、**1** について改良マーフィー法によるアミノ酸分析を実施した。化合物 **1** の加水分解物を D-FDLA で修飾し、LC-HRMS で分析したところ、本化合物の加水分解物には glycine が含まれることがわかった (Fig. 1.4)。従って、**1** が tetramic acid 構造を有することが強く示唆された。さらに、DMSO- $d_6$  中で測定した **1** の NMR データを ravenic acid [73] と比較したところ、ポリエン部分以外が良い一致を示したため、**1** はエノール化した 3-acyltetramic acid 構造を有することが明らかになった (Table 1.5、Fig. 1.2、Fig. 1.3、Fig. S13–S17)。また、 $^{13}C$  NMR と HMBC では、tetramic acid 構造中の C-3 のシグナルを観測することができなかったが、これは tetramic acid 構造で起こるケト–エノール互変異性によるものであると考えられた (Fig. S16) [73, 74]。以上の構造解析より、**1** の構造を 3-(1-hydroxytetradeca-2,4,6,8,10,12-hexaene-1-ylidene)-2,4-pyrrolidinedione に決定し、新規物質として tumbacin と命名した (Fig. 1.3)。本化合物のポリエン部位の幾何異性は、 $^1H$  NMR における結合定数  $^3J_{H7-H8}$  (15.2 Hz)、 $^3J_{H9-H10}$  (14.0 Hz)、 $^3J_{H11-H12}$  (14.6 Hz)、 $^3J_{H13-H14}$  (14.5 Hz)、 $^3J_{H15-H16}$  (14.7 Hz) 及び  $^3J_{H17-H18}$  (10.8 Hz) より、7*E*、9*E*、11*E*、13*E*、15*E*、17*Z* に決定した (Table 1.5、Fig. 1.3、Fig. S13)。



**Table 1.5.** Tumblebacin (1) 及び ravenic acid の NMR データ

Tumblebacin (1) <sup>a</sup>			Ravenic acid <sup>c</sup>		
Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) (int., mult., $J$ Hz)	Position	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) (int., mult., $J$ Hz)
1-NH		8.29 (1H, br s)	1-NH		8.70 (1H, br s)
2	175.1		2	176.6	
3	Not detected		3	99.7	
4	193.0		4	192.4	
5	50.7	3.72 (2H, br s)	5	51.5	3.75 (2H, s)
6	172.4		6	174.8	
7	120.2	7.10 (1H, d, 15.2)	7	116.4	7.06 (1H, d, 15.0)
8	143.2	7.49 (1H, dd, 15.2, 11.3)	8	149.6	7.51 (1H, d, 15.0)
9	130.6	6.60 (1H, dd, 14.0, 11.3)	9	134.2	
			9-CH <sub>3</sub>	12.5	1.92 (3H, s)
10	142.9	6.90 (1H, dd, 14.0, 10.9)	10	142.6	6.75 (1H, d, 11.0)
11	132.1 <sup>b</sup>	6.49 (1H, dd, 14.6, 10.9)	11	126.4	6.63 (1H, dd, 14.0, 11.0)
12	138.2	6.63 (1H, dd, 14.6, 11.3)	12	139.5	6.55 (1H, dd, 14.0, 10.5)
13	131.9	6.42 (1H, dd, 14.5, 11.3)	13	132	6.29 (1H, ddq, 15.0, 10.5, 2.0)
14	136.3	6.56 (1H, dd, 14.5, 11.0)	14	134.5	5.78 (1H, dq, 15.0, 7.0)
15	132.1 <sup>b</sup>	6.33 (1H, dd, 14.7, 11.0)	15	18.7	1.80 (3H, br d, 7.0)
16	129.8	6.68 (1H, dd, 14.7, 11.3)			
17	129.3	6.10 (1H, dd, 11.3, 10.8)			
18	127.8	5.59 (1H, dq, 10.8, 7.0)			
19	13.0	1.77 (3H, d, 7.0)			

<sup>a</sup> DMSO-*d*<sub>6</sub> 中で測定した。<sup>b</sup> シグナルがオーバーラップした。<sup>c</sup> Michael らによって報告されたデータ (重溶媒:DMSO-*d*) に基づく [73]。**Fig. 1.2.** Tumblebacin (1) と ravenic acid の構造**Fig. 1.3.** Tumblebacin (1) の二次元 NMR 解析



**Fig. 1.4.** D-FDLA 修飾サンプルの抽出イオンクロマトグラム (XIC:  $m/z$  370.13–370.14)

## 1.2.5 4-(2-Nitroethyl)phenol (**2**) の構造解析

### 結果

MS スペクトル ( $m/z$  168.0655 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>) より、**2** の分子式を  $C_8H_9NO_3$  に決定した。また、<sup>1</sup>H NMR 及び <sup>13</sup>C NMR が文献値と良い一致を示したことから、本化合物を 4-(2-nitroethyl)phenol (**2**) に同定した (Table 1.6、Fig. 1.5、Fig. S18、Fig. S19) [75]。

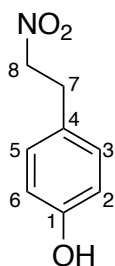
本化合物は、アメリカミズバショウ (*Lysichitum americanum*) の葉から単離された抗真菌物質として Hanawa らによって報告されている [76]。

**Table 1.6.** 4-(2-Nitroethyl)phenol (**2**) の NMR データ

Position	Measurement <sup>a</sup>		Reference <sup>b</sup>	
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) (int., mult., $J$ in Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) (int., mult., $J$ in Hz)
1	127.8		127.6	
2	129.9	6.78 (2H, d, 6.2)	129.8	6.76 (2H, d, 6.55)
3	115.8	7.07 (2H, d, 6.2)	115.8	7.04 (2H, dt, 6.55)
4	154.8		154.8	
5	115.8	7.07 (2H, d, 6.2)	115.8	7.04 (2H, d, 6.55)
6	129.9	6.78 (2H, d, 6.2)	129.8	6.76 (2H, d, 6.55)
7	32.7	3.24 (2H, t, 5.7)	32.6	3.22 (2H, t, 7.23)
8	76.6	4.57 (2H, t, 5.7)	76.6	4.57 (2H, t, 7.23)
1-OH		5.05 (1H, br)		5.20 (1H, br, s)

<sup>a</sup>CDCl<sub>3</sub> 中で測定した。

<sup>b</sup>Nguyen らによって報告されたデータ (重溶媒: CDCl<sub>3</sub>) [75] に基づく。



**Fig. 1.5.** 4-(2-Nitroethyl)phenol (**2**) の構造

## 1.2.6 Le-pyrrolopyrazine B (**3**) の構造解析

### 結果

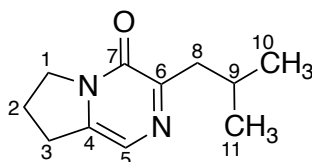
MS スペクトル ( $m/z$  193.1625 の  $[M+H]^+$ ) より、**3** の分子式を  $C_{11}H_{16}N_2O$  に決定した。また、 $^1H$  NMR 及び  $^{13}C$  NMR が文献値と良い一致を示したことから、本化合物を Le-pyrrolopyrazine B (**3**) に同定した (Table 1.7、Fig. 1.6、Fig. S20、Fig. S21) [77]。本化合物は、休眠 BGC を活性化したグラム陰性細菌 *Lysobacter enzymogenes* から単離された二次代謝産物として Li らによって報告されている。

**Table 1.7.** Le-pyrrolopyrazine B (**3**) の NMR データ

Position	Measurement <sup>a</sup>		Reference <sup>b</sup>	
	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) (int., mult., $J$ in Hz)	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm) (int., mult., $J$ in Hz)
1	50.3	4.13 (2H, t, 7.4)	48.8	4.11 (2H, t, 7.7)
2	22.9	2.24 (2H, m)	22.9	2.21 (2H, m)
3	30.3	3.16 (2H, t, 7.6)	29.6	3.08 (2H, t, 7.7)
4	143.8		140.4	
5	119.9	7.34 (1H, s)	118.5	7.26 (1H, s)
6	157.5		156.6	
7	156.2		156.2	
8	28.1	2.15 (1H, m)	27.03	2.21 (3H, m)
9	42.4	2.61 (2H, d, 6.8)	41.8	2.67 (2H, d, 7.7)
10	22.4	0.92 (6H, d, 6.8)	21.8	0.95 (6H, d, 7.0)
11	22.4	0.92 (6H, d, 6.8)	21.8	0.95 (6H, d, 7.0)

<sup>a</sup>CD<sub>3</sub>OD 中で測定した。

<sup>b</sup>Li らによって報告されたデータ (重溶媒: CDCl<sub>3</sub>) に基づく [77]



**Fig. 1.6.** Le-pyrrolopyrazine B (**3**) の構造

## 1.2.7 Tumepyrazine (4) の構造解析

### 結果

Table S3 に **4** の物理化学的性状を示した。化合物 **4** は白色粉末として得られ、MeOH に可溶であり、UV 極大吸収を 279 nm に示した。MS スペクトル (215.1184 の  $[M + H]^+$ ) より、本化合物の分子式を  $C_{13}H_{14}N_2O$  (不飽和度:8) に決定した。化合物 **4** は 3347、1457、1510、1612、928、1096 及び  $1267\text{ cm}^{-1}$  に特異な IR 吸収を示し、ヒドロキシ基、芳香族環及びフェノール構造を有することが示された。また、本化合物の融点は  $194^\circ\text{C}$  だった。

$CD_3OD$  中で測定した  $^1H$  及び  $^{13}C$  NMR、HSQC 及び HMBC スペクトルより、**4** は 5 つの  $sp^2$  メチン炭素、5 つの  $sp^2$  4 級炭素、1 つの  $sp^3$  メチレン炭素、2 つのメチル炭素を有することがわかった (Table 1.8、Fig. S22–S25)。H-2 と H-6 ( $\delta_H$  6.70) から C-4 ( $\delta_C$  130.6)、H-3 と H-5 ( $\delta_H$  7.06) から C-1 ( $\delta_C$  156.9)、H-3 から C-5 及び H-5 から C3 に見られた HMBC 相関、並びに  $^1H$ - $^1H$  COSY によって観測されたオルトカップリングの結合定数 (8.8 Hz) を伴う H-2、6/H-3、5 のスピンの系より、**4** は *p*-二置換ベンゼン構造を有することが示された (Table 1.8、Fig. 1.7、Fig. S25、Fig. S26)。また、先に示した IR スペクトルの解析では **4** がフェノール構造を有することが示唆され、C-1 は  $\delta_C$  156.9 を示したことから、C-1 の置換基はヒドロキシ基であると考えられた。H-3 と 5 から C-7 ( $\delta_C$  41.4) に観測された HMBC 相関から、C-7 が芳香環炭素である C-4 に結合することが示唆された。H<sub>2</sub>-7 ( $\delta_H$  3.99) から C-8 ( $\delta_C$  154.9) と C-9 ( $\delta_C$  141.2)、H-9 ( $\delta_H$  8.10) から C-8 と C-10 ( $\delta_C$  150.9)、H<sub>3</sub>-12 ( $\delta_H$  2.49) から C-10 と C-11 ( $\delta_C$  153.1)、H<sub>3</sub>-13 ( $\delta_H$  2.52) から C-10 と C-11 に見られた HMBC 相関、残された分子式  $N_2$  と不飽和度 (4)、並びに 4 つの  $sp^2$  炭素である C-8、C-9、C-10 及び C-11 が示した  $^{13}C$  NMR のケミカルシフト ( $\delta_C$  141.2–154.9) より、**4** はこれら 4 つの炭素原子 (C-8–C-11) 及び 2 つの窒素原子から成る pyrazine 環構造を有することが明らかになった。以上より、**4** の構造を 4-((5,6-dimethylpyrazin-2-yl)methyl)phenol に決定し、新規物質として tumepyrazine と命名した (Fig. 1.7)。

**Table 1.8.** Tumepyrazine (**4**) の NMR データ

Position	$\delta_C(\text{ppm})^a$	$\delta_H(\text{ppm})^a$ (int., mult., <i>J</i> in Hz)
1	156.9	
2	116.6	6.70 (1H, d, 8.8)
3	130.9	7.06 (1H, d, 8.8)
4	130.6	
5	130.9	7.06 (1H, d, 8.8)
6	116.6	6.70 (1H, d, 8.8)
7	41.4	3.99 (2H, s)
8	154.9	
9	141.2	8.10 (1H, s)
10	150.9	
11	153.1	
12	21.3	2.49 (3H, s)
13	21.6	2.52 (3H, s)

<sup>a</sup> $CD_3OD$  中で測定した。

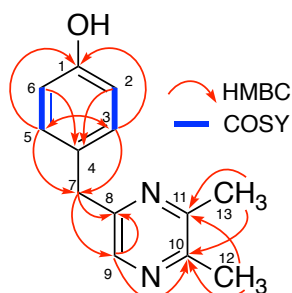


Fig. 1.7. Tumepeyrazine (4) の二次元 NMR 解析

### 1.2.8 Tumbacin (1) の抗菌活性試験

4 種のグラム陽性細菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 及び *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607)、5 種のグラム陰性細菌 (*Escherichia coli* NIHJ、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031、*Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080、*Xanthomonas oryzae* KB88 及び *Proteus vulgaris* NBRC 3167) 及び 4 種の真菌 (*Candida albicans* ATCC 64548、*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763、*Aspergillus niger* ATCC 6275 及び *Mucor racemosus* IFO 4581) について、**1** の抗菌活性試験を行った。化合物 **1** は *B. subtilis* ATCC 6633 に対して、10 µg/disc で抗菌活性を示したが、他の供試菌に対しては 20 µg/disc で抗菌活性を示さなかった。また、**1** の *B. subtilis* ATCC 6633 に対する最小発育阻止濃度 (MIC) は 0.25 µg mL<sup>-1</sup> であった。

### 1.3 *Tumebacillus* 属細菌の選択的分離

先に実施したゲノム解析により、*Tumebacillus* 属は、天然物が取得されておらず PNT-BGC の平均数が多い属であった。また、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> から新規生物活性物質を含む 4 化合物が単離されたことで、本属細菌が微生物資源として有望であることが示された。しかし、本属の菌株は分離例が少なく微生物資源として利用可能な菌株が限られている。そこで、*Tumebacillus* 属細菌の選択的な分離を試みた。

#### 1.3.1 *Tumebacillus* 属細菌が示す EtOH 及び熱耐性の検討

*Tumebacillus* 属細菌は芽胞形成能を有するグラム陽性細菌である。芽胞は、栄養細胞と比較して熱や EtOH をはじめとする消毒薬への耐性が極めて高いことで知られており、それらの耐性を利用した芽胞細菌の選択分離法が報告されている [78]。そこで、それらの分離法を *Tumebacillus* 属細菌の分離に適用するために、本属細菌の芽胞が有する熱及び EtOH 耐性を検討した。

#### 結果

*T. avium* JCM 32188<sup>T</sup>、*T. flagellatus* DSM 25748<sup>T</sup>、*T. ginsengisoli* DSM 18389<sup>T</sup>、*T. luteolus* JCM 19866<sup>T</sup>、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> 及び *B. subtilis* ATCC 6633 の芽胞懸濁液と、*E. coli* NIHJ 及び *K. rhizophila* ATCC 9341 の菌体懸濁液を用い、これら細菌の熱及び EtOH に対する耐性を試験した。

Table 1.9 に各耐性試験の結果をまとめた。60 °C、30 min の加熱処理では試験した全ての菌株の生育が認められたが、60 °C、60 min の加熱処理後では *Tumebacillus* 属細菌と *B. subtilis* ATCC 6633 に限り生育が認められた。また、100 °C、10 min 及び 30 min の処理では *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> と *T. ginsengisoli* DSM 18389<sup>T</sup> の生育が認められなかった。

EtOH 処理では、*Tumebacillus* 属細菌と *B. subtilis* ATCC 6633 の生育のみが認められた。

以上の結果より、*Tumebacillus* 属細菌の一部の種は 100 °C 以上の熱処理に耐性を示さず、種毎に異なる熱耐性を有することが示された一方、30 min の EtOH 処理に対しては一律に耐性を示すことが期待された。従って、本研究における *Tumebacillus* 属細菌の分離には 30 min の EtOH 処理を適用することにした。

**Table 1.9.** 加熱処理及び EtOH 処理後の各菌株の生育

Strain	R.T.	60 °C		100 °C		EtOH
	60 min	30 min	60 min	10 min	30 min	30 min
<i>T. avium</i> JCM 32188 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+
<i>T. flagellatus</i> DSM 25748 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+
<i>T. ginsengisoli</i> DSM 18389 <sup>T</sup>	+	+	+	—	—	+
<i>T. luteolus</i> JCM 19866 <sup>T</sup>	+	+	+	+	+	+
<i>T. permanentifrigoris</i> JCM 14557 <sup>T</sup>	+	+	+	—	—	+
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i> NIHJ	+	+	—	—	—	—
<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341	+	+	—	—	—	—

+: 生育が認められた

—: 生育が認められなかった

### 1.3.2 *Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーの設計とプライマーを用いた PCR の条件検討

*Tumebacillus* 属細菌は土壌、淡水、工業排水、猛禽類の糞便及びカナダの永久凍土から分離されており、それらと類似する環境から分離できると期待される [79–85]。そこで、それらの内、最も容易に入手できる土壌から *Tumebacillus* 属細菌の分離を試みることにした。また、本研究では、分離に用いる土壌サンプルを PCR によってスクリーニングすることで、効率的な *Tumebacillus* 属細菌の分離を目指した。ここでは、*Tumebacillus* 属細菌を特異的に検出できる PCR プライマーの設計とそれらを用いた PCR の温度条件検討について記述する。

#### 結果

*Alicyclobacillus* 科細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列のマルチプルシーケンスアライメントを作成し、*Tumebacillus* 属細菌間での保存率が高く、同科別属では保存率が低い配列 (consensus sequence) を探索した。その結果、3 つの consensus sequence 1–3 が見出された (Table 1.10–1.12)。そこで、consensus sequence 1 からは forward プライマー T147F を、consensus sequence 2 からは forward プライマー T504F 及び reverse プライマー T522R を、consensus sequence 3 からは reverse プライマー T679R を設計した (Table 1.13)。



**Table 1.10.** 16S rRNA 遺伝子塩基配列における *Tumebacillus* 属細菌の consensus sequence 1 と

*Alicyclobacillus* 科細菌の塩基配列の比較

Strain	Sequence (5' to 3')
<i>T. avium</i> AR23208 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil 1105 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>T. permanentifrigoris</i> Eur1 9.5 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>T. flagellatus</i> GST4 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>T. algifaecis</i> THMBR28 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>T. luteolus</i> UC13 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>T. lipolyticus</i> NIO-S10 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>T. soli</i> CAU 11108 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i> MR1 <sup>T</sup>	C C C G G A A A C G G G C G C T A A - T G
<i>A. fastidiosus</i> NBRC 103109 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. pomorum</i> NBRC 100861 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. acidiphilus</i> NBRC 100859 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. herbarius</i> NBRC 100860 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. aeris</i> NBRC 104953 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. cycloheptanicus</i> NBRC 15310 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. sacchari</i> NBRC 103105 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. kakegawensis</i> NBRC 103104 <sup>T</sup>	C C C G G A A A C G G G T G C T A A - A G
<i>A. contaminans</i> NBRC 103102 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. shizuokensis</i> NBRC 103103 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - A G
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. ferrooxydans</i> TC-34 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. fodiniaquatis</i> G45-16 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G A G T G C T A A - T G
<i>A. macrosporangioides</i> 5-A239-20-A <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. montanus</i> USBA-GBX-503 <sup>T</sup>	A C G C T G C A A G G G T G C T A A - G G
<i>A. cellulosilyticus</i> Sueoka <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. acidocaldarius</i> NCIMB 11725 <sup>T</sup>	N N G G G A A A T T G G N N C T A A G T C
<i>A. dauci</i> 4F <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. sendaiensis</i> NTAP-1 <sup>T</sup>	C C C G G A A A C G G G C G C T A A - T G
<i>A. tengchongensis</i> ACK006 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - G G
<i>A. vulcanalis</i> DSM 16176 <sup>T</sup>	C C C G G A A A C G G G C G C T A A - T G
<i>A. tolerans</i> K1 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. hesperidum</i> FR-11 <sup>T</sup>	C T C G G A A A C G G G T G C T A A - T G
<i>A. disulfidooxidans</i> DSM 12064 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - G G
<i>E. pohliae</i> MP4 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T A
<i>E. lacus skLN1</i> <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G T G C T A A - T A
<i>E. consociatus</i> CCUG 53762 <sup>T</sup>	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A
<i>K. spormannii</i> EA-1 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G C G C T A A - T T
<i>K. tusciae</i> NBRC 15312 <sup>T</sup>	C C T G G A A A C G G G C G C T A A - T T
<i>S. acidophilus</i> NAL <sup>T</sup>	G G C C G A A A G G C G C G G C A A - T C
<i>S. benefaciens</i> BRGM2 <sup>T</sup>	G G C C G A A A G G C G C G G C A A - T C
<i>S. sibiricus</i> N1 <sup>T</sup>	G G C C G A A A G G C G C G G C A A - T C
<i>S. thermosulfidooxidans</i> VKM B-1269 <sup>T</sup>	G G C C G A A A G G C G C G G C A A - T C
<i>S. thermotolerans</i> Kr1 <sup>T</sup>	G G C C G A A A G G C G C G G C A A - T C
Consensus sequence 1	C T T G G A A A C G A G T G C T A A - T A

*T*: *Tumebacillus*, *A*: *Alicyclobacillus*, *E*: *Effusibacillus*, *K*: *Kyrpidia*, *S*: *Sulfobacillus*, -: ギャップ  
プライマー配列に一致する塩基を灰色でハイライトした。

**Table 1.11.** 16S rRNA 遺伝子塩基配列における *Tumebacillus* 属細菌の consensus sequence 2 と

*Alicyclobacillus* 科細菌の塩基配列の比較

Strain	Sequence (5' to 3')
<i>T. avium</i> AR23208 <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil 1105 <sup>T</sup>	C T T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>T. permanentifrigoris</i> Eur1 9.5 <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>T. flagellatus</i> GST4 <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>T. algifaecis</i> THMBR28 <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>T. luteolus</i> UC13 <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>T. lipolyticus</i> NIO-S10 <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>T. soli</i> CAU 11108 <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A A C A G A G G A G
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i> MR1 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. fastidiosus</i> NBRC 103109 <sup>T</sup>	T G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. pomorum</i> NBRC 100861 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C G A G A G A G
<i>A. acidiphilus</i> NBRC 100859 <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. herbarius</i> NBRC 100860 <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G A T G G A G
<i>A. aeris</i> NBRC 104953 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C A G G G A G
<i>A. cycloheptanicus</i> NBRC 15310 <sup>T</sup>	A G A G A C G G T A C C G A G A G A G
<i>A. sacchari</i> NBRC 103105 <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. kakegawensis</i> NBRC 103104 <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G A T G G A G
<i>A. contaminans</i> NBRC 103102 <sup>T</sup>	N G A G A C G G T A C C G A G A G A G
<i>A. shizuokensis</i> NBRC 103103 <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G A T G G A G
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 <sup>T</sup>	T G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. ferrooxydans</i> TC-34 <sup>T</sup>	A G A G A C G G T A C C G G G A G A G
<i>A. fodiniaquatis</i> G45-16 <sup>T</sup>	T G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. macrosporangioides</i> 5-A239-20-A <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G G G A G A G
<i>A. montanus</i> USBA-GBX-503 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C C G A G A G
<i>A. cellulosilyticus</i> Sueoka <sup>T</sup>	C C T G A C G G T A C C G G G T G A G
<i>A. acidocaldarius</i> NCIMB 11725 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. dauci</i> 4F <sup>T</sup>	T G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. sendaiensis</i> NTAP-1 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. tengchongensis</i> ACK006 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C C G A G A G
<i>A. vulcanalis</i> DSM 16176 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. tolerans</i> K1 <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G A G G G A G
<i>A. hesperidum</i> FR-11 <sup>T</sup>	G G A G A C G G T A C C G A G T G A G
<i>A. disulfidooxidans</i> DSM 12064 <sup>T</sup>	C G A G A C G G T A C C G G G A G A G
<i>E. pohliae</i> MP4 <sup>T</sup>	T G T G A C G G T A C C A G A G G A G
<i>E. lacus skLN1</i> <sup>T</sup>	T G T G A C G G T A C C G G A G G A G
<i>E. consociatus</i> CCUG 53762 <sup>T</sup>	C A T G A C G G T A C C A G A G G A G
<i>K. spormannii</i> EA-1 <sup>T</sup>	A G G G A C G G T A C C C A A G G A G
<i>K. tusciae</i> NBRC 15312 <sup>T</sup>	A G G G A C G G T A C C C A A G G A G
<i>S. acidophilus</i> NAL <sup>T</sup>	G G G G A C G G T A C N G G C G G A G
<i>S. benefaciens</i> BRGM2 <sup>T</sup>	G G A G C C G G T A C C G G C G G A G
<i>S. sibiricus</i> N1 <sup>T</sup>	G G A G C C G G T A C C G A C G G A G
<i>S. thermosulfidooxidans</i> VKM B-1269 <sup>T</sup>	G G A G C C G G T A C C G G C G G A G
<i>S. thermotolerans</i> Kr1 <sup>T</sup>	G G A G C C G G T A C C G A C G A A G
Consensus sequence 2	C Y T G A C G G T A A C A G A G G A G

*T*: *Tumebacillus*, *A*: *Alicyclobacillus*, *E*: *Effusibacillus*, *K*: *Kyrpidia*, *S*: *Sulfobacillus*, -: ギャップ  
プライマー配列に一致する塩基を灰色でハイライトした。

**Table 1.12.** 16S rRNA 遺伝子塩基配列における *Tumebacillus* 属細菌の consensus sequence 3 と

*Alicyclobacillus* 科細菌の塩基配列の比較

Strain	Sequence (5' to 3')
<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil 1105 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>T. permanentifrigoris</i> Eur1 9.5 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>T. flagellatus</i> GST4 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>T. algifacies</i> THMBR28 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>T. luteolus</i> UC13 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>T. lipolyticus</i> NIO-S10 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>T. soli</i> CAU 11108 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. acidocaldarius</i> subsp. <i>rittmannii</i> MR1 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. fastidiosus</i> NBRC 103109 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. pomorum</i> NBRC 100861 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. acidiphilus</i> NBRC 100859 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. herbarius</i> NBRC 100860 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. aeris</i> NBRC 104953 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. cycloheptanicus</i> NBRC 15310 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. sacchari</i> NBRC 103105 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. kakegawensis</i> NBRC 103104 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. contaminans</i> NBRC 103102 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. shizuokensis</i> NBRC 103103 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. acidoterrestris</i> DSM 3922 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. ferrooxydans</i> TC-34 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. fodiniaquatilis</i> G45-16 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. macrosporangiidus</i> 5-A239-2O-A <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. montanus</i> USBA-GBX-503 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. cellulositicus</i> Sueoka <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. acidocaldarius</i> NCIMB 11725 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. dauci</i> 4F <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. sendaiensis</i> NTAP-1 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. tengchongensis</i> ACK006 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. vulcanalis</i> DSM 16176 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. tolerans</i> K1 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. hesperidum</i> FR-11 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>A. disulfidooxidans</i> DSM 12064 <sup>T</sup>	C T G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>E. pohliae</i> MP4 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>E. lacus skLN1</i> <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>E. consociatus</i> CCUG 53762 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>K. spormannii</i> EA-1 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>K. tusciae</i> NBRC 15312 <sup>T</sup>	T C G G A G A G G C A A G G G G A A
<i>S. acidophilus</i> NAL <sup>T</sup>	C A G G A G A G G T G C A T G G A A
<i>S. benefaciens</i> BRGM2 <sup>T</sup>	C A G G A G A G G T G C G T G G A A
<i>S. sibiricus</i> N1 <sup>T</sup>	C A G G A G A G G T G C G T G G A A
<i>S. thermosulfidooxidans</i> VKM B-1269 <sup>T</sup>	- - - - - - - - - - -
<i>S. thermotolerans</i> Kr1 <sup>T</sup>	C A G G A G A G G T G C G T G G A A
Consensus sequence 3	T C G G A G A G G C A A G G G G A A

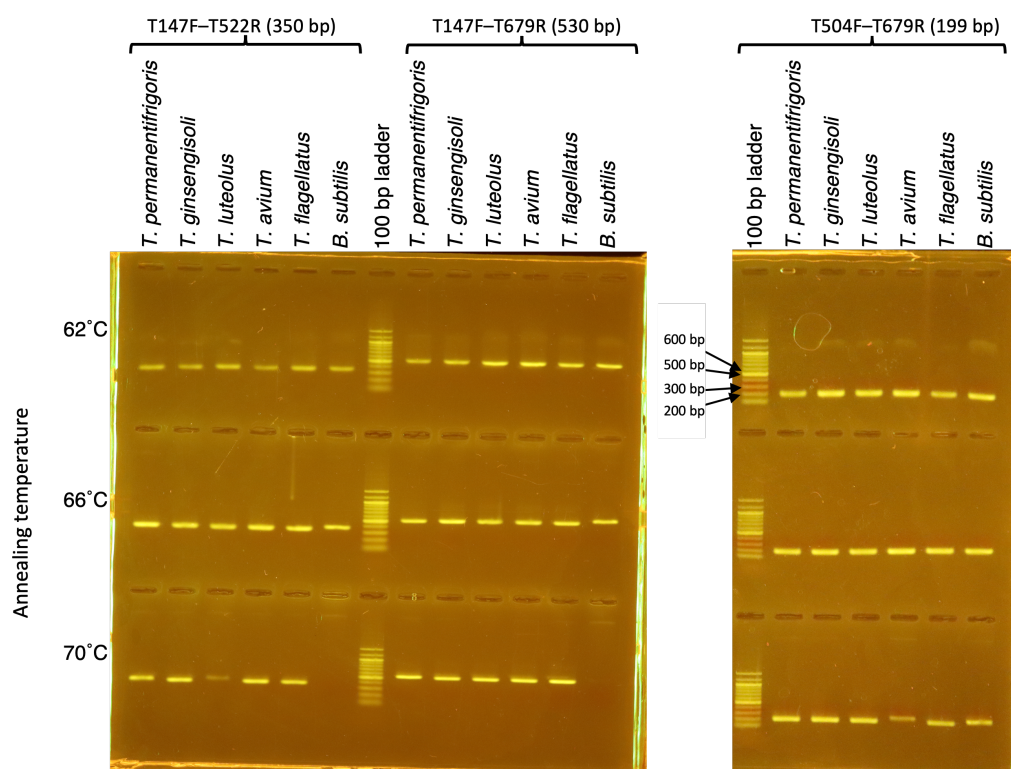
*T*: *Tumebacillus*, *A*: *Alicyclobacillus*, *E*: *Effusibacillus*, *K*: *Kyrpidia*, *S*: *Sulfobacillus*, -: ギャップ  
*Tumebacillus* 属の配列に一致する塩基を灰色でハイライトした。

**Table 1.13.** 設計した *Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に特異的なプライマー

Primer	Consensus sequence <sup>a</sup>	Orientation	Sequence (5' to 3')
T147F	1	Forward	CTTGAAACGAGTGCTAATA
T504F	2	Forward	CYTGACGGTAACAGAGGAG
T522R	2	Reverse	CTCCTCTGTTACCGTCARG
T679R	3	Reverse	TTCCCTTGCCTCTCCGA

<sup>a</sup> Table 1.10–1.12 に示した consensus sequence の番号との対応を表す。

次に、147F–T522R、T147F–T679R 及び T504F–T679R の 3 組のプライマーペアを用いて、*Tumebacillus* 属細菌の塩基配列を特異的に増幅するための PCR におけるアニーリング温度を検討した。検討は 62、66 及び 70°C で行い、*Tumebacillus* 属細菌 5 株及び *B. subtilis* ATCC 6633 から抽出した DNA を鋳型 DNA に用いた。各アニーリング温度条件において、それぞれのプライマーペアを用いた PCR によって配列を増幅した結果、T147F–T522R 及び T147F–T679R のプライマーペアを用いた際はアニーリング温度 70°C にて *Tumebacillus* 属細菌の塩基配列を特異的に増幅した。一方、T504F–T679R のプライマーペアを用いた際は全ての温度条件で特異的な増幅を示さなかった (Fig. 1.8)。以上の結果より、T147F–T522R 及び T147F–T679R のプライマーペアを用い、アニーリング温度を 70°C とした PCR では、*Tumebacillus* 属細菌の配列が特異的に増幅されると考えられた。従って、*Tumebacillus* 属細菌を含む土壌をスクリーニングする際の PCR 条件は、それらに従うことにした。



**Fig. 1.8.** T147F–T522R、T147F–T679R 及び T504F–T679R いずれかのプライマーペアを用いた PCR によって得られた PCR 産物のアガロースゲル (1.5%) 電気泳動写真  
鋳型には *Tumebacillus* 属細菌及び *B. subtilis* ATCC 6633 から抽出した DNA を用いた。プライマーペア名に併記した括弧内の値は増幅配列長を表している。

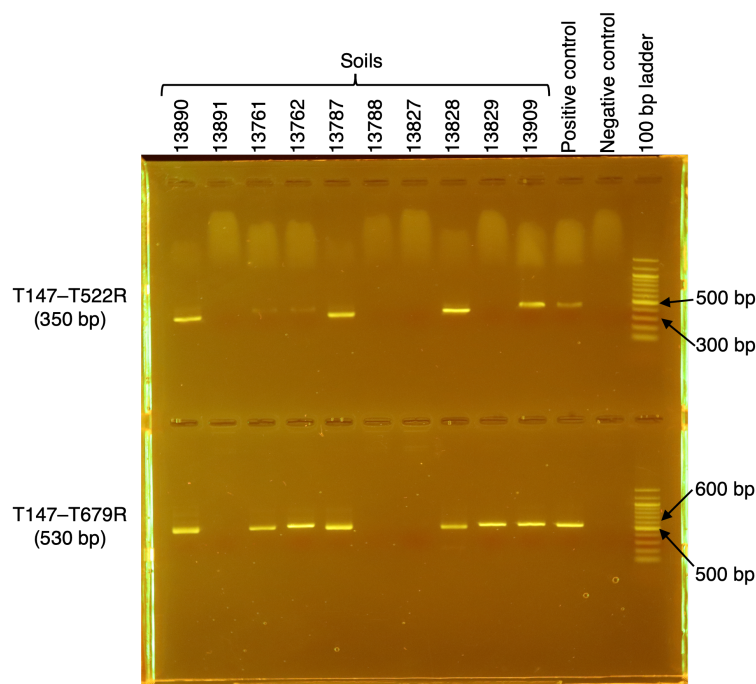
### 1.3.3 *Tumebacillus* 属細菌特異的なプライマーを用いた *Tumebacillus* 属細菌を含む土壌の選出

#### 結果

##### *Tumebacillus* 属細菌特異的なプライマーを用いた PCR による土壌のスクリーニング

保存されていた 40 土壌 (Table S4) をそれぞれミクロスパーテル 1 杯分 (約 0.1 g) 取り出し、10 土壌を 1 つにまとめ (soil-mix 1-4)、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (BioDynamics Laboratory Inc.) を用いて環境 DNA を抽出した。次に、各環境 DNA を鋳型に、11F-925R のプライマーペアを用いた PCR で配列を増幅し、得られた PCR 産物を鋳型として T147F-T522R と T147F-T679R を用いた PCR によって目的配列を増幅した。アガロースゲル電気泳動にて PCR 産物を解析した結果、T147F-T522R のプライマーペアを用いた条件では soil-mix 2-4 の配列が増幅され、T147F-T679R のプライマーペアを用いた条件では全ての soil-mix で目的配列の増幅が確認されたことが明らかになった。

以上の結果から、soil-mix 2-4 には *Tumebacillus* 属細菌を含む土壌が存在していると考えられた。次に、soil-mix 2-4 の内、soil-mix 4 に含まれる個々の土壌 (soil 13761、13762、13787、13828、13829、13890 及び 13909) を用いて同様の手法で *Tumebacillus* 属細菌が含まれる土壌を探索した。その結果、soil 13787、13828、13890 及び 13909 から抽出した環境 DNA を鋳型に用いた際は、T147F-T522R 及び T147F-T679R のプライマーペアを用いた両方の条件で目的配列の増幅が認められた (Fig. 1.9)。一方、soil 13761、13762 及び 13829 においては、T147F-T679R のプライマーペアを用いた条件でのみ目的配列の増幅が認められた (Fig. 1.9)。



**Fig. 1.9.** Soil-mix 4 に含まれる土壌から抽出した各環境 DNA を鋳型に、T147F-T522R 及び T147F-T679R のいずれかのプライマーペアを用いた PCR によって得られた PCR 産物のアガロースゲル電気泳動写真

ポジティブコントロールには *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> から抽出した DNA を用い、ネガティブコントロールには *Clostridioides difficile* から抽出した DNA を用いた。プライマーペア名に併記した括弧内の値は増幅配列長を表している。

## *Tumebacillus* 属細菌特異的なプライマーを用いた PCR によって増幅された塩基配列の解析

環境 DNA を鋳型に、T147F-T522R や T147F-T679R のプライマーペアを用いた PCR による産物には、非特異的に増幅された配列が含まれている可能性がある。そこで、soil 13761、13762、13787、13828、13829、13890 及び 13909 の環境 DNA を鋳型に、T147F-T679R のプライマーペアを用いた PCR によって増幅された塩基配列の解析を実施し、*Tumebacillus* 属細菌が含まれる可能性がより高い土壌の選出を試みた。

環境 DNA を鋳型に、T147F-T679R のプライマーペアを用いた PCR によって増幅された断片を pJET1.2/blunt にクローニングし、*E. coli* DH5 $\alpha$  に導入することで目的配列を含むプラスミドを保有する *E. coli* DH5 $\alpha$  を作製した。得られた各 *E. coli* DH5 $\alpha$  から pJETF-pJETR のプライマーペアを用いた PCR を行い、pJET にクローニングした目的配列を増幅した。次に、増幅した配列を解析し、得られた解析結果を BLAST を用いて解析した。その結果、soil 13762、13828 及び 13890 から抽出した環境 DNA を鋳型に、T147F-T679R のプライマーペアを用いた PCR によって増幅された配列には、*Tumebacillus* 属細菌の 16S RNA 遺伝子部分塩基配列との相同性が 99% を超える配列が含まれていることがわかった (Table 1.14)。一方、soil 13761、13787、13829 から抽出した環境 DNA を鋳型に、T147F-T679R のプライマーペアを用いた PCR によって増幅された配列からは、*Tumebacillus* 属細菌の 16S RNA 遺伝子部分塩基配列と高い相同性を示す配列を見出すことができなかった (Table 1.14)。以上の結果より、soil 13762、13828 及び 13890 を *Tumebacillus* 属細菌を含む土壌と判断した。

**Table 1.14.** 環境 DNA から T147F-T679R のプライマーセットを用いた PCR により増幅した塩基配列の BLAST 解析結果

Soil	Clone	Family	Top hit strain	Read length (bp)	Similarity (%)
13761	1	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	94.51
13762	1	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	98.98
13762	2	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	97.97
13762	3	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	<b>100.00</b>
13762	4	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	97.56
13762	5	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	97.97
13787	1	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. soli</i> CAU11108 <sup>T</sup>	492	96.76
13787	2	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. soli</i> CAU11108 <sup>T</sup>	492	96.76
13828	1	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. permanentifrigoris</i> Eur19.5 <sup>T</sup>	492	<b>99.19</b>
13829	1	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. algifaecis</i> THMBR28 <sup>T</sup>	492	93.94
13890	1	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	<b>99.80</b>
13890	2	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. avium</i> AR23208 <sup>T</sup>	492	94.12
13890	3	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. avium</i> AR23208 <sup>T</sup>	492	93.92
13890	4	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. ginsengisoli</i> Gsoil1105 <sup>T</sup>	492	<b>99.59</b>
13890	5	<i>Alicyclobacillaceae</i>	<i>T. avium</i> AR23208 <sup>T</sup>	492	94.32

99% 以上の相同性は太字で示した。

### 1.3.4 土壌からの *Tumebacillus* 属細菌の分離

#### 結果

##### *Tumebacillus* 属細菌の分離及び分離株の簡易同定

これまでに分離が報告されている *Tumebacillus* 属細菌は、pH5–pH9 の培地上での生育が確認されているため、分離培地には pH5 または無調整の R2A 寒天培地を用いた [79–85]。soil 13828 及び 13890 から調整した土壌希釈液 (EtOH 処理済み及び無処理) を分離培地に塗布し、27°C で 1 週間培養後、培養 1 日目及び 7 日目に半透明–透明、淡黄色–無色、緑がやや荒く平面な形状を示す約 3 mm 以下のコロニーを分離株として得た。その結果、soil 13828 からは、培養 1 日目、pH5、EtOH 処理有りの条件で 60 株、培養 1 日目、pH 無調整、EtOH 処理有りの条件で 60 株、培養 7 日目、pH5、EtOH 処理有りの条件で 10 株、培養 7 日目、pH 無調整、EtOH 処理有りの条件で 10 株、培養 7 日目、pH5、EtOH 処理無しの条件で 10 株分離した (Table 1.15)。また、soil 13890 からは、培養 1 日目、pH5、EtOH 処理有りの条件で 60 株、培養 1 日目、pH 無調整、EtOH 処理有りの条件で 60 株、培養 1 日目、pH5、EtOH 処理無しの条件で 120 株、培養 7 日目、pH5、EtOH 処理有りの条件で 40 株、培養 7 日目、pH 無調整、EtOH 処理有りの条件で 30 株、培養 7 日目、pH5、EtOH 処理無しの条件で 20 株分離した (Table 1.15)。次に、得られた各分離株について、設計した *Tumebacillus* 属細菌特異的プライマーである T147F–T679R のプライマーペアを用いた PCR によるスクリーニングを実施した。さらにスクリーニングを通過した株について、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を BLAST を用いて解析した。その結果、培養 1 日目に soil 13828 から分離した計 120 株はいずれもスクリーニングを通過しなかった (Table 1.15)。一方、培養 7 日目に本土壌から分離した計 30 株の内、5 株 (4 株; pH5、EtOH 処理有り、1 株; pH 無調整、EtOH 処理有り) がスクリーニングを通過し、いずれも *Tumebacillus* 属細菌に同定された (Table 1.15)。また、培養 1 日目に soil 13890 から分離した計 240 株の内、15 株 (pH5、EtOH 処理無し) がスクリーニングを通過し、それらの内 6 株が *Tumebacillus* 属細菌に同定された (Table 1.15)。培養 7 日目に本土壌から分離した計 90 株の内、46 株 (21 株; pH5、EtOH 処理有り、22 株; pH 無調整、3 株; EtOH 処理有り、pH5、EtOH 処理無し) がスクリーニングを通過し、それらの内 42 株 (19 株; pH5、EtOH 処理有り、20 株; pH 無調整、EtOH 処理有り、3 株; pH5、EtOH 処理無し) が *Tumebacillus* 属細菌に同定された (Table 1.15)。

**Table 1.15.** Soil 13828 及び 13890 から得た分離株数、PCR スクリーニング通過数及び分離株の簡易同定結果

Soil	Cultivation days	pH	Treatment	Isolates	Passed PCR screening	<i>Timebacillus</i> <sup>a</sup>	Other taxa <sup>a</sup>	N.D. <sup>a,b</sup>
13828	1	5	EtOH	60	0	0	0	0
13828	1	Not adjusted	EtOH	60	0	0	0	0
13828	1	5	-	0	0	0	0	0
13828	1	Not adjusted	-	0	0	0	0	0
13890	1	5	EtOH	60	0	0	0	0
13890	1	Not adjusted	EtOH	60	0	0	0	0
13890	1	5	-	120	15	6	6	3
13890	1	Not adjusted	-	0	0	0	0	0
13828	7	5	EtOH	10	4	4	0	0
13828	7	Not adjusted	EtOH	10	1	1	0	0
13828	7	5	-	10	0	0	0	0
13828	7	Not adjusted	-	0	0	0	0	0
13890	7	5	EtOH	40	21	19	1	1
13890	7	Not adjusted	EtOH	30	22	20	0	2
13890	7	5	-	20	3	3	0	0
13890	7	Not adjusted	-	0	0	0	0	0
			Total	700	66	53	7	6

<sup>a</sup> 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列に基づく

<sup>b</sup> Not determined



**Table 1.16.** 分離株の分離条件と BLAST による簡易同定の結果

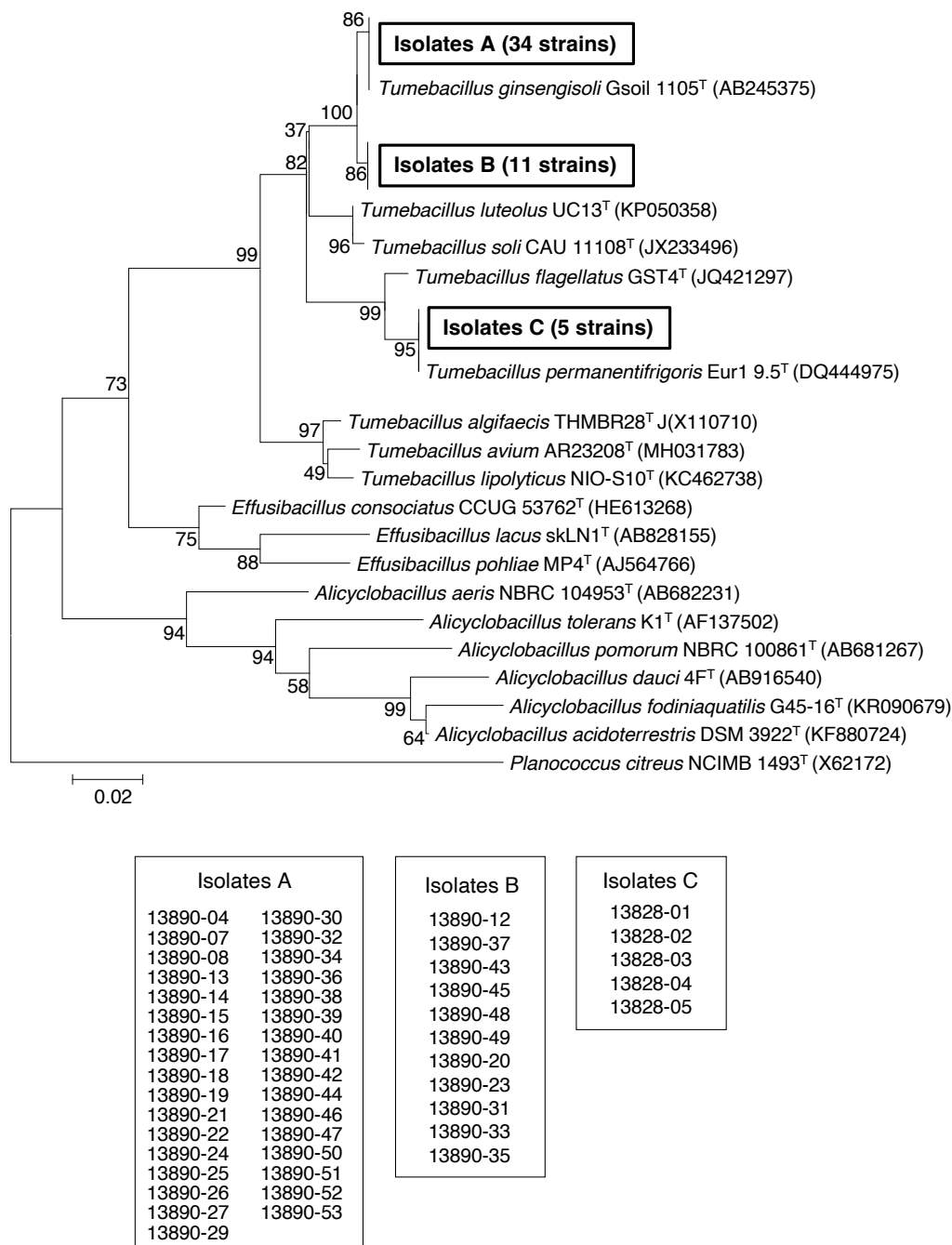
Strain	Soil	Treatment	Medium pH	Genus	Similarity (%)	Read length (bp)
13828	13828-01	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.2	758
13828	13828-02	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.4	741
13828	13828-03	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	98.2	781
13828	13828-04	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.1	784
13828	13828-05	-	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	98.6	781
13890	13890-01	-	5	<i>Cupriavidus</i>	99.7	623
13890	13890-02	-	5	<i>Cupriavidus</i>	99.9	726
13890	13890-03	-	5	<i>Kitasatospora</i>	99.5	366
13890	13890-04	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.6	740
13890	13890-05	-	5	<i>Bacillus</i>	98.8	302
13890	13890-06	-	5	<i>Caballeronia</i>	100.0	168
13890	13890-07	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.7	716
13890	13890-08	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	718
13890	13890-09	-	5	<i>Dyella</i>	100.0	778
13890	13890-10	-	5	<i>Tumebacillus</i>	98.9	699
13890	13890-11	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.7	486
13890	13890-12	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.0	706
13890	13890-13	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.6	742
13890	13890-14	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	713
13890	13890-15	-	5	<i>Tumebacillus</i>	99.4	739
13890	13890-16	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.2	739
13890	13890-17	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.2	739
13890	13890-18	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	760
13890	13890-19	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	98.7	739
13890	13890-20	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.3	787
13890	13890-21	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.6	739
13890	13890-22	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	704
13890	13890-23	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	98.6	783
13890	13890-24	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.7	739
13890	13890-25	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.6	706
13890	13890-26	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	98.9	727
13890	13890-27	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.0	739
13890	13890-28	EtOH	5	<i>Paenibacillus</i>	98.7	752
13890	13890-29	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	714
13890	13890-30	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	714
13890	13890-31	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.5	661
13890	13890-32	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	713
13890	13890-33	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.4	685
13890	13890-34	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.9	714
13890	13890-35	EtOH	5	<i>Tumebacillus</i>	99.1	773
13890	13890-36	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.7	739
13890	13890-37	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.4	722
13890	13890-38	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.2	739
13890	13890-39	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.6	714
13890	13890-40	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.3	739
13890	13890-41	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.9	713
13890	13890-42	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.4	711
13890	13890-43	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.1	764
13890	13890-44	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.7	739
13890	13890-45	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.3	793
13890	13890-46	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.9	716
13890	13890-47	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.9	730
13890	13890-48	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.5	769
13890	13890-49	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.0	783
13890	13890-50	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.9	765
13890	13890-51	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.9	713
13890	13890-52	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.0	784

**Table 1.16.** 分離株の分離条件と BLAST による簡易同定の結果 (続き)

Strain	Soil	Treatment	Medium pH	Genus	Similarity (%)	Read length (bp)
13890	13890-53	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.4	727
13890	13890-54	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	99.6	271
13890	13890-55	EtOH	Not adjusted	<i>Tumebacillus</i>	97.1	480

## 分離株の分子系統解析

BLAST 解析により *Tumebacillus* 属に同定された分離株及び *Tumebacillus* 属細菌に近縁な基準種について、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析を行った。この解析では、分離株には塩基配列解析時に 500 bp 以上の配列が得られた株のみを用いた、その結果、soil 13890 から分離した菌株は isolates A (34 株) 及び B (11 株) のどちらかに分けられ、それらは *T. permanentifrigoris* Eur1 9.5<sup>T</sup> とクレードを形成した (図 1.10)。また、soil 13828 から分離した菌株は isolates C に分けられ、*T. ginsengisoli* Gsoil 1105<sup>T</sup> とクレードを形成した (図 1.10)。従って、分離株は *Tumebacillus* 属細菌であることが改めて示唆された。



**Fig. 1.10.** *Tumebacillus* 属に同定された分離株と近縁な基準種の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく系統樹。系統樹の構築には近隣結合法を用いた。1000 回の反復計算に基づくブートストラップ値をノードに示した。*Planococcus citreus* NCIMB 1493<sup>T</sup> はアウトグループとして使用した。また、塩基配列の解析により、500 bp 以上の配列が得られた株についてのみ系統解析を実施した。

## 1.4 小括及び考察

### 二次代謝産物生合成遺伝子クラスター解析に基づく各細菌属の天然物生産能力比較

第 1.1 節では、*in silico* ゲノム解析を用いて、細菌各属が有するポリケチド、非リボソームペプチド及びテルペンの生合成に関与する BGC (PNT-BGC) の平均数を比較し、二次代謝産物生産能力を予測した。その結果、すでに多くの天然物が報告されている放線菌、藍藻及び粘液細菌は PNT-BGC を多く有することがわかった (Table 1.1、Table S1)。また、天然物探索に未利用な *Tumebacillus* 属は PNT-BGC の平均数が 13 個であることが示された。これは、*Streptomyces* 属 (PNT-BGC: 18.3) 等の天然物生産能力が優秀であるとされる細菌よりも少ないが、32 化合物が発見されている *Rhodococcus* 属 (PNT-BGC: 13.3) や 267 化合物が発見されている *Actinomadura* 属 (PNT-BGC: 13.7) 等には匹敵していた (Table S1)。以上の結果より、*Tumebacillus* 属が二次代謝産物生産能力に優れていると考え、次に天然物探索を行った。

### 未利用微生物資源 *Tumebacillus* 属細菌からの天然物探索

第 1.2 節では、天然物探索に未利用な *Tumebacillus* 属の一菌株である *Tumebacillus permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> から、新規抗 *Bacillus* 活性物質 tumebacin (1)、新規ピラジン系天然物 tumepyrzine (4) 及び 2 つの既知化合物 (4-(2-nitroethyl)phenol (2) と Le-pyrrolopyrazine B (3)) の単離を達成した。また、化合物の取得には至らなかったものの、LCUV を用いた代謝産物解析では、*Tumebacillus* 属細菌の培養液に多数の代謝産物が存在することが示された。以上の結果は、*Tumebacillus* 属は天然物生産能力に優れているという第 1.1 節の予測を裏付けている。従って、BGC の数と種類を指標として二次代謝産物生産能に優れた細菌属を予測し、それらを天然物探索に利用する本戦略の有効性が示された。一方、本研究では、これらの化合物の生合成に関与する BGC を *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の BGC から見出すことができなかった。antiSMASH を用いた解析では、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> がポリケチドや非リボソームペプチドの生合成に関与する BGC を複数有することが明らかになったが、これら *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> が有する BGC が生合成に関与すると思われる化合物を培養液から単離することもできなかった (Table S2)。

本研究では、*Tumebacillus* 属細菌が生産した全ての代謝産物を網羅的に解析した訳では無い。そのため、今回取得しなかった化合物に、ポリケチドや非リボソームペプチド等が含まれていた可能性がある。また、通常の培養条件下では、細菌の一部の BGC は休眠状態にあるため、アクチベーターの発現、リプレッサーの破壊、プロモーターの調節等の生合成遺伝子の発現を向上させる技術を適用することで、新たな二次代謝産物の発見に繋がる可能性がある。

### *Tumebacillus* 属細菌の選択的分離

第 1.3 節では、*Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列に特異的に結合するプライマー (Table 1.13) を設計し、これらを用いた PCR による分離サンプルのスクリーニング、及び 50% EtOH による分離サンプルの処理を組み合わせることで、*Tumebacillus* 属細菌の選択的な分離を実現した。40 土壌 (Table S4) について PCR スクリーニングを実施し、これを通過した 2 土壌 (soil 13828 及び soil 13890) から形態的特徴に基づいてコロニーを選択し分離したところ、両土壌から *Tumebacillus* 属細菌を分離することに成功した。

異なる培養日数 (1 日及び 7 日) で得られた分離株の同定結果を比較すると、soil 13828 及び soil 13890

の両土壌の全条件 (pH5 または無調整、EtOH 有りまたは無処理) において、培養 1 日目に分離した株よりも培養 7 日目に分離した株の方が、*Tumebacillus* 属細菌に同定される割合が高かった (Table 1.15)。また、EtOH 処理を施したサンプルから分離された分離株の方が、*Tumebacillus* 属細菌に同定される割合が高かった。一方、pH 調整を EtOH 処理と組み合わせても、分離株が *Tumebacillus* 属細菌に同定される割合は殆ど変化しなかった。さらに、培養 7 日目にエタノール処理済みサンプルから分離した菌株の内、PCR スクリーニングを通過した菌株の約 9 割は *Tumebacillus* 属細菌に同定された。以上の結果より、EtOH 処理を施したサンプルを用い、7 日間培養、コロニー形態に基づいた分離を実施した上で PCR スクリーニングを行うことで *Tumebacillus* 属細菌の効率的な分離が可能であると考えられた。

T147F-T679R のプライマーペアを用いた PCR により増幅された配列を BLAST で解析した結果、*Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子と相同性が比較的低い (94–99%) 配列が増幅されていたことがわかった (Table 1.14)。従って、本プライマーペアを用いた PCR では、*Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子のみが増幅される訳では無く、非特異的な増幅も起きると考えられる。今回 PCR スクリーニングに用いた *Tumebacillus* 属細菌特異プライマーは、*Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列のみを標的に設計した。そのため、PCR スクリーニングによってより特異的に *Tumebacillus* 属細菌を検出するためには、*Tumebacillus* 属細菌が有する、16S rRNA 遺伝子以外のハウスキーピング遺伝子についても同様にプライマー設計を検討する必要があると言える。

Soil 13828 及び soil13890 から分離し、*Tumebacillus* 属に同定された 50 株について分子系統解析を実施した結果、soil 13828 から分離した 5 株 (isolates C) は全て *T. permanentifrigoris* Eur1 9.5<sup>T</sup> とクレードを形成した (Fig. 1.10)。また、soil 13890 から分離した 45 株は全て *T. ginsengisoli* Gsoil 1105<sup>T</sup> とクレードを形成した (Fig. 1.10)。これらの結果から、soil 13828 から分離した 5 株は全て *T. permanentifrigoris* Eur1 9.5<sup>T</sup> に、soil 13890 から分離した 45 株は全て *T. ginsengisoli* Gsoil 1105<sup>T</sup> に近縁な種である可能性が高いと考えられる。

## 1.5 実験項

### 1.5.1 antiSMASH を用いた二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの解析

Genbank [58] より fasta 形式でダウンロードした 21,052 のゲノムデータを antiSMASH 5.1.1 [57, 86] を用いて解析した。antiSMASH による解析は、MacBook 上に構築した docker 環境上で実行した。また、antiSMASH による解析時の遺伝子アノテーションアルゴリズムには、Prodigal を用いた。次に、ポリケチド合成酵素 (PKS)、非リボソームペプチド合成酵素 (NRPS)、及びテルペン合成酵素 (TS) をコードする遺伝を含む BGC (PNT-BGC) の数をカウントした。この時、type I PKS、type II PKS、type III PKS、transAT-PKS、transAT-PKS-like 及び PKS-like は PKS として、NRPS 及び NRPS-like は NRPS として判別した。また、1 つの sBGC に複数の PKS、NRPS 及び TS をコードする遺伝子がある場合や、それらの遺伝子が組み合わさった sBGC (ハイブリッド sBGC) であっても 1 つの PNT-BGC としてカウントした。このカウントは、解析時に antiSMASH によって形成される HTML ファイルに記載されている BGC アノテーションに基づいて実行した。

### 1.5.2 新規天然物獲得のための *Tumebacillus* 属細菌培養液のスクリーニング

#### スクリーニングサンプルの調製

*Tumebacillus* 属細菌の菌体を寒天培地より 1 白金耳掻き取り、*T. algifaecis* NBRC 108765<sup>T</sup>、*T. flagellatus* DSM 25748<sup>T</sup> は R2A 培地、*T. avium* JCM 32188<sup>T</sup> は nbrc-702 培地、*T. ginsengisoli* DSM 18389<sup>T</sup>、*T. luteolus* JCM 19866<sup>T</sup>、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> は jcm-663 培地にそれぞれ植菌し、300 rpm、27°C の条件で 2 日間振盪培養した。続いて、これら 6 菌株の培養液をそれぞれ、51 培地、57 培地、60 培地、61 培地、301 培地、B1 培地、B2 培地及び B10 培地 (計 8 種類) 10 mL に 1% 植菌し、300 rpm、27°C で 4 日間振盪培養した。続いて、各培養液に等量のエタノールを加え、300 rpm で 2 時間振盪し、エタノールブロスとした。さらに、エタノールブロスを 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を培養液サンプルして得た。また、植菌していないそれぞれの培地について同様に処理し、培地コントロールサンプルとした。

#### 抗菌活性スクリーニング

検定菌には *B. subtilis* ATCC 6633、*K. rhizophila* ATCC 9341、*X. oryzae* KB88、*E. coli* NIHJ、*C. albicans* ATCC 64548 及び *M. racemosus* IFO 4581 を用いた。真菌は GY 培地、細菌は 7 培地に混釈し、固化することで検定プレートを作製した。各スクリーニングサンプル 20 µL を 8 mm 厚手のペーパーディスクに染み込ませ乾燥させた後、これらのペーパーディスクを検定プレートに載せた。真菌と *X. oryzae* KB88 の検定プレートは 27°C、その他の細菌の検定プレート 37°C で一晚培養後、ディスク周囲に形成された阻止円の直径及び透明度を目視にて観察した。

#### HPLC を用いた代謝産物解析によるスクリーニング

各スクリーニングサンプルを HPLC で分析 (吸光波長: 210 nm、254 nm) し、クロマトグラムを比較した。培地コントロールサンプルのクロマトグラムにはないピークを代謝産物ピークとし、そのピーク数を数えた。

### 1.5.3 *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> が生産する天然物取得

#### *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の培養

##### *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の種培養

R2A 寒天培地上で継代培養されていた *T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> を一白金耳掻き取り、NB 培地 (500 mL 容三角フラスコ) に 1% 植菌し、ロータリーシェイカー (210 rpm) にて、27°C で 2 日間振盪培養した。この培養液を、60 培地 (1 と 2 の単離) 及び 51 培地 (4 及び 3 の単離) に植菌した

##### Tumebacin (1) 及び 4-(2-nitroethyl)phenol (2) の発酵生産

種培養液を 60 培地 6 L (500 mL 容三角フラスコ 60 本) に 1% 植菌し、ロータリーシェイカー (210 rpm) にて、27°C で 4 日間培養した。

##### Tumepyrzine (4) 及び Le-pyrrolopyrazine B (3) の発酵生産

種培養液を、51 培地 1 L (500 mL 容三角フラスコ (10 本)) に 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 4 日間振盪培養した。また、51 培地 5 L (7 L 容ジャーファーマンター) に種培養液 50 mL を接種し、攪拌翼によって 150 rpm で攪拌しつつ、0.2 VVM で通気しながら 27°C で 4 日間培養した。

#### 天然物の単離

##### Tumebacin (1) 及び 4-(2-nitroethyl)phenol (2) の単離

化合物の単離は Scheme 1.1 に従った。1 は光に弱いため、下記の操作は遮光条件下で行った。また、単離は、LC-HRMS 分析及び抗 *Bacillus* 活性を指標に実施した。

4 日間培養した培養液 6 L を 3,000 rpm で 15 分間遠心分離し、上清を得た。上清を、等量の EtOAc で抽出後、水層と EtOAc 層をそれぞれ得た。水層を HCl (12 mol L<sup>-1</sup>) で pH 2 に調整し、再度等量の EtOAc で抽出し、酸性 EtOAc 層を得た。この酸性 EtOAc 層を減圧乾固し、得られた粗精製物 (3.5 g) を 2 mL の MeOH に懸濁し、10,000 rpm で 1 分間遠心分離した。続いて、沈殿物を 2 mL の MeOH:CHCl<sub>3</sub> 混合溶媒 (混合比率 2:1) に懸濁し、再度同条件で遠心分離した。さらに、沈殿物を 1 mL の MeOH に懸濁し、同じ条件で遠心分離し、沈殿物を減圧乾固することで、1 (30.6 mg) を得た。また、これらの操作で分けられた、有機溶媒抽出物と、最初の EtOAc 抽出によって得た EtOAc 層を混合し、減圧乾固した。乾固物を少量の MeOH に懸濁した後、シリカゲルカラム (40 i.d. × 90 mm) に供し、CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane 系溶媒 (各 300 mL; 0、50、100 %, v/v) で化合物を段階溶出し、100% CHCl<sub>3</sub> 画分を減圧乾固した。得られた乾固物 (0.2 g) を少量の MeOH に懸濁し、ODS カラム (20 i.d. × 135 mm) に供し、MeOH/H<sub>2</sub>O 系溶媒 (各 100 mL; 0、10、20、40、60、80、100%, v/v) で化合物を段階的に溶出し、40% MeOH<sub>aq</sub> 画分を減圧乾固した。得られた粗精製物 (24.1 mg) を少量の MeOH に溶解し、分取 HPLC (装置; LaChrom Elite, カラム; PEGASIL-ODS-SP100 (20 i.d. × 250 mm) に供し、40% (v/v) MeOH<sub>aq</sub> (7.0 mL/min) で化合物を溶出した。保持時間 27 分のピークを分取した後、減圧乾固し、2 (13.0 mg) を得た。

##### Tumepyrzine (4) 及び Le-pyrrolopyrazine B (3) の単離

化合物の単離は Scheme 1.2 に従った。4 日間培養した培養液を混ぜ合わせ (計 6 L)、3,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を HP20 カラムに供し、MeOH/H<sub>2</sub>O 系溶媒 (1.5 L; 0、50、100%, v/v) で化合物を段階溶出した。100% MeOH 画分 (1.5 L) を減圧乾固し、得られた粗精製 (1.04 g) を少量の MeOH に溶解し、ODS カラムに供し、MeOH/H<sub>2</sub>O 系溶媒 (90 mL; 20、40、60、80、100%, v/v) で化合物を段階的に溶出した。60% MeOH<sub>aq</sub> 画分を減圧乾固し、得られた乾固物 (0.37 g) を少量の MeOH に溶解した。これを分取 HPLC (装置; LaChrom Elite, カラム; PEGASIL-ODS-SP100 20 i.d. × 250 mm) に供し、40% MeOH<sub>aq</sub> (v/v,

7.0 mL min<sup>-1</sup>) で化合物を溶出し、保持時間 49.5 分と 80 分のピークを分取した。各ピークの画分をそれぞれ減圧乾固し、**3** (22.6 mg) と **4** (0.7 mg) を得た。

## 1.5.4 取得した化合物の物性測定

### UV 吸光度測定

UV 吸光度は、Supectra Max Quick Drop 分光計を用いて次のように測定した。化合物の 0.01 mg mL<sup>-1</sup> MeOH 溶液を調製し、光路長 1 cm のキュベットを用いて測定した。また、MeOH を同様に計測し、この吸光度をバックグラウンドとして差し引いた。

### IR 吸光度測定

IR 吸光度の測定には、フーリエ変換赤外分光器 FT-4600 を用いた。化合物の 1.0 mg mL<sup>-1</sup> MeOH 溶液を調製し、測定部位に滴下した後風乾し、測定した。

### 融点測定

**1** 及び **4** の融点測定は、MP-500P を用いて次のように行った。極少量の化合物 (固体) をカバーガラス上に載せ、徐々に加熱しながら肉眼にて化合物の様子を観察した。

## 1.5.5 取得した化合物の構造解析

### NMR 測定

**1** の NMR 測定には JNM-ECA-500 を用いた。また、重溶媒には DMSO-*d*<sub>6</sub> を使用した。

**2**、**4** 及び **3** の NMR 測定には、Agilent 400-MR DD2 を用いた。また、**2** 測定時の重溶媒には CDCl<sub>3</sub> を、**3** 及び **4** には CD<sub>3</sub>OD を用いた

### 改良マーフィー法によるアミノ酸分析

0.1 mg の **1** に 6 mol L<sup>-1</sup> HCl 200 µL を加え、100 °C で一晩インキュベートした。反応液にさらに 6 mol L<sup>-1</sup> HCl 200 µL を加え、さらに同条件で 10 時間インキュベートした。その後、反応液に H<sub>2</sub>O 1 mL を加え、EtOAc 2 mL で抽出した。水層を減圧乾固し、H<sub>2</sub>O 5 mL に溶解後、溶液を再び減圧乾固し、HCl を完全に除去した。乾固物を 50 µL の H<sub>2</sub>O に溶解後、1 mol L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>aq. 20 µL と 1% (w/v) D-FDLA アセトン溶液 50 µL を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。反応液に 1 mol L<sup>-1</sup> HCl 25 µL を加えて中和し、減圧乾固した後、残留物を 1 mL のアセトニトリルに溶解し、LC-HRMS で分析し、アミノ酸標準物質の D-FDLA 誘導体と比較した。

## 1.5.6 Tumbacin (1) の抗菌活性試験

検定菌にはグラム陽性細菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633、*Staphylococcus aureus* ATCC 6538P、*Kocuria rhizophila* ATCC 9341 及び *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607)、グラム陰性細菌 (*Escherichia coli* NIHJ、*Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031、*Pseudomonas aeruginosa* IFO 3080、*Xanthomonas oryzae* KB88 及び *Proteus vulgaris* NBRC 3167) 及び真菌 (*Candida albicans* ATCC 64548、*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763、*Aspergillus niger* ATCC 6275 及び *Mucor racemosus* IFO 4581) を用いた。真菌は GY 培地、細菌は 7 培地に混釈し、固化させることで検定プレートを作製した。**1** の DMSO 溶液をペーパーディスク (6mm, 薄手) に染み込ませ、減圧乾固した。この時、ペーパーディスク 1 枚あたりの **1** の量は 10 µg 及び 20 µg とした。検定プレートにペーパーディスクを載せ、真菌と *X. oryzae* KB88 の検定プレートは 27°C、その他の



細菌の検定プレート 37°C で一晩培養後、ディスク周囲に形成された阻止円の直径及び透明度を目視にて観察した。

1 の *B. subtilis* ATCC 6633 に対する MIC の測定は、Clinical and Laboratory Standards Institute のガイドラインに従って、microtiter broth dilution 法にて実施した [87]。また、1 の溶解と希釈には DMSO を用い、*B. subtilis* ATCC 6633 の培地にはミューラーヒントン培地を用いた。

## 1.5.7 *Tumebacillus* 属細菌の選択的分離法の開発

### *Tumebacillus* 属細菌の EtOH 耐性 及び熱耐性試験

#### 試験菌懸濁液調製

検討には、*T. avium* JCM 32188<sup>T</sup>、*T. flagellatus* DSM 25748<sup>T</sup>、*T. ginsengisoli* DSM 18389<sup>T</sup>、*T. luteolus* JCM 19866<sup>T</sup>、*T. permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> 及び *B. subtilis* ATCC 6633 の芽胞懸濁液と、*E. coli* NIHJ 及び *K. rhizophila* ATCC 9341 の菌体懸濁液を用いた。

*Tumebacillus* 菌株の芽胞懸濁液は次のように調製した。R2A 寒天培地上で 5 日間培養後、2mL のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を寒天培地上に滴下し、コンラージ棒を用いて菌体を掻き取りながら懸濁した。その後、懸濁液をピペットで回収し、PBS で 1/100 に希釈した。また、希釈液中の芽胞はウィルツ芽胞染色によって確認した (Fig. S1)。芽胞の発芽を抑制するため、*Tumebacillus* 属細菌の懸濁液は、適宜調製し氷上にて取り扱った。*B. subtilis* ATCC 6633、*E. coli* NIHJ 及び *K. rhizophila* ATCC 9341 の菌体懸濁液には、冷蔵保存されていた培養液を PBS で 1/100 に希釈して用いた。

#### 熱耐性試験

懸濁液 500 µL を遠沈管に分注し、これをヒートブロックもしくは湯浴中で加温後、速やかに室温まで冷却した。その後、懸濁液を R2A 寒天培地に塗布し、27°C で 3 日間培養した。

#### EtOH 耐性試験

懸濁液 200 µL を遠沈管に分注し、これに等量の EtOH を添加し、30 分間室温で静置した。続いて、懸濁液を 12,000 rpm で 3 分間遠心分離し、沈殿に PBS 400 µL を加えて再懸濁することでエタノールを除去した。その後、懸濁液を R2A 寒天培地に塗布し、27°C の条件下で 3 日間培養した。

## PCR による塩基配列の増幅、解析及び相同配列の検索

### PCR による目的配列の増幅

PCR に用いた反応液の組成は Table 1.17 に従い、反応条件は Table 1.18 に従った。また、本研究に用いたプライマーは Table 1.19 にまとめた。

**Table 1.17.** 1 サンプル当たりの PCR 反応液の組成

Reagent	Volume
Q5 polymerase	0.1
5×Q5 buffer	4.0
dNTP mixture (2.5 µmol L <sup>-1</sup> )	0.4
Forward primer (5 µmol L <sup>-1</sup> )	1.0
Reverse primer (5 µmol L <sup>-1</sup> )	1.0
Template DNA sol.	1.0
H <sub>2</sub> O	13.0

**Table 1.18. PCR における反応条件**

Step	Temperature (°C)	Time (min)	No. of cycle
Initial enaturation	95	1	1
Denaturation	95	1	
Annealing	50	1	35
Extension	72	1	
Final extension	72	2	1
Hold	4	∞	1

**Table 1.19. 本研究で用いた PCR プライマー**

Priemr	Orientation	Sequence (5' to 3')
11F	Forward	AGTTTGATCATGGCTCAG
925R	Reverse	CTTGAAACGAGTGCTAATA
T147F	Forward	CTTGAAACGAGTGCTAATA
T504F	Forward	CYTGACGGTAACAGAGGAG
T522R	Reverse	CTCCTCTGTTACCGTCARG
T679R	Reverse	TTCCCCTTGCTCTCCGA
pJetF	Forward	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJetR	Reverse	CTGCCATGGAAAATCGATGTTCTT

### 塩基配列の解析

PCR 産物 2.5  $\mu\text{L}$  に ExoSAP (exonuclease I : shrimp alkaline phosphatase = 1:2 ) 1  $\mu\text{L}$  をそれぞれ加え、37°C、15 min で酵素処理後、80°C、15 min で酵素を失活させた。その後、配列増幅に用いた forward または reverse プライマー (5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ 、H<sub>2</sub>O 14  $\mu\text{L}$  及び DMSO 1.5  $\mu\text{L}$  を加え、配列解析サンプルとした。配列解析は、ユーロフィンジェノミクス株式会社 (<https://eurofinsgenomics.jp/jp/home/>) に依頼した。

### BLAST を用いた相同配列の検索

BLAST には NCBI BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) を用い、参照データベースには rRNA/ITS databases の 16S ribosomal RNA sequence (Bacteria and Archae) を用いた。塩基配列を入力し、検索後、最も相同性が高い検索結果を採用した。

## *Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子特異的なプライマーの設計とプライマーを用いた PCR の条件検討

### *Tumebacillus* 属細菌に特異的なプライマーの設計

*Tumebacillus* 属細菌、*Alicyclobacillus* 属、*Effusibacillus* 属、*Kyrpidia* 属及び *Sulfobacillus* 属の 16S rRNA 遺伝子配列を、MEGA 6 [88] に実装されている Muscle アルゴリズムによってマルチプルアライメントし、*Tumebacillus* 属細菌に特異性が高い配列の領域を探した。見出した配列を BLAST を用いて解析することで、それら配列と相同性が高い他の細菌の 16S rRNA 遺伝子塩基配列が存在しないことを確認した。

## *Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR による土壌のスクリーニング

スクリーニングには、日本各地から収集した 40 土壌 (Table S4) を用いた。スクリーニングの実施にあたり、まずそれら 40 土壌を 10 土壌ずつに分け、それらについて以下の方法で環境 DNA の抽出と PCR によるスクリーニングを実施した。次に、そのスクリーニングを通過した 10 土壌について、個別に同様手順で

環境 DNA 抽出と PCR によるスクリーニングを実施した。

#### 環境 DNA の抽出

Table S4 に示した 40 土壌について、1 土壌につき 0.1 g 量り取り、10 土壌を 1 つにまとめることで soil-mix 1-4 を調製した。次に、Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2 (BioDynamics Laboratory Inc.) を用い、各 soil-mix から環境 DNA を抽出した。単一土壌から環境 DNA を抽出する場合は、1 土壌につき 1.0 g を量り取り、同様の手順で抽出した。

#### *Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR

抽出したそれぞれの環境 DNA を鋳型とし、アウタープライマーに 11F-925R を、インナープライマーに T147F-T522R 及び T147F-T679R を用いた nested PCR により目的配列を増幅した。インナープライマーを用いた配列増幅の際は、アウタープライマーを用いた PCR の産物を H<sub>2</sub>O で 100 倍に希釈し、鋳型 DNA 溶液に用いた。それぞれの反応条件は Table 1.18 に従ったが、アウタープライマーを用いた PCR の際はアニーリング温度を 50°C に、インナープライマーを用いた PCR の際はアニーリング温度を 70°C に変更した。次に、インナープライマーを用いた PCR の産物をアガロースゲル電気泳動し、目的長のバンドが確認された soil-mix をスクリーニング通過とした。単一土壌の環境 DNA についても、同様の手順でスクリーニングを実施した。

### 1.5.8 *Tumebacillus* 属細菌特異的なプライマーを用いた PCR によって増幅された塩基配列の解析

環境 DNA は、様々な生物に由来する塩基配列が混合しているため、環境 DNA を鋳型に用いた PCR 産物には様々な増幅配列が含まれることが考えられる。そこで、以下の方法で各増幅配列をクローニングすることにより、各配列を単一の配列として解析した。

#### pJET1.2/blunt ベクターへの増幅配列のクローニング

pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific) の EcoRV 消化物を NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (タカラバイオ株式会社) を用いてアガロースゲルから抽出及び精製した。次に、環境 DNA を鋳型に、T149F-T679R を用いた PCR によって得られた PCR 産物を、T4 DNA ligase を用いて pJET1.2/blunt ベクターの断片にクローニングした。続いて、クローニング産物を *E. coli* DH5 $\alpha$  に導入し、アンピシリン (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) を含む LB 寒天培地を用いてベクター保有株を選択した。

#### 挿入配列の解析

ベクター保有株について、pJETF-pJETR のプライマーペアを用いたコロニー PCR により、挿入配列を含む領域の増幅を行った。コロニー PCR では、鋳型 DNA 溶液の代わりに H<sub>2</sub>O 及び掻き取ったコロニーの菌体を直接加えた PCR 溶液を鋳型用いた。コロニー PCR 後、550 bp の増幅が確認された PCR 産物について、増幅配列を解析した。解析後、T147F 及び T679R の領域を含む配列を選択し、それらプライマー領域の内側の塩基配列について、BLAST を用いた相同配列の検索を実施した。

### 1.5.9 *Tumebacillus* 属細菌の分離

#### 土壌サンプル中の細菌の分離

分離源となる土壌サンプル 0.1 g に対して PBS を 0.9 mL 加え、懸濁することで土壌希釈液 (10<sup>-1</sup> 倍) とした。次に、この土壌希釈液 (無処理) を PBS を用いて 10<sup>-6</sup> 倍まで 10<sup>-1</sup> ずつ段階的に希釈した。また、各

土壌希釈液に対して等量の EtOH を加え混合後、30 min 静置することで土壌希釈液 (EtOH 処理) を得た。pH 無調整の R2A 寒天培地及び HCl を用いて pH5 に調整した R2A 寒天培地 20 mL のプレートに、無処理の土壌希釈液 ( $10^{-3}$ – $10^{-6}$ ) を 200  $\mu$ L あるいは EtOH 処理済みの土壌希釈液 ( $10^{-3}$ – $10^{-6}$ ) を 400  $\mu$ L 塗布し、27 °C で 1–7 日間培養した。培養 1 日目及び 7 日目に、コロニーの形態を観察し、半透明–透明、淡黄色–無色、縁がやや荒く平面な形状を示す約 3 mm 以下のコロニーを純化し、分離株として得た。

#### *Tumebacillus* 属細菌の 16S rRNA 遺伝子に特異的なプライマーを用いた PCR による分離株のスクリーニング

MightyPrep reagent for DNA (タカラバイオ) を用いて 掻き取った分離株の菌体から DNA 抽出した。次に、10 株の DNA 抽出液を 0.1  $\mu$ L ずつ混合し、これら混合液について第 1.5.7 節と同様に PCR によるスクリーニングを実施した。このスクリーニングを通過した混合液に含まれるそれぞれの DNA 抽出液について、再度同様のスクリーニングを行うことで、*Tumebacillus* 属細菌候補を絞り込んだ。

#### 分離株の塩基配列解析と BLAST

スクリーニングを通過した分離株の DNA 抽出液を鋳型に、11F-925R を用いた PCR により増幅された塩基配列を解析した。この時、配列解析用のプライマーには 11F または 925R を用いた。続いて、解析された各塩基配列における解読可能領域について、BLAST を用いて相同配列を検索した。

## 第2章

### 希少放線菌からの新規微生物資源の開拓

#### 2.1 二次代謝産物生合成遺伝子クラスターに基づく希少放線菌属の天然物生産能力の比較

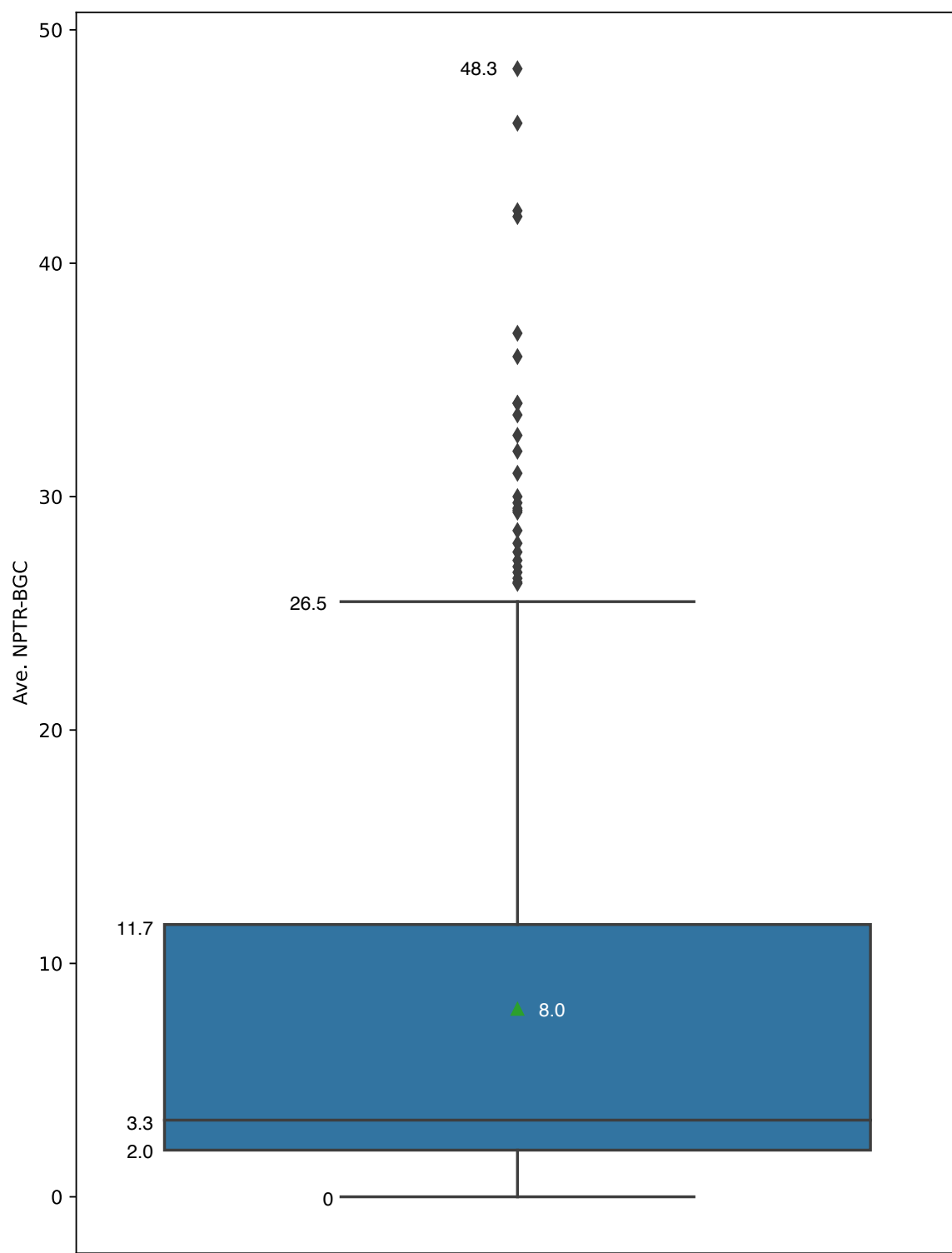
放線菌は天然物の探索源として重要であり、本分類群からはこれまでに 12,000 以上の天然物が取得されてきた。しかし、実際には、7 割以上の放線菌由来天然物は *Streptomyces* 属から取得されており、希少放線菌と呼ばれる *Streptomyces* 属以外の放線菌からはあまり天然物が探索されてこなかった [89]。一方、第 1 章にて細菌のゲノムを解析した結果、一部の希少放線菌は多くの BGC を持つことがわかり、それらが高い天然物生産能力を有することが期待された (Table S1)。ここでは、*Actinomycetota* 門ゲノムから BGC を解析し、第 1 章と同様に属毎の BGC の種類と数を比較した。さらに、それら BGC の多様性を評価することで、より天然物の生産性に優れた希少放線菌の探索を試みた。

##### 2.1.1 二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの統計解析

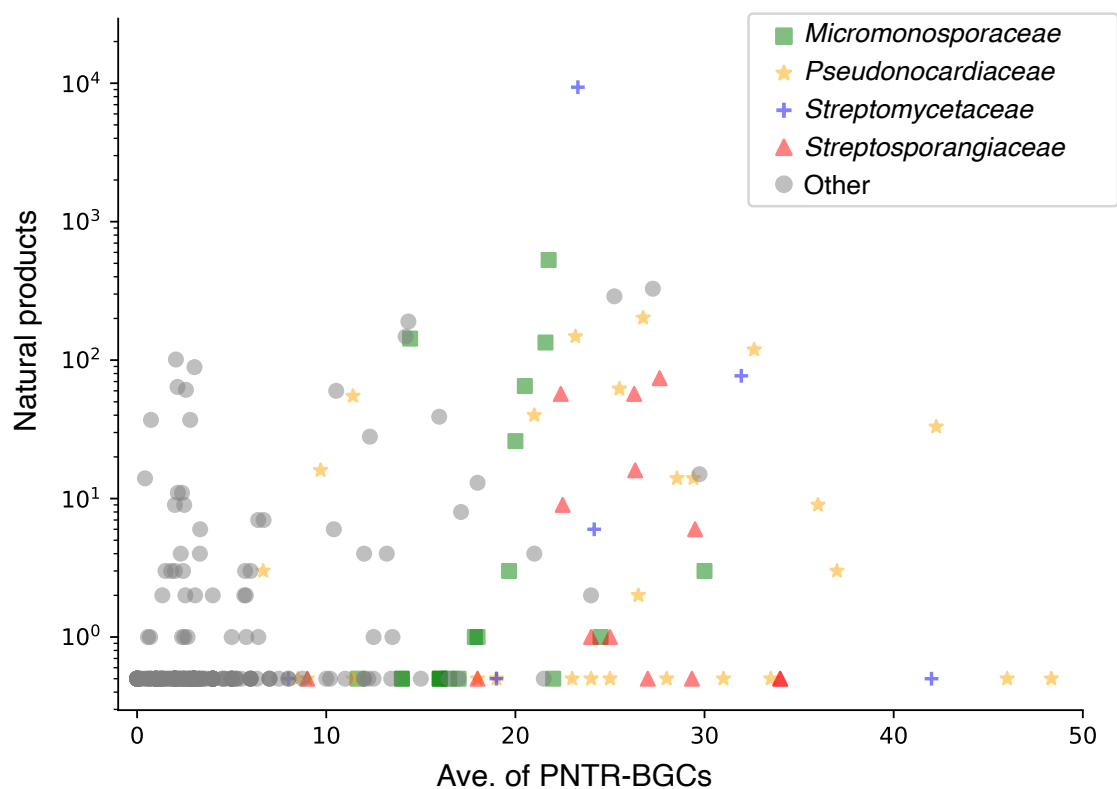
###### 結果

6,781 の放線菌 (*Actinomycetota* 門細菌) ゲノム (scaffold: 4,148、complete: 2,633) を antiSMASH で解析し、各株のポリケチド、非リボソームペプチド、テルペン及びリボソーム翻訳後修飾ペプチドの生合成に関与する BGC (PNTR-BGC) の数を集計した。次に、それらの値から、各属毎の平均 PNTR-BGC 数を算出した。属毎の平均 PNTR-BGC 数を統計解析した結果、最小値は 0、第 1 四分位数は 2.0、第 2 四分位数は 3.3、第 3 四分位数は 11.7、平均値は 8.0、外れ値を含まない最大値は 26.5、外れ値を含む最大値は 48.3 であった (Fig. 2.1)。また、平均値 (8.0) と中央値 (第 2 四分位数; 3.3) に乖離が見られ、四分位範囲は 8.4 (3.3–11.7) であった。これらの結果から、*Actinomycetota* 門においては、一部の限られた属が多くの PNTR-BGC を有し、他の多くの属はあまり PNTR-BGC を有さないことが明らかになった (Fig. 2.1、Table S6)。このことから、本研究では、統計解析において PNTR-BGC が外れ値 (26.5–48.0) になった *Crossiella* 属や *Actinocrispum* 属等を除外せず、以下に続く比較や解析を行った (Table 2.1)。

次に、多くの PNTR-BGC を有する属のグループについて、分類、PNTR-BGC 数及び天然物数を調査した。その結果、最も天然物が報告されている *Streptomyces* 属と同等以上 (>23.3) の PNTR-BGC を有する 35 属は、*Actinospicaceae* 科 (1 属)、*Frankiaceae* 科 (1 属)、*Micromonosporaceae* 科 (2 属)、*Nocardiaceae* 科 (1 属)、*Pseudonocardiaceae* 科 (16 属)、*Streptomycetaceae* 科 (3 属)、*Streptosporangiaceae* 科 (10 属) 及び *Thermomonosporaceae* 科 (1 属) に属することがわかった。 (Fig. 2.2、Table 2.1、Table S6)。



**Fig. 2.1.** *Actinomycetota* 門各属の PNTR-BGC 平均数の分布  
△: 平均値



**Fig. 2.2.** *Actinomycetota* 門各属における PNTR-BGC の平均数と報告されている天然物数  
天然物数を対数で表記している都合上、一つの天然物も報告されていない属については天然物数を 0.5 とし  
てプロットした。

**Table 2.1.** *Actinomycetota* 門各属における PNTR-BGC 数 (Table S6 より一部抜粋)

Family	Genus	Complete	Scaffold	Ave. all BGC	Ave. PNTR-BGC	NPs
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Crossiella</i>	0	3	57.3	48.3	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinocrispum</i>	0	1	55.0	46.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Kibdelosporangium</i>	1	3	51.8	42.3	33
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Embleya</i>	0	2	48.0	42.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Allokutzneria</i>	0	1	46.0	37.0	3
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Kutzneria</i>	2	1	45.3	36.0	9
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Thermocatellispora</i>	0	1	39.0	34.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Bailinhaonella</i>	0	1	36.0	34.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Sciscionella</i>	0	2	39.0	33.5	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Saccharothrix</i>	3	5	39.4	32.6	119
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Kitasatospora</i>	4	14	38.5	31.9	77
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Longimycelium</i>	0	1	36.0	31.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Polymorphospora</i>	1	0	33.0	30.0	3
<i>Frankiaceae</i>	<i>Frankia</i>	3	27	31.6	29.7	15
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Acrocarpospora</i>	0	4	34.5	29.5	6
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinokineospora</i>	0	12	35.5	29.4	14
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Herbidospora</i>	0	6	30.7	29.3	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Lentzea</i>	1	21	33.9	28.5	14
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Labedaea</i>	0	1	32.0	28.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Streptosporangium</i>	1	7	31.5	27.6	74
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	31	36	31.3	27.3	328
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Sinosporangium</i>	0	1	32.0	27.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>	22	35	33.9	26.8	202
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Umezawaea</i>	0	2	31.0	26.5	2
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Microtetraspora</i>	0	3	29.0	26.3	16
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Nonomuraea</i>	4	28	30.1	26.3	57
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinosynnema</i>	2	0	27.5	25.5	62
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	5	25	30.0	25.2	289
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Solihabitans</i>	0	1	33.0	25.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Planobispora</i>	0	1	27.0	25.0	1
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Phytohabitans</i>	2	0	27.0	24.5	1
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptacidiphilus</i>	2	10	32.8	24.2	6
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinophytocola</i>	0	1	31.0	24.0	0
<i>Actinospicaceae</i>	<i>Actinospica</i>	0	1	28.0	24.0	2
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Planomonospora</i>	0	2	26.0	24.0	1
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	342	0	31.2	23.3	9360

*Streptomyces* 属よりも PNTR-BGC が多い希少放線菌属を抜粋した。



## 2.1.2 二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの多様性解析

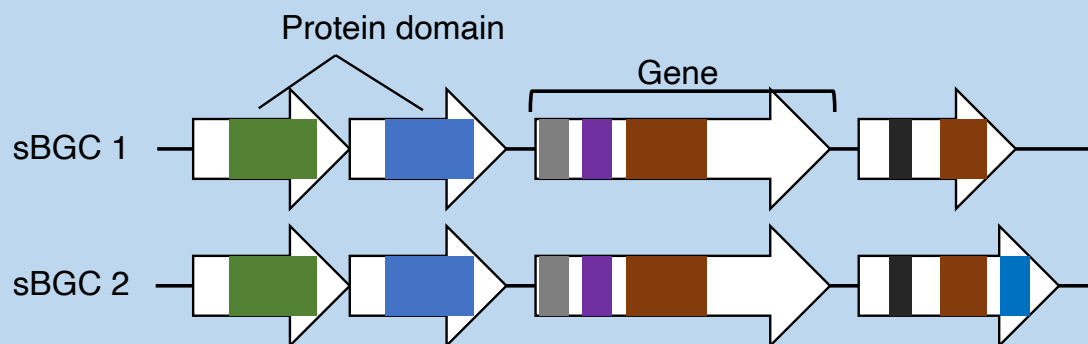
二次代謝産物の構造は、生合成遺伝子の有する機能とそれら遺伝子の組み合わせによって左右される。そのため、ある分類群における sBGC の多様性は、その分類群から得られる二次代謝産物の構造的な多様性の指標になると考えられる。BiG-SCAPE は、sBGC 中の生合成遺伝子が有するタンパクドメイン (タンパクの機能単位) に基づいて sBGC 間の類似性を解析し、類似する sBGC を 1 つの遺伝子クラスターファミリー (GCF) に分類し、さらに類似する GCF を 1 つの遺伝子クラスタークラン (GCC) に分類する解析ツールである (Fig. 2.3) [90]。本研究では各科における PNTR-BGC の多様性を調べるために BiG-SCAPE を用いて、*Micromonosporaceae* 科、*Nocardiaceae* 科、*Pseudonocardiaceae* 科、*Streptomycetaceae* 科および *Streptosporangiaceae* 科から見出された PNTR-BGC を科毎に解析した。なお、GCC の解析並びに以下述べた統計解析においては、*Streptomycetaceae* 科を希少放線菌属と *Streptomyces* 属に分けて解析した。

GCC の解析後、菌株間の GCC の一致率と菌株間の 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性を算出し、それらの値の関係を調査した。その結果、*Streptomyces* 属では、同種 (16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 98.7% 以上 [91]) 間における GCC の一致率は 10–100% と幅広いことがわかった (Fig. 2.4)。一方、異種 (16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 98.7% 未満) 間における GCC の一致率は 0–40% 程であり特に 0% または 10–20% を示すことが多かった。同様の傾向は *Micromonosporaceae* 科、*Pseudonocardiaceae* 科、*Streptomycetaceae* 科希少放線菌および *Streptosporangiaceae* 科に見られたが、*Streptomycetaceae* 科希少放線菌の異種間における GCC の一致率は他よりもやや高い値 (20–40%) を示した。一方、*Nocardiaceae* 科においては、同種間における GCC の一致率は比較的高い値 (60–100%) を示し、異種間における GCC の一致率はほぼ変動せず高い値 (60–90%) を示す傾向にあった。

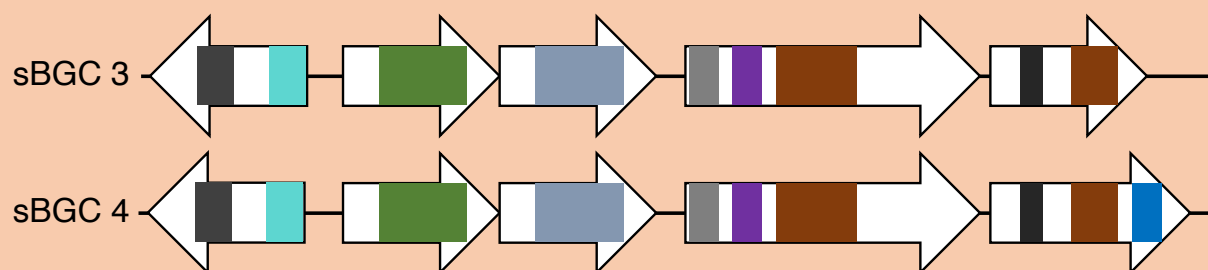
以上の PNTR-BGC の多様性解析の結果から、*Micromonosporaceae* 科、*Pseudonocardiaceae* 科、*Streptomycetaceae* 科希少放線菌および *Streptosporangiaceae* 科は、*Streptomyces* 属と同様に多様な二次代謝産物を生産する可能性が示唆された。

## Gene Cluster Clan

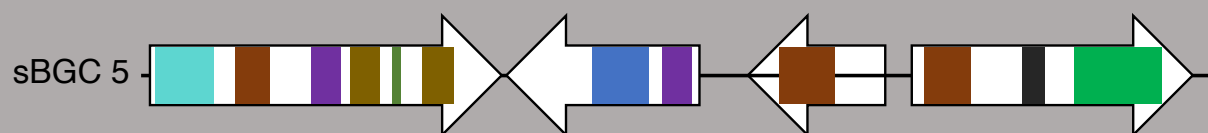
### Gene Cluster Family 1



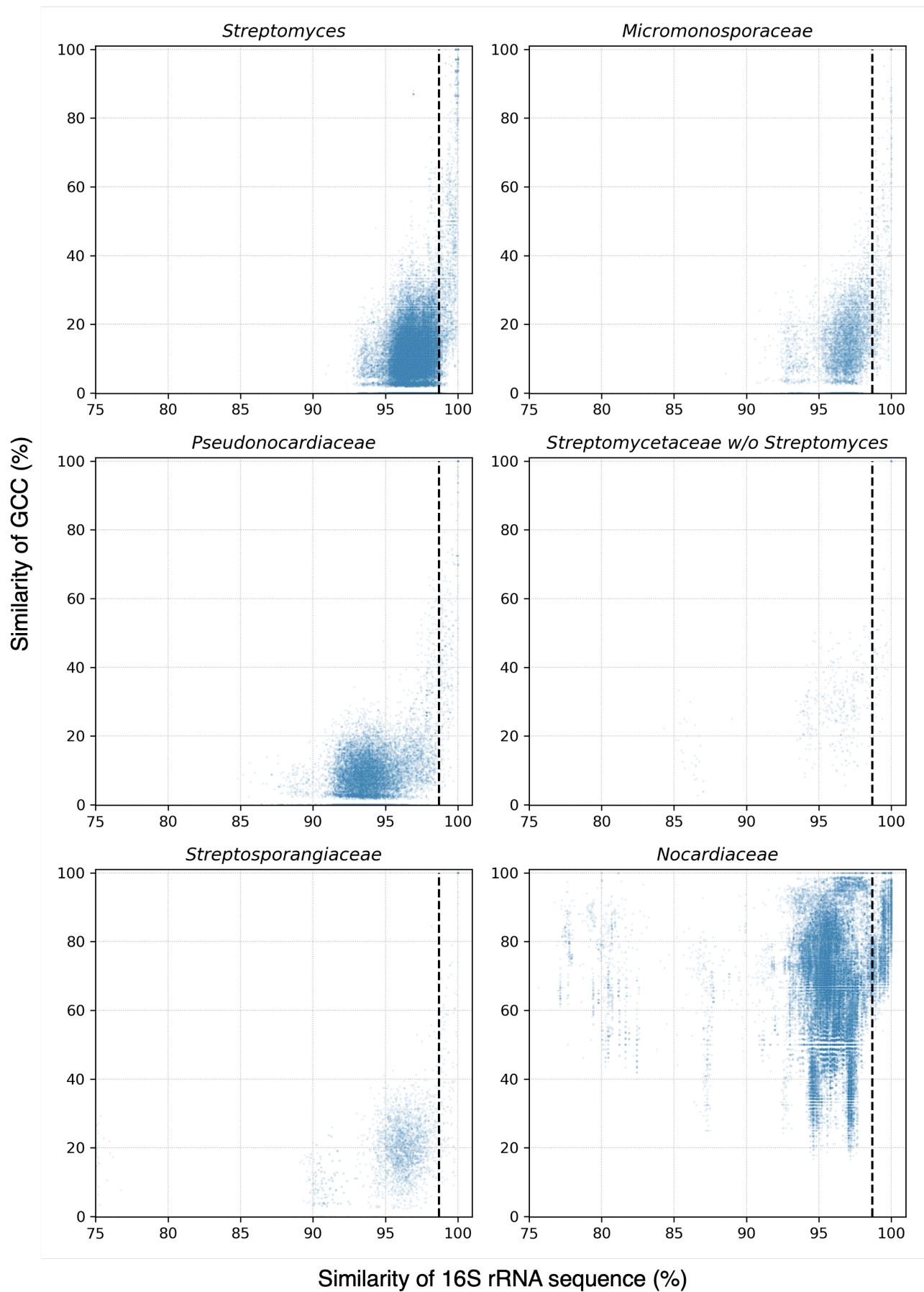
### Gene Cluster Family 2



### Gene Cluster Family 3 (= singleton)



**Fig. 2.3.** 遺伝子クラスターファミリー及び遺伝子クラスタークランの概要



**Fig. 2.4.** 菌株間における遺伝子クラスタークランの共通性と 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性  
破線は 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性が 98.7% となる位置を示している

## 2.2 *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌からの新規天然物探索

### 2.2.1 分子ネットワーク解析を用いた新規天然物の探索

前節にて実施した PNTR-BGC の解析により、*Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌は多くの PNTR-BGC を有し、それらの多様性が高いことが示された。従って、*Pseudonocardiaceae* 科は多様な二次代謝産物を豊富に生産することが期待される。そこで、分子ネットワーク解析を利用し、*Pseudonocardiaceae* 科 8 菌株が生産する代謝産物を網羅的に解析し、新規二次代謝産物を探索した。

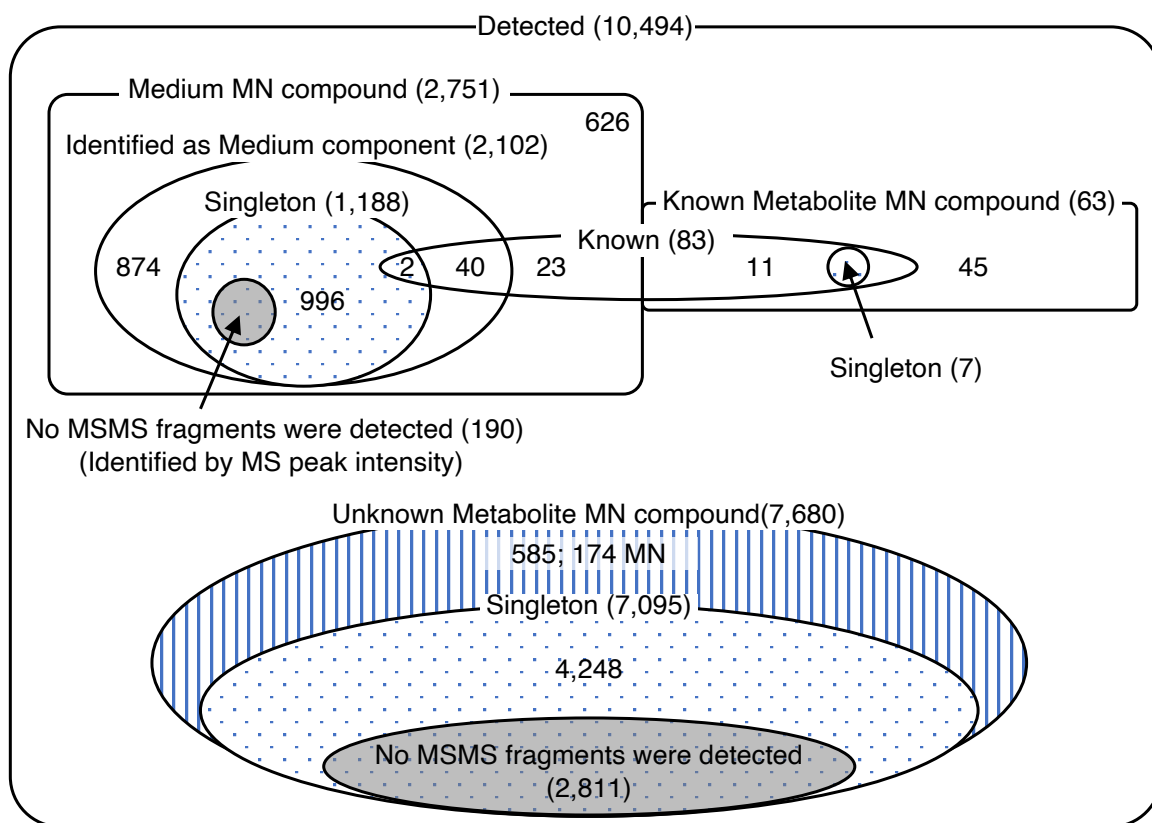
### 結果

#### *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌の培養液を用いた分子ネットワーク解析

*Saccharopolyspora* sp. KR21-0001、*Saccharothrix* sp. KR21-0069、*Saccharothrix* sp. OK19-0052、*Saccharopolyspora* sp. OK19-0061、*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223、*Lentzea* sp. OK19-0192 及び *Saccharopolyspora* sp. OK20-0167 及び *Saccharothrix* sp. OK19-0020 の培養液から調製した培養液サンプル、植菌していない培地から調製した培地コントロールサンプル及びブランクサンプル (MeOH) を LC-HRMS で分析した。得られた分析データを MS-DIAL で処理後、GNPS が提供する web アプリケーションである FBMN を用い、分子ネットワーク解析を実施した。

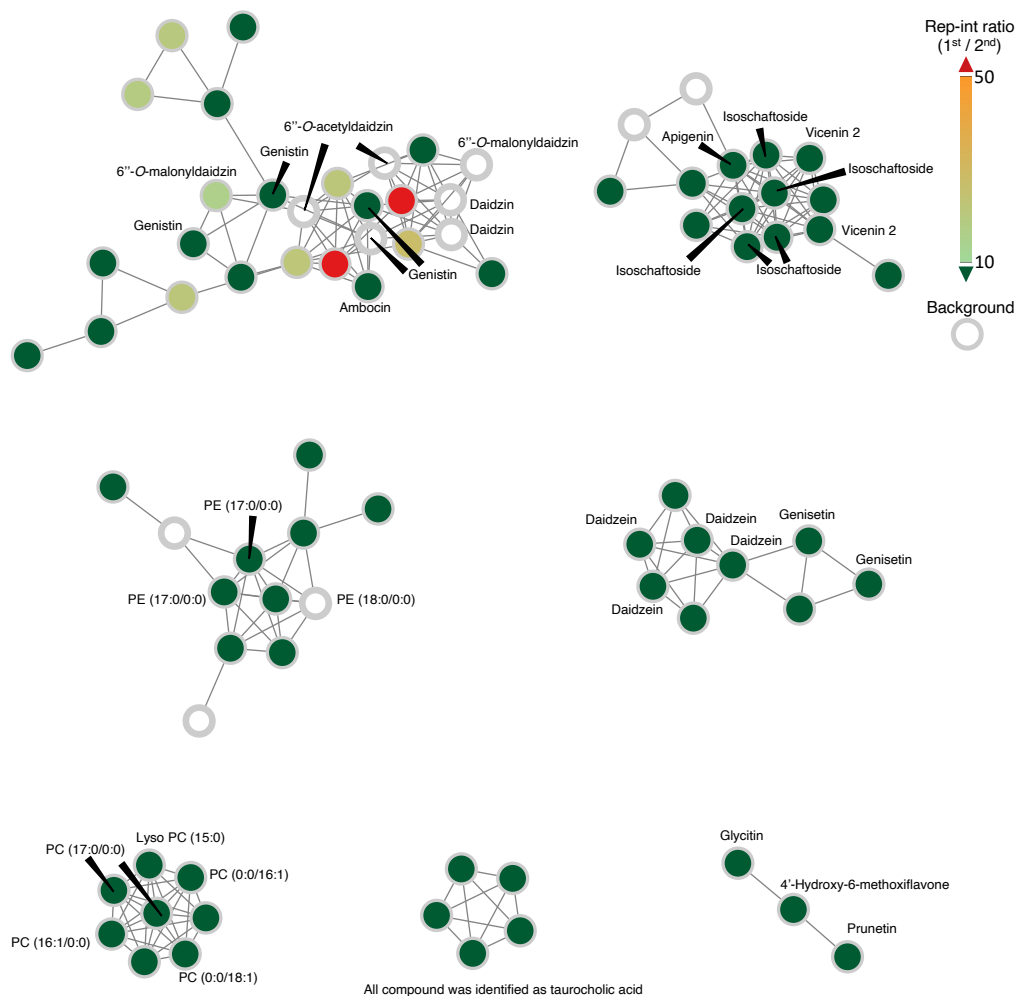
MS-DIAL を用いて LC-HRMS データを処理することで、全てのサンプルの分析データからは合計 10,494 化合物が検出され、2,102 化合物が培地成分に判別された (Fig. 2.5)。また、FBMN 解析を行った結果、10,494 化合物の内 2,204 化合物が合計 510 の分子ネットワーク (MN) を形成し、残る 8,290 化合物はシングルトンであった。このとき、MSMS スペクトルライブラリを用いた化合物の同定により、83 化合物がそれぞれ、フラボノイド (42 化合物)、脂質及びリン脂質類 (10 化合物)、胆汁酸類 (6 化合物) その他 (25 化合物) に同定された (Table S8)。フラボノイド類、リン脂質類及び胆汁酸類は、それぞれ MN を形成していたことから、類似する構造を持つ化合物は互いに MN を形成することが改めて示された (Fig. 2.6)。

次に、培地成分化合物の判別と既知化合物の同定結果及び分子ネットワーク形成の結果に基づき、検出された化合物を分類した (Fig. 2.5)。ここでは、培地成分化合物を 1 つ以上含む MN を培地成分 MN (medium MN; MMN)、MMN ではなく 1 つ以上の既知化合物を含む MN を既知代謝産物 MN (known metabolite MN; KMN)、いずれにも当てはまらない MN を未知代謝産物 MN (unknown metabolite MN; UMN) と定義した (これらの定義にはシングルトンも含めた)。MMN もしくは KMN に含まれる化合物は合計 2,814 化合物であり、それらとは異なる 7,680 化合物が UMN に含まれた。UMN に含まれる化合物の内、7,095 化合物はシングルトンであり、585 化合物が計 174 個の MN を形成していた。



**Fig. 2.5.** 検出された化合物の分類

数字は分類された化合物数を表し、()内の数字は領域の内側にある全ての化合物数を表している。Medium MN: 培地成分化合物を1つ以上含むMN、Known Metabolite MN: 培地成分化合物を含まず既知化合物を1つ以上含むMN、Unknown Metabolite MN: 培地成分化合物及び既知化合物を1つも含まないMN。これらのMNには singleton も分類した。一部の化合物はMSMS フラグメントイオンが検出されなかった。



**Fig. 2.6.** 既知化合物の分子ネットワーク

PE: phosphatidylethanolamine、PC: phosphatidylcoline。

Rep-int は、同一菌株の培養液サンプル間で一つの化合物についてイオン強度を比較した際に、その化合物においてその菌株が示した最も高いイオン強度の値を意味する。また、rep-int ratio は、各化合物について菌株間で rep-int を比較し、最も高い rep-int の値を 2 番目に高い rep-int の値で割った値を表す。各ノードは検出された化合物を表し、ノードの色は rep-ratio の値に対応している。ただし、白色のノードは、培地成分の分析結果から作成した培地成分スペクトルデータベースに基づいて培地成分に判別された化合物を表す。エッジ (ノードを繋げる線) は類似関係にある化合物を表す。

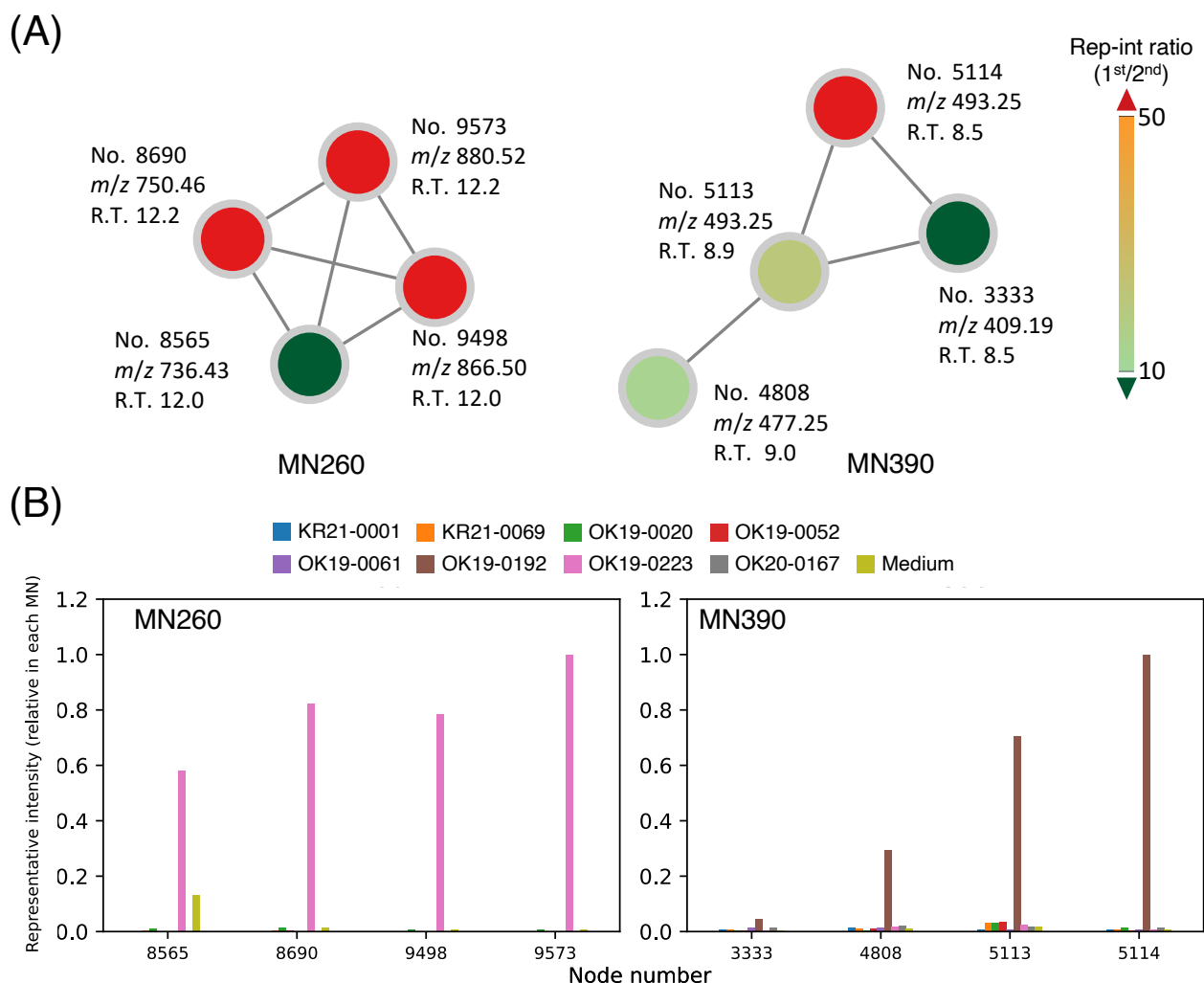
### 菌株に固有な分子ネットワークの探索

本節の冒頭で述べたとおり、*Pseudonocardiaceae* 科は多様な二次代謝産物を豊富に生産することが期待される。そこで、特定の菌株に固有な二次代謝産物の MN (菌株固有 MN) を UMN から探索することで、*Pseudonocardiaceae* 科が多様な二次代謝産物を生産するか調べた。

菌株固有 MN の探索では、化合物の生産量を比較するために、MS-DIAL によって検出された化合物の物質量の代わりにプリカーサーイオンの強度を比較した。また、各菌株はそれぞれ 20 種類の異なる培地で培養しており、株間で化合物の固有性を評価するためには 20 種類の培地における培養液のデータを 1 つに統合する必要があったため、一つの化合物について同一菌株の培養液サンプル間でイオン強度を比較し、最も高い値をその化合物においてその菌株が示した代表イオン強度 (rep-int) とした。さらに、ある化合物について最大の rep-int を示す菌株を代表生産株 (rep-strain) とした。

分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN を

絞り込んだ結果、シングルトンを除く 174 個の UMN から 114 個の UMN が絞り込まれた (Fig. S6–S12)。絞り込まれた UMN の内、Fig. 2.7 に示した MN260 では *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 が示す rep-int の値が他の株の rep-int よりも高い値を示した。同様に、MN390 では *Lentzea* sp. OK19-0192 が示す rep-int の値が他の株の rep-int よりも高かった (Fig. 2.7)。これら MN の様に、114 個の UMN には、rep-strain が示す rep-int が他の株の rep-int を大きく上回る化合物を含む UMN が複数見られた (Fig. S6–S12)。また、それら化合物は DNP に該当する化合物が無く、高い新規性が予想された。そこで、次にそれら化合物の単離を試みた。



**Fig. 2.7.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク

(A) 可視化した分子ネットワークを表す。Fig. 2.6 と同様に、各ノードが 1 つの化合物に対応し、ノードの色は rep-int ratio (最も高い rep-int の値を 2 番目に高い rep-int の値で割った値) を表す。

(B) 縦軸は各菌株における rep-int の相対値を表し、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 として算出した。

## 2.2.2 *Lentzea* sp. OK19-0192 が生産する化合物の単離

*Lentzea* sp. OK19-0192 が生産する、MN390 を構成する化合物 (node3333;  $m/z$  409.19、 node4808;  $m/z$  477.25、 node5113;  $m/z$  493.25、 node5114;  $m/z$  493.25) はいずれも新規性が高く、本菌株が固有に生産する二次代謝産物であることが期待された (Fig. 2.7)。そこで、それらの化合物の単離と構造解析を行った。

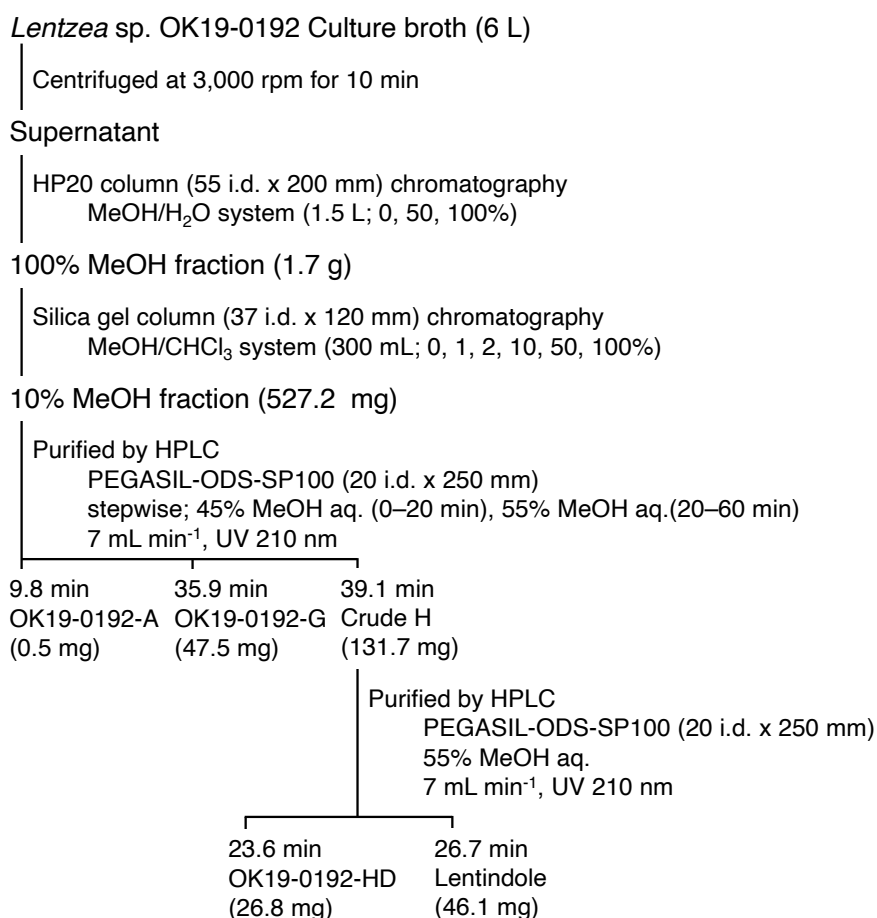
### 結果

#### *Lentzea* sp. OK19-0192 の培養

*Lentzea* sp. OK19-0192 の培養は、種培養と本培養の 2 段階培養で行った。*Lentzea* sp. OK19-0192 の種培養液を 8 培地 6 L (500 mL 容三角フラスコ 60 本) に 1% 植菌し、210 rpm、27°C で 6 日間振盪培養した。

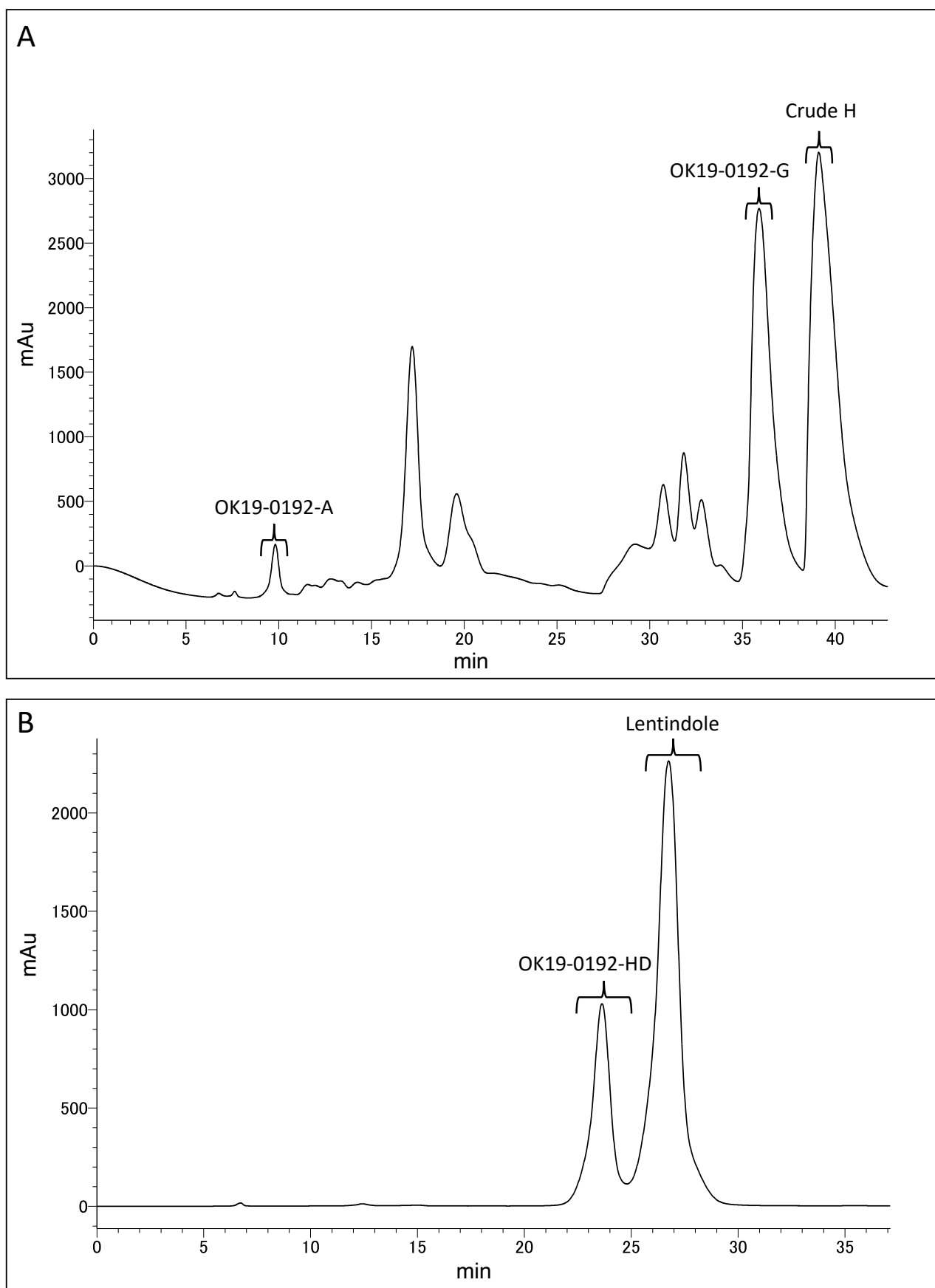
#### 化合物の単離

化合物の単離は Scheme 2.1 に従った。培養液 6 L の上清を、HP20 カラムクロマトグラフィー、シリカゲルカラムクロマトグラフィー及び HPLC による精製に供することで、OK19-0192-A (**5**) (0.5 mg) OK19-0192-G (**6**) (47.5 mg) 及び粗精製物 H (131.7 mg) を得た (Fig. 2.8)。続いて、粗精製物 H を再度 HPLC による精製に供することで OK19-0192-HD (**7**) (26.8 mg)、lentindole (**8**) (46.1 mg) を得た (Fig. 2.8)。得られた化合物を LC-HRMS で分析したところ、各化合物のベースピークは **5** では  $m/z$  477.25  $[M + H]^+$ 、**6** では  $m/z$  493.25  $[M + H]^+$ 、**7** では  $m/z$  493.25  $[M + H]^+$ 、**8** では  $m/z$  493.25  $[M + H]^+$  を示した。従って、それらの化合物は全て MN390 を構成する化合物 (**5**; node4808、**6**、**7**; node5113、**8**; node5114) であることが示された。



**Scheme 2.1.** *Lentzea* sp. OK19-0192 培養液からの化合物単離 Scheme





**Fig. 2.8.** *Lentzea* sp. OK19-0192 から化合物を単離した際の、シリカゲルカラムクロマトグラフィー 10% MeOH 画分の HPLC クロマトグラム (A) と粗精製物 H の HPLC クロマトグラム (B)  
(検出波長: 210 nm)

## 2.2.3 Lentindole (8) の構造解析

### 結果

#### 平面構造の決定

Lentindole (8) の物理化学的性状は Table S9 にまとめた。MS スペクトル ( $m/z$  493.2468  $[M + H]^+$ ) より、8 の分子式を  $C_{24}H_{36}N_4O_5S$  (不飽和度 9) に決定した。 $^1H$ 、 $^{13}C$  NMR スペクトル及び HSQC スペクトルより、8 が有する全 24 炭素は、オキシメチレン炭素 (C-10;  $\delta_C$  63.72)、4 級炭素 (C-3;  $\delta_C$  75.78)、2 つのヘテロ原子に結合したメチン炭素 (C-2;  $\delta_C$  93.8)、3 つのカルボニル炭素 (C-12;  $\delta_C$  171.76、C-16;  $\delta_C$  170.96、C-22;  $\delta_C$  171.85)、窒素原子に結合したメチン炭素 (C-9;  $\delta_C$  43.00)、2 つのアミノ酸  $\alpha$  位炭素 (C-13;  $\delta_C$  48.07、C-17;  $\delta_C$  51.70)、4 つのメタン炭素 (C-14;  $\delta_C$  18.30、C-20;  $\delta_C$  14.63、C-25;  $\delta_C$  22.32、C-26;  $\delta_C$  22.27)、4 つの  $sp^3$  メチレン炭素 (C-8;  $\delta_C$  35.90、C-18;  $\delta_C$  31.59、C-19;  $\delta_C$  29.59、C-23;  $\delta_C$  44.41)、2 つの芳香族 4 級炭素 (C-3a;  $\delta_C$  130.88、C-7a;  $\delta_C$  150.75)、4 つの芳香族メチン炭素 (C-4;  $\delta_C$  122.98、C-5;  $\delta_C$  117.52、C-6;  $\delta_C$  129.12、C-7;  $\delta_C$  109.02) に帰属された (Fig. S27、Fig. S28、Fig. S29)。次に、 $^1H$  NMR と HMBC スペクトルより、いずれの炭素にも結合しない 5 つの水素 (H-1;  $\delta_H$  6.43、H-3b;  $\delta_H$  5.33、H-11;  $\delta_H$  7.89、H-15;  $\delta_H$  7.93、H-21;  $\delta_H$  8.00) がヘテロ原子に結合することがわかった (Fig. S27、Fig. S30)。さらに、 $^1H$  NMR と  $^1H$ - $^1H$  COSY 相関より、H-1/H-2 のスピン系及び *o* カップリングの結合定数を伴う H-4 ( $\delta_H$  7.17)/H-5 ( $\delta_H$  6.65)/H-6 ( $\delta_H$  7.06)/H-7 ( $\delta_H$  6.58) のスピン系が観測された (Fig. S27、Fig. S31)。また、H-4 から C-3 と C-7a、H-5 から C-3a、H-1 から C-3 と C-3a、H-2 から C-3 と C-7a、H-7 から C-5 と C-3a、及び H-3b から C-2、C-3 と C-3a に HMBC 相関が観測された (Fig. S30)。これらの結果より、H-3b がヒドロキシ基水素であり、8 が 3-hydroxyindoline を有することが明らかになった。加えて、二つのスピン系 H<sub>2</sub>-8 ( $\delta_H$  1.87、2.38)/H-9 ( $\delta_H$  3.36)/H<sub>2</sub>-10 ( $\delta_H$  3.03 と 3.51) 及び H-9/H-11 が  $^1H$ - $^1H$  COSY により観測され、H-2 から C-10、H<sub>2</sub>-10 から C-2 及び H<sub>2</sub>-8 から C-3 と C-3a に HMBC 相関が観測されたことから、8 は 3-hydroxyindoline 構造と tetrahydropyran 構造が縮環した tetrahydropyranoindole 構造を有することがわかった (Fig. S30、Fig. S31)。次に、 $^1H$ - $^1H$  COSY によって H-15/H-13 ( $\delta_H$  4.18)/H<sub>3</sub>-14 ( $\delta_H$  1.16) のスピン系が観測され、H<sub>3</sub>-14 から C-12 及び H-15 から C-13 と C-14 に HMBC 相関が観測されたことから、8 は alanine 構造を有することが示唆された (Fig. S30、Fig. S31)。同様に、 $^1H$ - $^1H$  COSY によって H<sub>3</sub>-26 ( $\delta_H$  0.86)/H-24 ( $\delta_H$  2.02)/H<sub>3</sub>-25 ( $\delta_H$  0.86) のスピン系が観測され、H<sub>3</sub>-25 から C-23、H<sub>3</sub>-26 から C-23 及び H-23 と H-24 から C-22 に HMBC 相関が観測されたことで、8 は isovaleric acid 構造を有することが示された (Fig. S30、Fig. S31)。H-17 ( $\delta_H$  4.30)/H<sub>2</sub>-18 ( $\delta_H$  1.87、1.75)/H<sub>2</sub>-19 のスピン系が  $^1H$ - $^1H$  COSY によって観測され、H<sub>3</sub>-20 ( $\delta_H$  2.02) から C-19、H-17 から C-16 及び H-21 から C-17 と C-18 に観測された HMBC 相関ならびに残った分子式  $C_5H_{11}NOS$  と不飽和度より、8 は methionine 構造を有することがわかった (Fig. S30、Fig. S31)。最後に、H-11 から C-12、H-15 から C-16 及び H-21 から C-22 に HMBC 相関が観測されたことにより、isovaleric acid、methionine、alanine、tetrahydropyranoindole の 4 つの部分構造がこの順にアミド結合を形成していることが明らかになった (Fig. S30)。従って、8 の構造を *N*-(1-((4a-hydroxy-2,3,4,4a,9,9a-hexahydropyrano[2,3-*b*]indol-3-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)-2-(3-methylbutanamido)-4-(methylthio)butanamide に決定し、新規物質として lentindole と命名した (Fig. 2.9)。

次に、アミノ酸の絶対立体配置を決定するために、改良マーフィー法によるアミノ酸分析を行った。lentindole (8) の加水分解産物を D-FDLA で誘導化し、LC-HRMS で分析した結果、それぞれのイオンクロマトグラムには、L-alanine 及び L-methionine の誘導体と保持時間及び質量電荷比が一致するピークが見られた (Fig. 2.10)。一方、D-alanine 及び D-methionine の D-FDLA 誘導化体と保持時間及び質量電荷比が一致するピークは見られなかった (Fig. 2.10)。以上の結果より、8 の構造中に含まれている alanine と methionine はいずれも L 体であると決定した。

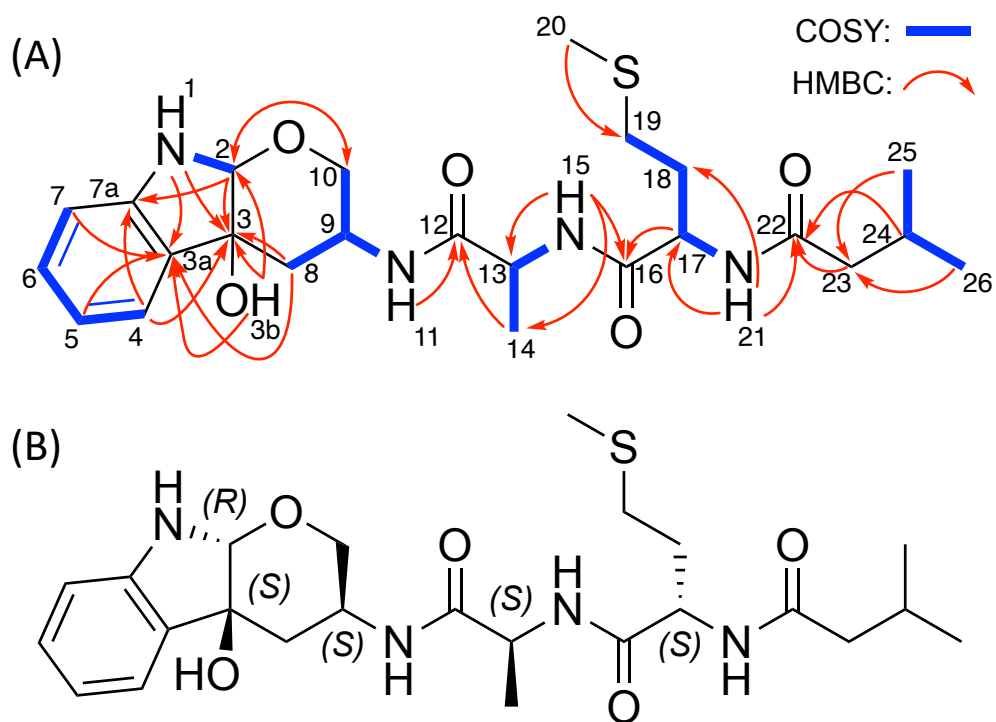
続いて、残る 3 箇所の絶対立体配置を決定するために、MicroED を用いて **8** の結晶構造を解析した。その結果、**8** の ORTEP 図が明らかになり、相対立体配置は  $2R^*$ 、 $3S^*$ 、 $9S^*$ 、 $13S^*$ 、 $17S^*$  に決定された (Fig. 2.11、Table 2.3)。改良マーフィー法によるアミノ酸分析にて決定した alanine 及び methionine の絶対立体配置 (L-alanine 及び L-methionine) と合わせ、**8** の絶対立体配置を  $2R$ 、 $3S$ 、 $9S$ 、 $13S$ 、 $17S$  に決定した (Fig. 2.9)。

**Table 2.2.** Lentindole (**8**) の NMR データ

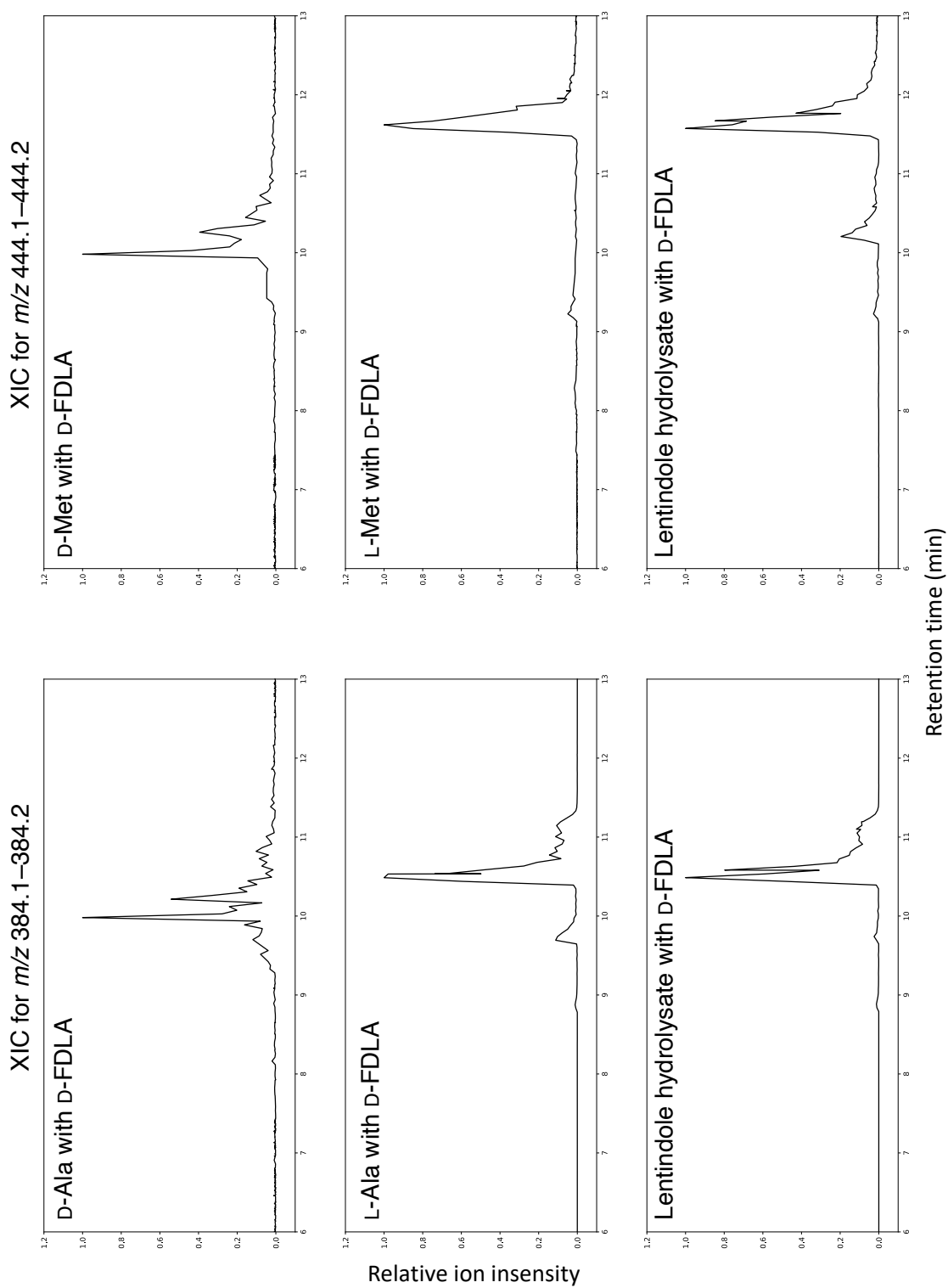
Position	$\delta_C(\text{ppm})^b$	type	$\delta_H(\text{ppm})$ (int., mult., $J$ Hz) <sup>b</sup>
1	-	NH	6.43 (1H, s)
2	93.80	CH	4.68 (1H, d, 1.15)
3	75.79	C	-
3a	130.89	C	-
3b	-	OH	5.33 (1H, s)
4	122.99	CH	7.17 (1H, dd, 7.30)
5	117.53	CH	6.65 (1H, ddd, 1.15, 7.45, 7.45)
6	129.13	CH	7.06 (1H, ddd, 1.15, 7.73, 7.73)
7	109.04	CH	6.58 (1H, d, 8.05)
7a	150.76	C	-
8	35.92	CH <sub>2</sub>	2.38 (1H, m), 1.87 (1H, m)
9	43.00	CH	3.36 (1H, m)
10	63.74	CH <sub>2</sub>	3.51 (1H, dd, 4.00, 10.85), 3.03 (1H, dd, 8.30, 10.88)
11	-	NH	7.89 (1H, d, 8.00)
12	171.76	C	-
13	48.10	CH	4.18 (1H, m)
14	18.30	CH <sub>3</sub>	1.16 (3H, d, 6.85)
15	-	NH	7.93 (1H, d, 7.45)
16	170.96	C	-
17	51.72	CH	4.30 (1H, m)
18	31.60	CH <sub>2</sub>	1.87 (1H, m), 1.75 (1H, m)
19	29.61	CH <sub>2</sub>	2.43 (2H, m)
20	14.63	CH <sub>3</sub>	2.02 (3H, s)
21	-	NH	8.00 (1H, d, 8.00)
22	171.85	C	-
23	44.43	CH <sub>2</sub>	2.01 (2H, m)
24	25.59	CH	2.02 (1H, m)
25	22.32	CH <sub>3</sub>	0.86 (6H, dd, 3,40, 6.30) <sup>a</sup>
26	22.27	CH <sub>3</sub>	0.86 (6H, dd, 3,40, 6.30) <sup>a</sup>

<sup>a</sup> オーバーラップ。

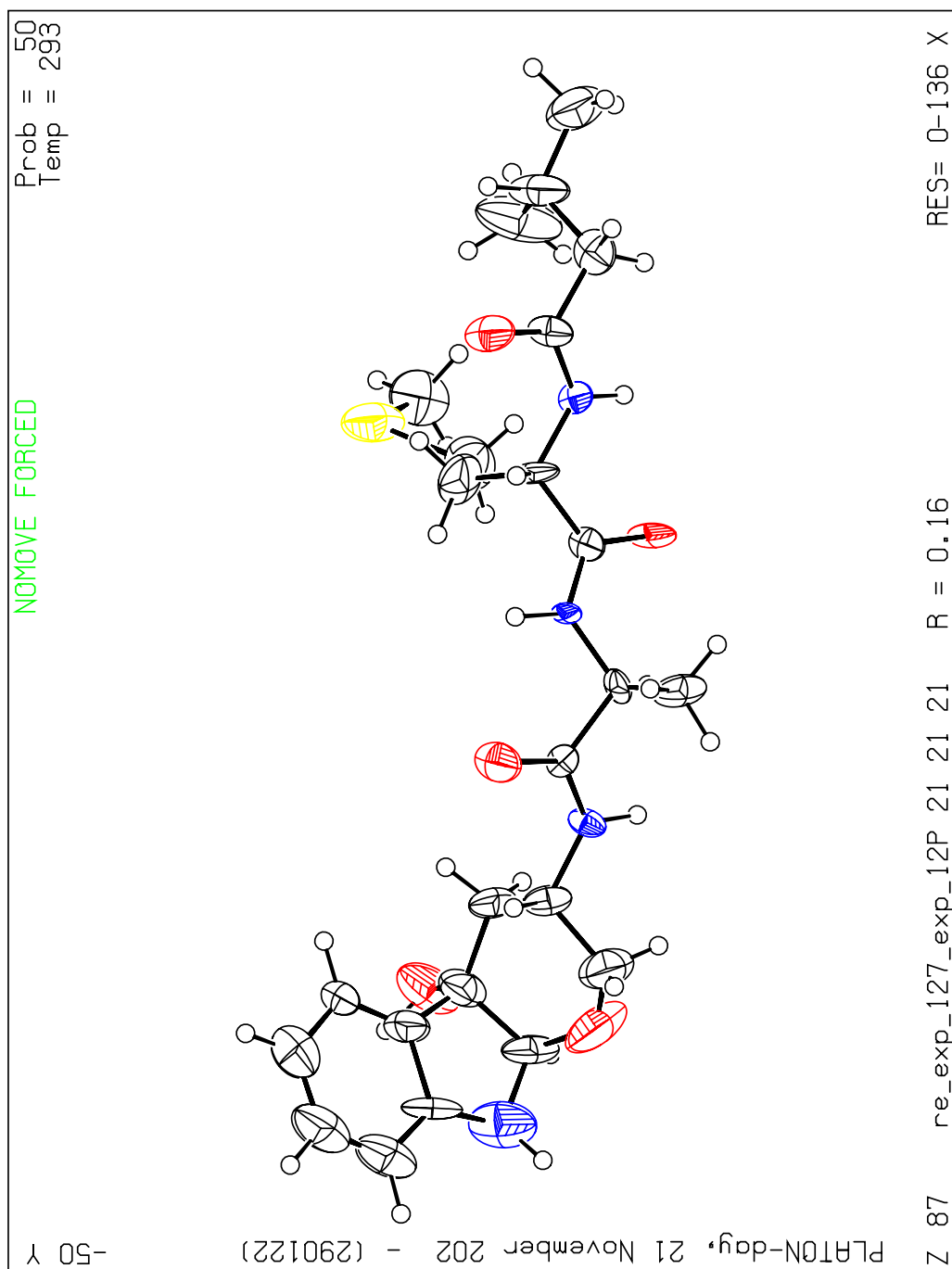
<sup>b</sup> DMSO-*d*<sub>6</sub> 中で測定した。



**Fig. 2.9.** Lentindole (**8**) の二次元 NMR 解析 (A) 及び決定された絶対立体配置 (B)



**Fig. 2.10.** D-FDLA 修飾サンプルの抽出イオンクロマトグラム (XIC)



**Fig. 2.11.** Lentindole (8) の ORTEP 図

**Table 2.3.** MicroED 測定によって得られた lentindole (**8**) の結晶学的データ

Parameter	Value
Empirical formula	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S
Formula weight	492.64
Crystal system	orthorhombic
Space group	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
a (Å)	9.50(19)
b (Å)	11.68(16)
c (Å)	24.7(4)
$\alpha$ (°)	90
$\beta$ (°)	90
$\gamma$ (°)	90
Volume (Å <sup>3</sup> )	2742(82)
Z	4
$D_{\text{calc}}$ g/cm <sup>3</sup>	1.193
F(000)	399
Crystal size (mm <sup>3</sup> )	0.002 × 0.001 × 0.0003
Radiation	transmission electron microscope ( $\lambda$ = 0.0251)
2 $\theta$ range for data collection (°)	0.214 to 1.718
Index ranges	-11 ≤ h ≤ 11, -13 ≤ k ≤ 13, -29 ≤ l ≤ 29
Reflections collected	21569
Independent reflections	4738 [ $R_{\text{int}}$ = 0.1999, $R_{\text{sigma}}$ = 0.1248]
Data/restraints/parameters	4738/187/313
Goodness-of-fit on F <sup>2</sup>	1.791
Final R indexes [ $I \geq 2\sigma(I)$ ]	$R_1$ = 0.1631, $wR_2$ = 0.3593
Final R indexes [all data]	$R_1$ = 0.2247, $wR_2$ = 0.3808
Largest diff. peak/hole (e Å <sup>-3</sup> )	0.17/-0.14

### MicroED のみを用いた Lentindole (**8**) の絶対立体配置決定の検証

MicroED は、微小な結晶から化合物の構造を決定できる手法であり、その解析のみで絶対立体配置を決定可能である [92,93]。そこで、**8** について MicroED による絶対立体配置の確認を行った。

化合物 **8** の同一の結晶データから導かれた 2 つの相対立体配置 (**8** 及び *ent*-**8**) の構造を用いて  $R_1$  及び  $wR_2$  を算出したところ、**8** を用いた時に得られた  $R_1$  (14.66) と  $wR_2$  (14.28) が、*ent*-**8** を用いた時に得られた値  $R_1$  (17.80) と  $wR_2$  (17.10) を下回った (Fig. 2.12、Table 2.4)。さらに、 $z$ -score は  $5.5\sigma$  であった。

従って、それらのパラメーターからも本化合物の絶対立体配置が  $2R$ 、 $3S$ 、 $9S$ 、 $13S$ 、 $17S$  であることが裏付けられた [93–95]。



**Fig. 2.12.** MicroED によって導出された **8** の構造とその鏡像異性体 *ent*-**8** の構造

**Table 2.4.** 動的精密化の結果から算出された統計的パラメーター

Parameter	Lentindole ( <b>8</b> )	<i>ent</i> - <b>8</b>
$R_1$	14.66	17.8
$wR_2$	14.28	17.1
$z$ -score	$5.5\sigma$	



## 2.2.4 *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 が生産する化合物の単離

*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 が生産する、MN260 を構成する化合物 (node8565;  $m/z$  736.43、node8690; 750.46、node9498; 866.50、node9573; 880.52) はいずれも本菌株が固有に生産する新規二次代謝産物であることが期待された (Fig. 2.7)。そこで、これらの化合物の単離と構造解析を行った。

### 結果

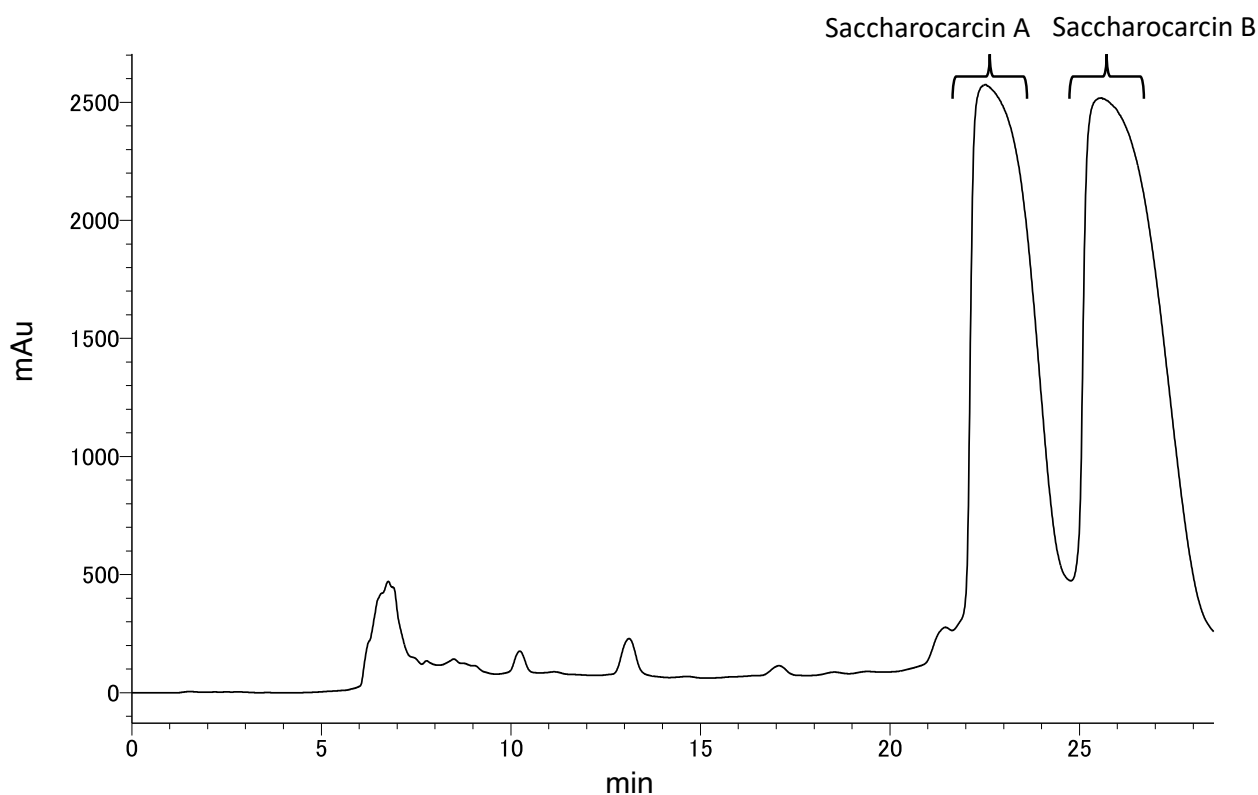
#### *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の培養

*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の培養は、種培養と本培養の 2 段階培養で行った。*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の種培養液を 66 培地 5 L (6 L 容ジャーファーマンター) に 2% 植菌し、攪拌及び通気の状態を変動させながら 15 日間培養した。

#### 化合物の単離

単離精製の Scheme を Scheme 2.2 に示した。培養液 5L から得た残渣からアセトンを用いて化合物を抽出した後、アセトンを減圧留去した。残留物に水を加えてメスアップしたのち、EtOAc 抽出し、EtOAc 層を得た。Scheme 2.2 に示したように、EtOAc 層をシリカゲルカラムクロマトグラフィーと HPLC による精製に供し、saccharocarcin A (**9**) (94.7 mg) と saccharocarcin B (**10**) (118.6 mg) をそれぞれ得た (Fig. 2.13)

得られた化合物を LC-HRMS で分析したところ、各化合物のベースピークは  $m/z$  866.50  $[M + H]^+$  (**9**)、 $m/z$  880.52  $[M + H]^+$  (**10**) を示した。従って、これらの化合物は MN260 に含まれる化合物 (Node No. 9498;  $m/z$  866.50、Node No. 9573;  $m/z$  880.52) であることが示された (Fig. 2.7)。



**Fig. 2.13.** *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 から化合物を単離した際の、シリカゲルカラムクロマトグラフィー 10% MeOH 画分の HPLC クロマトグラム (検出: 210 nm)

*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 Culture broth (5 L)

Filtered

Wet residue

Extracted with acetone  
Filtered

Acetone extraction

Removed acetone *in vacuo*  
Extracted with EtOAc

EtOAc layer

Silica gel column (24 i.d. x 120 mm) chromatography  
MeOH/CHCl<sub>3</sub> system (120 mL; 0, 1, 2, 10, 50, 100%)

10% MeOH fraction (317.9 mg)

Purified by HPLC  
PEGASIL-ODS-SP100 (20 i.d. x 250 mm)  
gradient; 90–100% MeOH aq. + 0.1% formic acid, 50min  
7 mL min<sup>-1</sup>, UV 210 nm

24 min

Saccharocarcin A  
(94.7 mg)

27 min

Saccharocarcin B  
(118.6 mg)

**Scheme 2.2.** *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 からの化合物の単離スキーム

## 2.2.5 Saccharocarcin A (9) 及び saccharocarcin B (10) の同定

### 結果

HR-MS を用いた高分解能質量分析の結果、**9** ではプリカーサーイオンとして  $m/z$  1262.6940  $[M + Na]^+$  が確認されたため、本化合物の分子式を  $C_{67}H_{101}NO_{20}$  (不飽和度 18) と決定した。また、本化合物の  $^{13}C$  NMR スペクトル及び比旋光度が saccharocarcin A (**9**) の  $^{13}C$  NMR スペクトル及び比旋光度と良い一致を示した (Table 2.5)。以上の結果より、本化合物を saccharocarcin A (**9**) に同定した (Fig. 2.14, Table 2.5) [96, 97]。

HR-MS を用いた高分解能質量分析の結果、**10** ではプリカーサーイオンとして  $m/z$  1276.7051  $[M + Na]^+$  が確認されたため、本化合物の分子式を  $C_{68}H_{104}NO_{20}$  (不飽和度 18) と決定した。また、本化合物の  $^{13}C$  NMR スペクトル及び比旋光度が saccharocarcin B (**10**) の  $^{13}C$  NMR スペクトル及び比旋光度と良い一致を示した (Table 2.5)。以上の結果より、本化合物を saccharocarcin B (**10**) に同定した (Fig. 2.14, Table 2.5) [96, 97]。

Table 2.5. 9、10 及び saccharocarcin 類の  $^{13}C$  NMR スペクトルデータ

Position	$\delta_C$ (ppm)			
	Saccharocarcin A <sup>a</sup>	<b>9</b>	Saccharocarcin B <sup>a</sup>	<b>10</b>
C-1	167.2	167.2	167.2	167.2
C-2	101.7	101.7	101.7	101.6
C-3	206.2	206.2	206.2	206.1
C-4	50.8	50.8	50.8	50.7
C-5	31.3	31.3	31.3	32.6
C-6	27.7	27.6	27.7	27.4
C-7	41.7	41.8	41.8	41.7
C-8	34.5	34.5	34.5	34.4
C-9	84.3	84.3	84.3	84.2
C-10	38.3	38.4	38.5	38.3
C-11	125.8	125.8	125.8	125.8
C-12	126.8	126.8	126.8	126.6
C-13	53.5	53.5	53.5	53.4
C-14	134.4	134.4	134.4	134.2
C-15	130	130.1	130.1	130.1
C-16	35	35	32.9	34.1
C-17	83.4	83.5	83.4	83.4
C-18	138.4	138.5	138.4	138.5
C-19	125.7	125.8	125.7	125.7
C-20	43.3	43.3	43.3	43.2
C-21	118.9	118.9	118.9	118.8
C-22	130.9	130.8	131.1	130.8
C-23	39.6	39.6	39.6	39.5
C-24	34.3	34.3	34.3	34.2
C-25	82.9	82.9	82.9	82.8
C-26	202.1	202.2	202.2	202
C-27	18.9	19	19	18.4
C-28	22.3	22.3	22.3	22.2
C-29	14.2	14.3	14.3	14.2
C-30	15.3	15.3	17.9	17.8
C-31	15.2	15.2	15.3	15.2
C-32	13.1	13.1	13.1	13
C-33	28.8	28.8	38.1	38
C-34	12.7	12.7	21.1	21
C-35	-	-	14.1	14
C-1A	98.1	98.1	98.1	98.2
C-2A	29.8	29.8	29.8	29.7

<sup>a</sup> Hedge らによって報告されたデータ (重溶媒:  $CDCl_3$ ) に基づく [97]。

<sup>b</sup>  $CDCl_3$  中で測定した

Table 2.5. 9、10 及び saccharocarcin 類の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータ (続き)

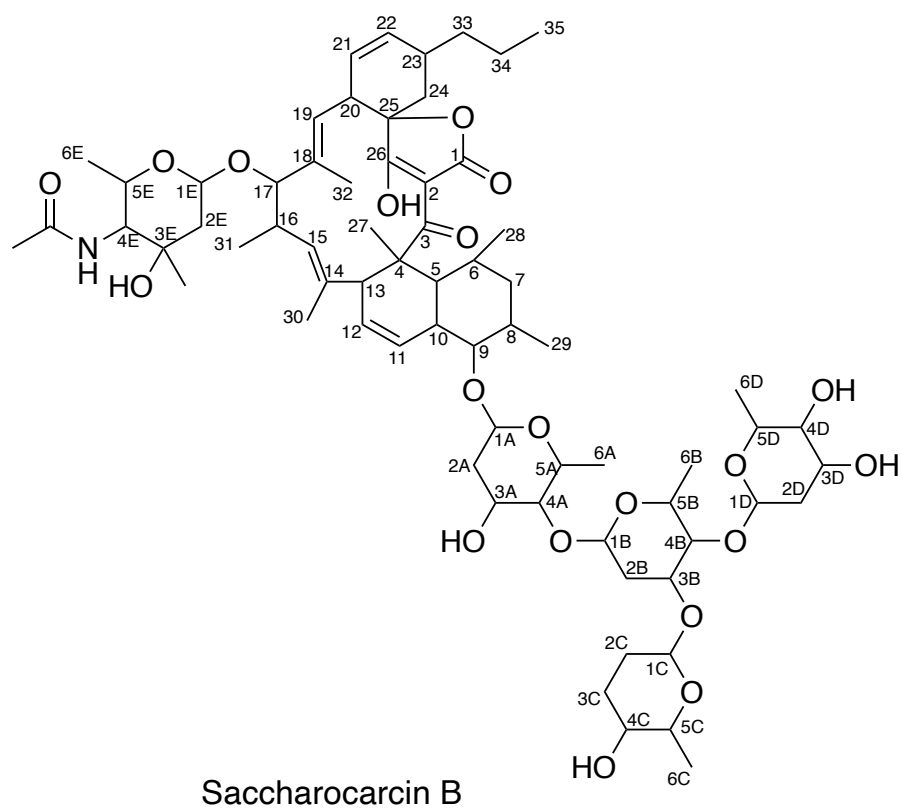
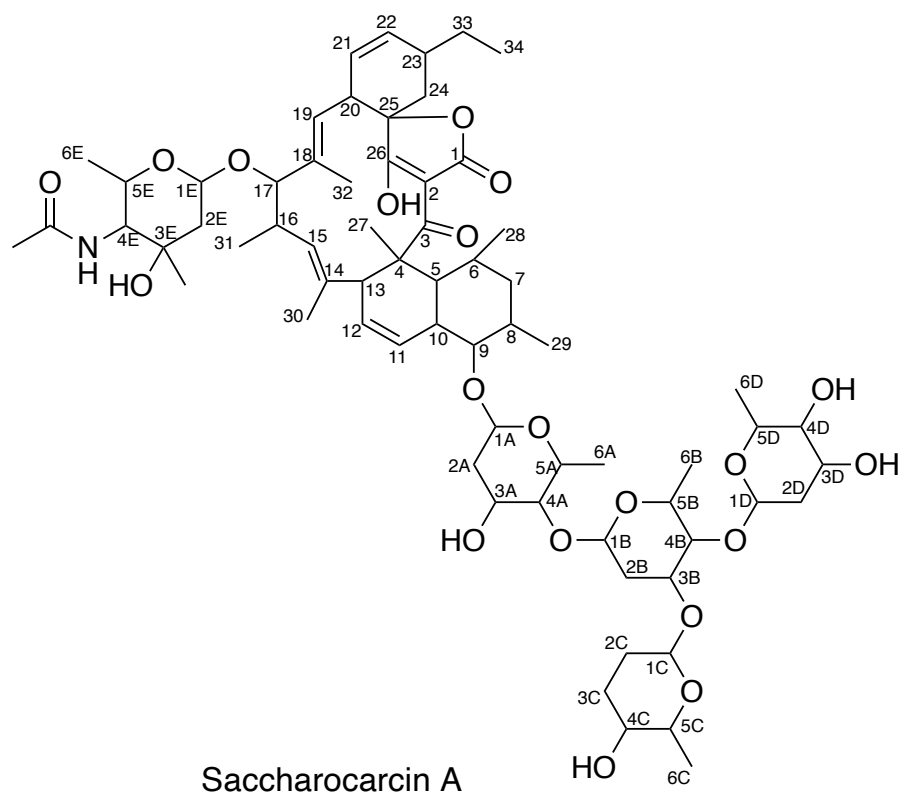
Position	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)			
	Saccharocarcin A <sup>a</sup>	<b>9</b> <sup>b</sup>	Saccharocarcin B <sup>a</sup>	<b>10</b> <sup>b</sup>
C-3A	66.5	66.6	66.5	66.5
C-4A	82.3	82.3	82.3	82.1
C-5A	65.1	65.1	65.1	65
C-6A	17.8	17.9	18.5	18.3
C-1B	91	91.1	91	91
C-2B	36.9	37	36.9	37
C-3B	70.4	70.5	70.4	70.4
C-4B	75.2	75.1	75.2	74.9
C-5B	68.1	68.2	68.1	68.1
C-6B	18.1	18.1	18.1	17.9
C-1C	92	92.1	92	91.9
C-2C	27.4	27.4	27.4	27.3
C-3C	30	30.1	30.1	31.2
C-4C	71.9	72	72	72.2
C-5C	63.9	63.8	63.9	63.5
C-6C	17.8	17.9	18.3	18
C-1D	98.4	98.4	98.4	98.4
C-2D	40.3	40.2	40.3	40.2
C-3D	65.5	65.5	65.5	65.4
C-4D	71.7	71.6	71.7	71.8
C-5D	62.1	62.1	62.1	62.1
C-6D	18.5	18.4	19	18.9
C-1E	97.9	98.1	97.9	98
C-2E	32.3	32.4	32.3	32.7
C-3E	72.7	72.6	72.7	72.7
C-4E	55.5	55.5	55.5	55.4
C-5E	67.7	67.8	67.7	67.7
C-6E	17.1	17.2	17.1	17.1
3E-CH <sub>3</sub>	34.1	34.2	34.1	34.2
4E-COCH <sub>3</sub>	170.4	170.5	170.4	170.4
4E-COCH <sub>3</sub>	23.4	23.5	23.4	23.3

<sup>a</sup> Hedge らによって報告されたデータ (重溶媒:CDCl<sub>3</sub>) に基づく [97]。<sup>b</sup> CDCl<sub>3</sub> 中で測定した

Table 2.6. 9、10、及び saccharocarcin 類の比旋光度

Saccharocarcin A <sup>a</sup>	<b>9</b>	Saccharocarcin B <sup>a</sup>	<b>10</b>
$[\alpha]_{\text{D}}^{23} -172.8^{\circ}$	$[\alpha]_{\text{D}}^{22} -105.2^{\circ}$ (MeOH)	$[\alpha]_{\text{D}}^{22} -162.2^{\circ}$ (MeOH)	$[\alpha]_{\text{D}}^{22} -90.04^{\circ}$ (MeOH)

<sup>a</sup> Hedge らによって報告されたデータに基づく [97]。



**Fig. 2.14.** Saccharocarcin A (9) 及び saccharocarcin B (10) の構造

## 2.3 小括及び考察

### 2.3.1 二次代謝産物生合成遺伝子クラスターに基づく希少放線菌属の天然物生産能力の比較

第 2.1 節では、*Actinomycetota* 門細菌のゲノムから二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (sBGC) を解析し、sBGC の数と種類に基づいて天然物生産能力に優れた希少放線菌を探索した。*Actinomycetota* 門細菌の 6,781 ゲノム (scaffold:4,148、complete:2,663、325 属) を antiSMASH にて解析し、見出された sBGC の内、ポリケチド、非リボソームペプチド、テルペン及びリボソーム翻訳後修飾ペプチドの生合成に関与する BGC (PNTR-BGC) の数を属ごとに集計した。その結果、*Crossiella* 属等の一部の希少放線菌や *Streptomyces* 属といった限られた属が多くの PNTR-BGC を有し、それらの属と比較すると他の殆どの属はあまり PNTR-BGC を有していない (2.0–11.7) ことがわかった (Fig. 2.1、Table 2.1、Table S6)。また、*Streptomyces* 属よりも多くの PNTR-BGC (>23.3) を持つ希少放線菌属が 35 属見出され、それらは、*Actinospicaceae* 科 (1 属)、*Frankiaceae* 科 (1 属)、*Micromonosporaceae* 科 (2 属)、*Nocardiaceae* 科 (1 属)、*Pseudonocardiaceae* 科 (16 属)、*Streptomycetaceae* 科 (3 属)、*Streptosporangiaceae* 科 (10 属) 及び *Thermomonosporaceae* 科 (1 属) (計 8 科) のいずれかに属することが明らかになった (Fig. 2.2、Table 2.1、Table S6)。比較的多くの天然物 (906 化合物) が発見されている *Micromonosporaceae* 科では解析した 19 属中 2 属のみが *Streptomyces* 属よりも多くの PNTR-BGC を有しており、科における PNTR-BGC の平均数 (各属の PNTR-BGC 数を合計し属数で割った値) は 18.5 であった。一方、前述の 8 科の内、*Pseudonocardiaceae* 科では解析した 29 属中 16 属が、*Streptomycetaceae* 科では解析した 6 属中 3 属が、*Streptosporangiaceae* 科では解析した 15 属中 10 属が *Streptomyces* 属よりも多くの PNTR-BGC を有していた。また、これら科における PNTR-BGC の平均数はそれぞれ *Pseudonocardia* 科では 23.7、*Streptosporangiaceae* 科では 23.9、*Streptomycetaceae* 科希少放線菌では 25.0 と高かった。興味深いことに、これら 3 科からの天然物取得例は *Micromonosporaceae* 科 (906 化合物) よりも少なく、*Pseudonocardia* 科では 797 化合物、*Streptosporangiaceae* では 226 化合物、*Streptomycetaceae* 科希少放線菌では 316 化合物のみであった。これらの結果から、*Pseudonocardia* 科、*Streptosporangiaceae* 科及び *Streptomycetaceae* 科の希少放線菌は、特に天然物生産能に優れることが期待される。

続いて、*Pseudonocardia* 科、*Streptosporangiaceae* 科、*Streptomycetaceae* 科希少放線菌、*Micromonosporaceae* 科、*Nocardiaceae* 科及び *Streptomyces* 属における PNTR-BGC の多様性を調べた。本研究では、BiG-SCAPE [90] を用いて類似する PNTR-BGC を遺伝子クラスタークラン (GCC) に分類し、菌株間で一致する GCC の割合と 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性を解析した。その結果、異種間における GCC の一致率が *Streptomyces* 属と同程度 (0% または 10–20%) となった科は *Pseudonocardia* 科、*Streptosporangiaceae* 科及び *Micromonosporaceae* 科であった (Fig. 2.4)。*Streptomycetaceae* 科では、それらよりわずかに高い GCC の一致率 (20–40%) を示した。これらの結果から *Pseudonocardia* 科、*Streptosporangiaceae* 科、*Streptomycetaceae* 科及び *Micromonosporaceae* 科における PNTR-BGC の多様性は高いと言え、それらに属する希少放線菌から得られる二次代謝産物は構造的に多様であると期待できる。

菌株間で一致する GCC の割合と 16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性を解析した際、Fig. 2.4 に示した結果では、16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の相同性が 80–90% 程となる菌株の組み合わせが存在した。*Actinomycetota* 門において、2 株が属や科以上に異なることを示すための 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の相同性閾値は明らかではない。しかし、*Micromonosporaceae* 科、*Nocardiaceae* 科、*Pseudonocardiaceae* 科、*Streptomycetaceae* 科及び *Streptosporangiaceae* 科の基準株同士が示す 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の相同性は 92% 以下を示した。 (Table S7)。従って、2 株間における 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の相同

性が 80–90% 程の低い値を示した場合、それら 2 株は同じ科に属する株では無い可能性が高い。このような結果を与えることになった原因としては、解析に用いたゲノムデータにおいて、遺伝子のアノテーションに間違いがあり異なる遺伝子が 16S rRNA 遺伝子として登録されている、シーケンス時にコンタミネーションが起きたことで異なる生物の塩基配列が登録されている、生物種が間違っていて登録されている等が挙げられる。これらの誤りは、抽出した 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列を BLAST を用いてデータベース等と比較することで検出できると考えられる。

### 2.3.2 *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌からの新規天然物探索

第 2.1 節で実施したゲノム解析結果を受け、第 2.2 節では、分子ネットワーク (MN) 解析を応用して *Pseudonocardiaceae* 放線菌から新規天然物を探索した。MSMS スペクトルに基づいた化合物の判別と MN 解析を組み合わせることで、*Saccharopolyspora* sp. KR21-0001、*Saccharothrix* sp. KR21-0069、*Saccharothrix* sp. OK19-0052、*Saccharopolyspora* sp. OK19-0061、*Lentzea* sp. OK19-0192、*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223、*Saccharopolyspora* sp. OK20-0167 及び *Saccharothrix* sp. OK19-0020 の 8 菌株から、合計 10,494 化合物を検出し、それらの内 2,102 を培地成分化合物に判別し、83 化合物を既知化合物に同定した。

それら既知化合物に同定された一部の化合物においては、LC-HRMS による分析時の保持時間が異なる (= 構造が異なる) 化合物が同じ化合物に同定された (Table S8)。MN 解析における化合物の同定では、各化合物が示したプリカーサーイオン及びフラグメントイオンの質量電荷比のみが比較される。すなわち、構造が非常によく似た化合物をそれぞれ異なる化合物として正確に同定することは難しいと考えられる。一方、LC-HRMS では、同じ構造を持つ化合物を分析した場合であっても、保持時間に誤差が生じたり、検出されるフラグメントイオンが一部異なることがある。従って、分析装置の装置構成やパラメーター設定の最適化や誤差を加味したデータベースの利用により、化合物同定の結果が一部改善されると期待できる。

本研究では、培地成分及び既知化合物を含まない未知代謝産物の MN (UMN) を定義し、それらから新規新規天然物の探索を実施した。化合物の生産量をプリカーサーイオンの強度に基づいて予測したところ、UMN は複数の菌株によって MN 中の化合物が生産される菌株共通 UMN と、MN 中の全ての化合物が特定の菌株のみによって生産される菌株固有 UMN に大別された (Fig. S6–Fig. S12)。一般に近縁な生物は同様の構造を持つ一次代謝産物を作るため、菌株共通 UMN は一次代謝産物の MN である可能性が高い。また、第 2.1 節では、*Pseudonocardiaceae* 科の希少放線菌が互いに異なる構造を有する二次代謝産物を生産することが示唆されている。これらのことから、菌株固有 UMN は二次代謝産物の MN である可能性が高いと考えられる。そこで、それら菌株固有 UMN である MN390 と MN260 に含まれる化合物の単離を試みた。*Lentzea* sp. OK19-0192 を 8 培地で 6 日間培養した培養液の上清より、各種クロマトグラフィーを用いることで MN390 に含まれる 4 化合物 (OK19-0192-A (5)、OK19-0192-G (6)、OK19-0192-HD (7) 及び lentindole (8)) を単離した。これらの化合物の内、8 は NMR 解析、アミノ酸分析及び MicroED による結晶構造解析により、tetrahydropyranoindole 構造を有する初の天然物であることが明らかになった。また、*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 を 66 培地で 16 日間培養した培養液から得られた残渣より、各種抽出操作とクロマトグラフィーを用いることで MN260 に含まれる化合物 (saccharocarcin A (9) 及び saccharocarcin B (10)) を単離した。Saccharocarcin A (9) 及び saccharocarcin B (10) は、化合物はスピロテトロネート系抗生物質として知られ、同系統の化合物には kijanimycin や chlorothricin 類等が挙げられる [98,99]。以上の結果より、MN390 及び MN260 に含まれる化合物はいずれも二次代謝産物であることが示唆され、本研究で実施した分子ネットワーク解析の応用は、二次代謝産物を探索する上で有用であることが示された。

MN260 と MN390 は、本研究によって見出された菌株固有 UMN の一部であり、化合物未単離な菌株固

有 UMN が複数残されている。本研究ではそれらの構造予測等には至らなかったものの、今後それらを単離することで珍しい構造を持つ新規二次代謝産物を取得できると期待される。

8 の構造決定に用いた MicroED は、結晶データを解析するだけで化合物の絶対立体配置が決定可能であるとされるが、その例は未だ少数である。8 の絶対立体配置は改良マーフィー法によるアミノ酸分析と MicroED を組み合わせることによって決定されたが、結晶データの解析結果のみからも、同様の立体配置を導くことができた。これらの結果は、MicroED による結晶構造解析だけで天然物の絶対立体配置を決定することが可能であることを改めて示している。



## 2.4 実験項

### 2.4.1 放線菌の sBGC 解析

#### antiSMASH を用いた二次代謝産物生合成遺伝子クラスターの解析と集計

Refseq [100] より fasta 形式でダウンロードした放線菌 (*Actinomycetota* 門細菌) のゲノムデータ (scaffold:4,148、complete:2,633、325 属) を antiSMASH6.0.0 [57,101] を用いて解析した。遺伝子アノテーションアルゴリズムには Prodigal を選択し、その他の設定は全てデフォルトの設定に従った。次に、ポリケチド、非リボソームペプチド、テルペン及びリボソーム翻訳後修飾ペプチドの生合成に関与する生合成遺伝子を有する sBGC (PNTR-BGC) の数を集計した。この時、1 つの sBGC にそれら生合成遺伝子が複数ある場合や、組み合わさって存在している場合であっても、その様な sBGC は 1 つの sBGC としてカウントした。この集計は、解析時に antiSMASH によって形成される HTML ファイルに記載されている sBGC アノテーションに基づいて実行した (Table S5)。

#### BiG-SCAPE を用いた遺伝子クラスタークラン解析

ゲノムから見出された PNTR-BGC の遺伝子クラスタークラン (GCC) 解析には BIG-SCAPE [90] を用いた。遺伝子クラスターファミリーや GCC の形成におけるカットオフ値は全てデフォルトの値に従った。また、scaffold ゲノムを用いるため配列の比較法は glocal とし、多様性を評価するためにシングルトンになる sBGC (= 他の sBGC とファミリーを形成しない sBGC) を含めて解析し、PNTR-BGC 同士の生合成クラスは区別しない様に設定した。

#### 2 菌株間における 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の相同性解析

FASTA 形式のゲノムデータに対応する GFF 形式の遺伝子アノテーションデータに基づき、BioPython [102] を用いてゲノムデータから配列を抽出することで 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列を得た。この時、1 つのゲノムデータに複数の 16S rRNA 遺伝子領域が存在している場合、最も長い領域を用いて配列を抽出した。菌株間での遺伝子同源性解析には、Basic Local Alingment Tool (BLAST) [103] を用いた。ただし、抽出された 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列の長さが 300 bp 以下の菌株はこの解析に含めなかった。

#### 2 菌株間における遺伝子クラスタークランの一致率の算出

菌株間における GCC の一致率は、2 株で一致する GCC の数を、それら 2 株から検出された全ての PNTR-GCC の合計数で割ることで求めた。ただし、PNTR-BGC を有さない菌株はこの解析に含めなかった。

### 2.4.2 分子ネットワーク解析を用いた新規天然物の探索

#### スクリーニングブロスの調製と分析

スクリーニングに用いた菌株は Table S10 にまとめた。当研究室で土壌より分離され、清野氏寒天培地上で保存されていた *Saccharopolyspora* sp. KR21-0001、*Saccharothrix* sp. KR21-0069、*Saccharothrix* sp. OK19-0052、*Saccharopolyspora* sp. OK19-0061、*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223、*Lentzea* sp. OK19-0192 及び *Saccharopolyspora* sp. OK20-0167 をそれぞれ 301seed 培地 10 mL (70 mL 容大試験管) に 1 白金耳植菌し、300 rpm、27°C の条件で 5 日間振盪培養した。また、35% グリセロールを添加して凍結保存していた *Saccharothrix* sp. OK19-0020 の 301seed 培養液を 301seed 培地 10 mL (70 mL 容大試験管) に 2% 植菌し、同様の条件で 5 日間振盪培養した。続いて、これら 8 菌株の培養液をそれぞれ、1 培地、4 培地、8 培地、22 培地、30 培地、31 培地、35 培地、38 培地、40 培地、43 培地、44 培地、51 培地、53 培地、57 培

地、60 培地、65 培地、66 培地、K 培地、PDB 培地及び Q 培地 (計 20 種類) 10 mL (70 mL 溶大試験管) に 1% 植菌し、300 rpm、27°C で 6 日間振盪培養した。次に、各培養液に等量のエタノールを加え、300 rpm で 2 時間振盪し、エタノールブロスとした。さらに、エタノールブロスを 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を培養液サンプルとして得た。また、植菌していない 1 培地、4 培地、8 培地、22 培地、30 培地、31 培地、35 培地、38 培地、40 培地、43 培地、44 培地、5s1 培地、53 培地、57 培地、60 培地、65 培地、66 培地、K 培地、PDB 培地及び Q 培地に等量のエタノールを加え、培養液と同様の条件で振盪と遠心分離することで上清を培地コントロールサンプルとして得た。以上の操作で得られた培養液サンプルと培地コントロールサンプルを、LC-HRMS を用いてそれぞれ分析した。また、装置及び溶媒に由来する化合物を区別して検出するため、ブランクサンプルとして MeOH も同様に分析した。

### MS-DIAL を用いた分析データの処理

LC-HRMS から得られた分析データファイル (wiff 及び wiffscan) は Analysis Base File Converter (<https://www.reifycs.com/AbfConverter/>) によって abf ファイルに変換した。

スペクトルデコンボリューション、ピークアライメント及び培地成分化合物スペクトルライブラリ (後述) を用いた培地成分の判別には MS-DIAL (ver. 4.90) [28] を用いた。MS-DIAL 使用時に適用した解析パラメーターは Table 2.8 に示した。

### 培地成分化合物スペクトルライブラリの作成

培地コントロールサンプルとブランクサンプルの分析データを MS-DIAL で処理し、培地成分化合物ピークの保持時間、プリカーサーイオンとフラグメントイオンの質量電荷比データを得た。このデータに基づき、スペクトルライブラリを msp 形式で作成した。この時、ノイズデータを除去するため、イオン強度がプリカーサーイオンの 10% 以上のフラグメントイオンのみをライブラリデータに採用した。

### 分子ネットワーク解析

GNPS の Web プラットフォーム内の Feature Based Molecular Networking (FBMN, <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>) [29] を用い、全てのサンプル (8 菌株の培養液サンプル、培地コントロールサンプル及びブランクサンプル) を同時に処理したデータについて、MSMS フラグメントイオンに基づく化合物の同定と分子ネットワーク解析を実施した。本解析では、Precursor Ion Mass Tolerance 及び Fragment Ion Mass Tolerance はそれぞれ 0.02 Da に設定した。また、FBMN に標準設定されている全ての公開 MS スペクトルデータベースを利用することにより既知化合物の同定を行った。

### 分子イオン強度の比較による代謝産物生産量の比較

菌株間での化合物生産量比較を簡単にするために、一つの化合物について同一菌株の培養液サンプル間でイオン強度を比較し、最も高い値をその化合物においてその菌株が示した代表イオン強度 (rep-int) とした。さらに、1 つの化合物において、各菌株の rep-int を比較し、最大の rep-int を示す菌株をその化合物代表生産株 (rep-strain) とした。Rep-int の算出は培地コントロールとブランクサンプルにも同時に適用し、Fig. S6–S12 では「Medium」として表した。

### Dictionary of Natural Products を用いた化合物の同定

DNP を用い、LC-HRMS 分析によって判明した  $m/z$ 、UV 極大吸収波長、MSMS フラグメントパターンが一致する化合物を、検索要素に "Accurate Mass"、"UV Maxima"、"Type of organism" を用いて次の様に検索した。"Accurate Mass" には、元のアダクトイオンから分子イオン ( $M^+$ ) の値を求め、小数点以下第 3 位で切り下げた上で  $\pm 0.02$  Da の範囲を持たせた値を入力した。"UV Maxima" には、全ての UV 極大吸収波長を  $\pm 20$  nm の許容範囲を持たせて入力した。"Type of organism" には、全ての細菌を示す検索コード (Table 2.7)

を入力した。これら 3 つの検索要素で該当した化合物については、LC-HRMS 解析ソフトによって MSMS フラグメントを予測し、分析結果と比較した。また、それら 3 つの検索要素で該当する化合物が無かった場合、"Type of organism" を用いずに検索し、同様に予測 MSMS フラグメントを分析結果と比較した。

**Table 2.7.** DNP の "Type of Organism" に入力した細菌由来化合物の検索用コード

Code	Organism
Z.B.03935	Acidobacteria
Z.B.03997	Actinobacteria - Streotpmycetaceae
Z.B.03998	Actinobacteria - other Actinomycetes
Z.B.03999	Actinobacteria - other taxa
Z.B.05815	Aquificae
Z.B.07145	Bacteroidetes
Z.B.11602	Chlamydiae
Z.B.11606	Chlorobi
Z.B.11608	Chloroflexi
Z.B.11630	Chrysiogenetes
Z.B.13775	Cyanobacteria
Z.B.14695	Deinococcus-thermus
Z.B.22260	Firmicutes
Z.B.23825	Fusobacteria
Z.B.57565	Planctomycetes
Z.B.58415	Proteobacteria
Z.B.68625	Spirochaetae
Z.B.70720	Tenericutes
Z.B.71071	Thermotogae
Z.B.77740	Verrucomicrobia
Z.B.99990	Miscellaneous and unidentified bacteria

**Table 2.8.** MS-DIAL による解析に用いたパラメーター

Parameter	Value
#Project	
MS1 Data type	Profile
MS2 Data type	Profile
Ion mode	Positive
Target	Metabonomics
Mode	ddMSMS
#Data collection parameters	
Retention time begin	2
Retention time end	13
Mass range begin	250
Mass range end	2000
MS2 mass range begin	100
MS2 mass range end	1500
#Centroid parameters	
MS1 tolerance	0.01
MS2 tolerance	0.01
#Isotope recognitio	

**Table 2.8.** MS-DIAL による解析に用いたパラメーター (続き)

Parameter	Value
Maximum charged number	4
#Data processing	
Number of threads	16
#Peak detection parameters	
Smoothing method	Linear Weighted Moving Average
Smoothing level	4
Minimum peak width	5
Minimum peak height	3000
#Peak spotting parameters	
Mass slice width	0.1
Exclusion mass list (mass tolerance)	(None)
#Deconvolution parameters	
Sigma window value	0.5
MS2Dec amplitude cut off	0
Exclude after precursor	TRUE
Keep isotope until	0.5
Keep original precursor isotopes	FALSE
#MSP file and MS/MS identification setting	
MSP file	(In-house spectral library)
Retention time tolerance	0.2
Accurate mass tolerance (MS1)	0.01
Accurate mass tolerance (MS2)	0.05
Identification score cut off	70
Using retention time for scoring	TRUE
Using retention time for filtering	TRUE
#Text file and post identification(retention time and accurate mass based) setting	
Text file	
Retention time tolerance	0.1
Accurate mass tolerance	0.01
Identification score cut off	85
#Advanced setting for identification	
Relative abundance cut off	0
Top candidate report	TRUE
	[M + H] <sup>+</sup>
	[M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
	[M + Na] <sup>+</sup>
	[M + H - H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>
	[2 M + H] <sup>+</sup>
#Adduct ion setting	[2 M + NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
	[2 M + Na] <sup>+</sup>
	[M + 2 H] <sub>2</sub> <sup>+</sup>
	[M + H + NH <sub>4</sub> ] <sub>2</sub> <sup>+</sup>
	[M + H + Na] <sub>2</sub> <sup>+</sup>
	[M + 3 H] <sub>3</sub> <sup>+</sup>
#Alignment parameters setting	
Reference file	(Data of MeOH blank sample)
Retention time tolerance	0.2
MS1 tolerance	0.01
Retention time factor	0.5
MS1 factor	0.5

**Table 2.8.** MS-DIAL による解析に用いたパラメーター (続き)

Parameter	Value
Peak count filter	0
N% detected in at least one group	0
Remove feature based on peak height fold-change	FALSE
Sample max / blank average	5
Sample average / blank average	5
Keep identified and annotated metabolites	TRUE
Keep removable features and assign the tag for checking	TRUE
Gap filling by compulsion	TRUE
#Tracking of isotope labels	
Tracking of isotopic labels	FALSE
Ion mobility	
Ion mobility data	FALSE

## 2.4.3 *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌が生産する天然物の取得

### *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌の培養

#### *Lentzea* sp. OK19-0192 の種培養

凍結保存していた *Lentzea* sp. OK19-0192 の 301seed 培養液を別の 301seed 培地 10 mL (70 mL 容大試験管) に 1% 植菌し、300 rpm の振盪条件下、27°C で培養した。この培養液から 301seed 培地 100 mL (500 mL 容三角フラスコ) に 1% 植菌し、ロータリーシェイカー (210 rpm) により 27°C で 6 日間振盪培養した。

#### Lentindole (8)、OK19-0192-A (5)、OK19-0192-G (6)、OK19-0192-HD (7) の発酵生産

*Lentzea* sp. OK19-0192 の種培養液を 8 培地 6 L (500 mL 容三角フラスコ 60 本) に 1% 植菌し、ロータリーシェイカー (210 rpm) により 27°C で 6 日間振盪培養した。

#### *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の種培養

凍結保存していた *Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の 301seed 培養液を、新たな 301seed 培地 100 mL (500 mL 容三角フラスコ) に 1% 植菌し、ロータリーシェイカー (210 rpm) により 27°C で 5 日間振盪培養した。

#### Saccharocarcin A (9) 及び saccharocarcin B (10) の発酵生産

*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の種培養液から 66 培地 5 L (6 L 容ジャーファーマンター) に 2% 植菌し、1.0 VVM の通気条件下、攪拌翼によって 180 rpm で攪拌しつつ、27°C で 3 日間培養した。その後、攪拌速度を 120 rpm、通気量を 0.5 VVM に変更し、7 日間培養した。さらに、通気量を 1.0 VVM に変更し、5 日間培養した。

## 天然物の単離

### Lentindole (8)、OK19-0192-A (5)、OK19-0192-G (6) 及び OK19-0192-HD (7) の単離

6 日間培養した培養液 6 L を 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を得た。上清を HP20 カラム (55 i.d. × 200 mm) に供し、化合物を MeOH/H<sub>2</sub>O 系 (各 1.5 L; 0、50、100%, v/v) で段階溶出した。100% MeOH 溶出画分から MeOH を減圧留去後、凍結乾燥し、1.7 g の乾固物を得た。乾固物を MeOH に溶解後、葉さじ 2 杯のシリカゲルを加えて減圧乾固し、化合物をシリカゲルに吸着させた。このシリカゲルをシリカゲ

ルカラム (37 i.d.×120 mm) に供し、MeOH/CHCl<sub>3</sub> 系 (各 300 mL; 0、1、2、10、50、100%, v/v) で化合物を段階溶出した。10% MeOH 溶出面分を減圧乾固し、得られた乾固物 (527.2 mg) を MeOH に溶解後、分取 HPLC (装置; Nexera シリーズ, カラム; PEGASIL-ODS-SP100 20 i.d. ×250 mm) に供し、45% MeOH<sub>aq</sub>. (0–20 分, 7 mL min<sup>-1</sup>) 及び 55% MeOH<sub>aq</sub>. (20–60 分, 7 mL min<sup>-1</sup>) を用い化合物を溶出した。保持時間 9.8 分、35.9 分及び 39.1 分のピークを分取し、MeOH を減圧留去後、凍結乾燥することにより、**5** (3.9 mg)、**6** (47.5 mg) 及び粗精製物 H (131.7 mg) を得た (Fig. 2.8)。粗精製物 H を MeOH に溶解し、再度分取 HPLC に供し、55% MeOH<sub>aq</sub>. (7 mL min<sup>-1</sup>) で化合物を溶出した。保持時間 23 分及び 26 分のピークを分取し、MeOH を減圧留去後、凍結乾燥することにより、**7** (26.8 mg)、**8** (46.1 mg) を得た (Fig. 2.8)。

#### Saccharocarcin A (**9**) 及び saccharocarcin B (**10**) の単離

15 日間培養した培養液 5 L を吸引濾過し、残渣に等量のアセトンを加え 15 分間超音波で処理した。処理液を吸引濾過後、アセトンを減圧留去し、水を加え 100 mL までメスアップした。次に、その水溶液に対して酢酸エチル 100 mL を用いた分液操作を 2 回行い、得られた有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。脱水後の有機層に葉さじ 2 杯のシリカゲルを加え、減圧乾固することで化合物をシリカゲルに吸着させた。このシリカゲルをシリカゲルカラム (24 i.d.×120 mm) に供し、MeOH/CHCl<sub>3</sub> 系 (各 120 mL; 0、1、2、10、50、100%, v/v) で化合物を段階溶出した。10% MeOH 溶出面分を減圧乾固し、粗精製物 (317.9 mg) を得た。この粗生成物を MeOH に溶解した後、分取 HPLC (装置; Nexera シリーズ, カラム; PEGASIL-ODS-SP100 20 i.d. ×250 mm) に供し、MeOH/H<sub>2</sub>O 系 (gradient; 90–100% + 0.1% ギ酸, 50 min、7 mL min<sup>-1</sup>) で化合物を溶出した。保持時間 24 分及び 27 分のピークを分取し、MeOH を減圧留去後、凍結乾燥し、**9** (94.7 mg) と **10** (118.6 mg) をそれぞれ得た (Fig. 2.13)。

### 2.4.4 取得した化合物の物性測定

#### UV 吸光度測定

UV 吸光度は、UV-Vis 分光器 (Supectra Max Quick Drop TM 分光計) を用いて次のように測定した。化合物の 0.01 mg mL<sup>-1</sup> MeOH 溶液を調製し、光路長 1 cm のキュベットを用いて測定した。

#### IR 吸光度測定

IR 吸光度の測定には、フーリエ変換赤外分光器 FT-4600 を用いた。化合物の 1.0 mg mL<sup>-1</sup> MeOH 溶液を調製し、測定部位に滴下した後に風乾し、測定した。

#### 比旋光度測定

比旋光度の測定には、デジタル偏光計 P-2200 を用いた。化合物の 1.0 mg mL<sup>-1</sup> MeOH 溶液を調製し、観測管に封入し、測定した。

### 2.4.5 取得した化合物の構造解析

#### NMR 測定

NMR 測定には JNM-ECA-500 を用い、DMSO-*d*<sub>6</sub> 中で行った。

#### 改良マーフィー法を用いた lentindole (**8**) のアミノ酸分析

**8** の粉末 1 mg を 6 mol L<sup>-1</sup> HCl 200 µL に加え、100°C で一晩攪拌して反応させた。その後、少量の水で希釈と乾固を繰り返して酸を除き、残留物を 1 mL の水に溶解させた。この溶液 5 µL に水 45 µL、NaHCO<sub>3</sub> 20 µL、1% D-FDLA アセトン溶液 50 µL を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。この反応

液に  $1\text{ mol L}^{-1}$  HCl  $25\text{ }\mu\text{L}$  を加えて中和し、減圧下乾固した。残渣を  $1\text{ mL}$  のアセトニトリルに溶解し、LC-HRMS で分析し、アミノ酸標準品の D-FDLA 誘導体と保持時間を比較した。

#### MicroED を用いた lentindole (**8**) の結晶構造解析

**8** の MeOH 溶液を室温で減圧乾固することで、**8** の結晶を得た。この結晶を顕微鏡用スライドガラスで挟んですり潰し、3D ED/MicroED 測定用の試料とした。試料をグリッド上に乗せ、XtaLAB Synergy-ED を用いて、 $293\text{ K}$  の温度条件下で 3D ED/MicroED データを収集した。ここでは、データの完全性を高めるために 2 つのデータセットを統合した。SHELXT [104] で構造解析後、運動学的精密化のために OLEX [105] で SHELXL [104] を用いて分子構造を精密化した。

## 総括

本研究では、天然物探索における微生物資源の開拓を目的に、ゲノム解析に基づいて細菌各属の天然物生産能力を予想した。さらに、予想結果に基づいて天然物探索に未利用な細菌である *Tumebacillus* 属と天然物取得例の少ない希少放線菌属が多く属する *Pseudonocardiaceae* 科に着目し、それらから新規天然物を探索した [106]。

第 1 章では、21,052 ゲノム (1,388 属) について二次代謝産物生合成遺伝子クラスター (sBGC) を解析し、細菌各属が有するポリケチド、非リボソームペプチド及びテルペンの生合成に関与する sBGC (PNT-BGC) の平均数を比較し、二次代謝産物生産能力を予測した。その結果、天然物探索に未利用であった *Tumebacillus* 属 (天然物報告数: 0、平均 PNT-BGC 数: 13.0) は、*Rhodococcus* 属 (天然物報告数: 32, 平均 PNT-BGC 数: 13.3) や *Actinomadura* 属 (天然物報告数: 267, 平均 PNT-BGC 数: 13.7) 等に匹敵する数の PNT-BGC を有していることが明らかになり、*Tumebacillus* 属は二次代謝産物の生産能に優れていると予想された。そこで、本研究では次に *Tumebacillus* 属細菌から新規天然物を探索した。その結果、*Tumebacillus permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup> の培養液から、新規抗 *Bacillus* 活性物質 tumebacin (1)、新規ピラジン系天然物 tumepyrzine (4) 及び 2 つの既知化合物 (4-(2-nitroethyl)phenol (2) と Le-pyrrolopyrazine B (3)) の単離を達成した。また、化合物の単離には至らなかったものの、LCUV を用いた代謝産物解析では、*Tumebacillus* 属細菌の培養液には多数の代謝産物が存在していた。これにより、ゲノム情報に基づいて天然物生産能に優れることが予想された *Tumebacillus* 属細菌は、新規天然物の探索源として有用であることが示された。また、以上の結果から、sBGC の数と種類を指標として二次代謝産物生産能が高い属を予測し、それらから優先的に天然物を探索する本戦略の有効性が示された。

第 2 章では、第 1 章の sBGC 解析を放線菌 (*Actinomycetota* 門細菌) に応用し、天然物生産能が高い希少放線菌を予測した。まず、*Actinomycetota* 門細菌の 6,781 ゲノム (scaffold:4,148、complete:2,663、325 属) について第 1 章同様に sBGC を解析した。次に、第 1 章で集計した PNT-BGC に加え、RiPP の生合成に関与する sBGC も含め、それら sBGC (PNTR-BGC) の平均数を比較し、二次代謝産物生産能力を予測した。その結果、天然物取得例が少ない *Pseudonocardiaceae* 科、*Streptosporangiaceae* 科及び *Streptomycetaceae* 科希少放線菌には、*Streptomyces* 属以上に PNTR-BGC を有する属が多数属していることがわかった。また、それら科における PNTR-BGC の平均数はそれぞれ *Pseudonocardiaceae* 科では 23.7、*Streptosporangiaceae* 科では 23.9、*Streptomycetaceae* 科希少放線菌では 25.0 であった。次に、類似するタンパクドメインを持つ PNTR-BGC を 1 つの遺伝子クラスタークラン (GCC) として分類し、GCC の多様性を科毎に調査した。その結果、異菌株間での GCC 一致率は *Pseudonocardiaceae* 科と *Streptosporangiaceae* 科では *Streptomyces* 属と同程度の 10–20%、*Streptomycetaceae* 科では 20–40% であった。このことから、*Pseudonocardiaceae* 科、*Streptosporangiaceae* 科及び *Streptomycetaceae* 科希少放線菌は多様な二次代謝産物を生産することが示唆された。また、これらの科では、種の多様性が高い程、それらから得られる二次代謝産物の多様性も高いと期待された。

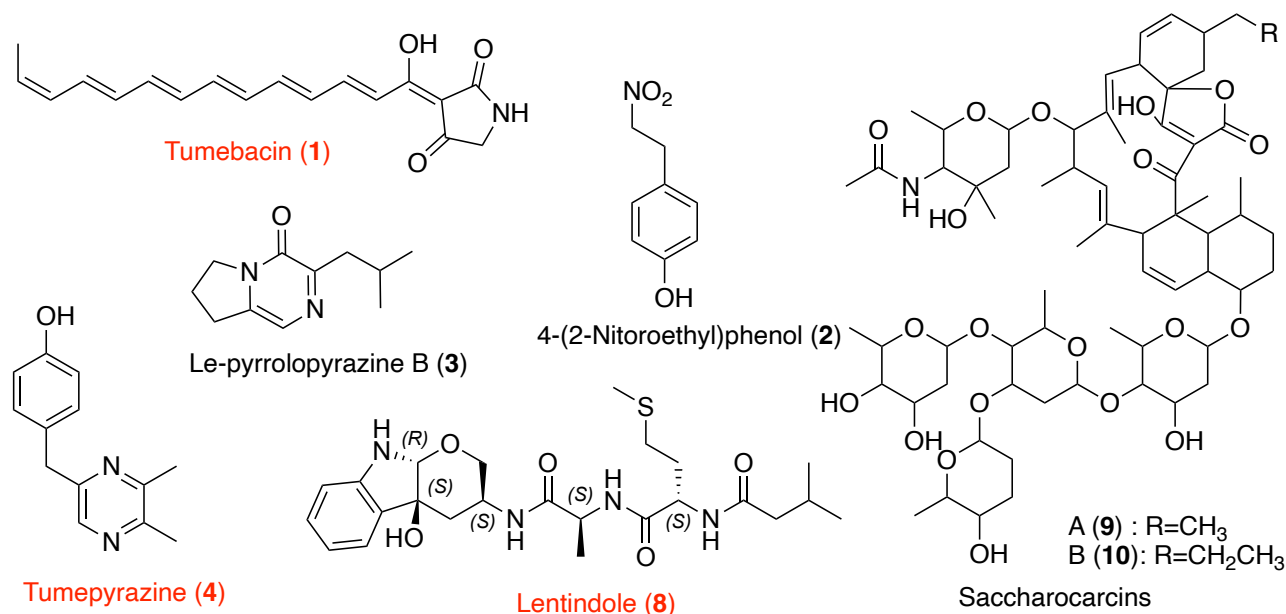
そこで、分子ネットワーク (MN) 解析を応用し、異なる 8 株の *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌の培養液から新規二次代謝産物の探索を試みた。まず、MN 解析、MSMS スペクトルライブラリを用いた既知化合物の同定と培地成分の判別を組み合わせることで、MN 中の化合物が全て未知代謝産物である MN (UMN) を 174 個見出した。さらに、各菌株における生産量を比較することで、二次代謝産物の MN として、MN 中の全ての化合物が特定の菌株のみによって生産される UMN (菌株固有 UMN) を複数見出した。

続いて、それら菌株固有 UMN の化合物の単離を試みた。その結果、*Lentzea* sp. OK19-0192 の培養液から



は1つの菌株固有 UMN に含まれる化合物である、OK19-0192-A (5)、OK19-0192-G (6)、OK19-0192-HD (7) 及び新規天然物 lentindole (8) を単離した (Fig. 2.15)。単離した化合物の内、8 は tetrahydropyranoindole 構造を有する初の天然物であった。また、*Kibdelosporangium* sp. OK19-0223 の二次代謝産物からは、スピロトロネート系抗生物質である saccharocarcin A (9) 及び saccharocarcin B (10) を単離した (Fig. 2.15)。今回、化合物の単離や構造解析には至らなかったものの、探索に用いた *Pseudonocardiaceae* 科希少放線菌 8 菌株からは菌株固有 UMN が複数見出されており、これらから新規天然物が取得されることが期待される。以上のことより、*Pseudonocardiaceae* 科に属する希少放線菌は多種多様な天然物を豊富に生産する有望な微生物資源であることが示された。

第1章と第2章を通じた総合的な結論として、本研究では、ゲノム情報に基づいて天然物生産能に優れた細菌属を予想し、それらから新規天然物や珍しい天然物を取得することで予想を実証し、微生物資源を開拓することができた。今後、本研究により見出された微生物資源から天然物を探索することで、多くの新規天然物を取得できると期待される。また、本手法は新たに解析及び公開されるゲノムデータにも適用可能であるため、ゲノムデータベースの拡張と共にさらなる微生物資源の開拓に繋がると期待される。



**Fig. 2.15.** 本研究において取得した天然物  
名前が赤色の化合物は、新規天然物を表している。

## 補足資料

**Table S1.** PNT-BGC 平均数が多い上位 100 の細菌属

Genus	Ave. of PNT-BGCs	NPs <sup>a</sup>	Genomes
<i>Kutzneria</i>	31	9	1
<i>Cystobacter</i>	29	63	1
<i>Kibdelosporangium</i>	28	33	1
<i>Saccharothrix</i>	26	101	2
<i>Nocardia</i>	25.3	312	21
<i>Chondromyces</i>	25	69	1
<i>Moorea</i>	25	45	1
<i>Stigmatella</i>	25	47	1
<i>Archangium</i>	23	26	1
<i>Lentzea</i>	23	2	1
<i>Sorangium</i>	22.6	220	5
<i>Phytohabitans</i>	22	1	2
<i>Melittangium</i>	21	3	1
<i>Minicystis</i>	21	0	1
<i>Corallococcus</i>	20.3	11	3
<i>Kitasatospora</i>	20.2	58	5
<i>Amycolatopsis</i>	19.6	153	13
<i>Saccharopolyspora</i>	19.4	139	5
<i>Actinosynnema</i>	19.3	50	3
<i>Nonomuraea</i>	19	37	2
<i>Streptosporangium</i>	19	63	1
<i>Streptacidiphilus</i>	18.3	0	3
<i>Streptomyces</i>	18.3	7953	255
<i>Alloactinosynnema</i>	18	0	1
<i>Myxococcus</i>	17.3	113	11
<i>Frankia</i>	17	6	4
<i>Verrucosispora</i>	17	24	2
<i>Micromonospora</i>	16.9	436	10
<i>Plantactinospora</i>	16.3	2	3
<i>Haliangium</i>	16	5	1
<i>Gynuella</i>	15	6 <sup>b</sup>	1
<i>Tolypothrix</i>	15	43	1
<i>Salinispora</i>	14.5	65	2
<i>Catenulispora</i>	14	3	1
<i>Actinomadura</i>	13.7	267	3
<i>Mycobacterium</i>	13.4	136	403
<i>Rhodococcus</i>	13.3	32	58

<sup>a</sup> Dictionary of Natural Products on USB (ver. 30.1) から算出した報告されている天然物数。

<sup>b</sup> Ueoka らによって報告されている [61]。

**Table S1.** PNT-BGC 平均数が多い上位 100 の細菌属 (続き)

Genus	Ave. of PNT-BGCs	NPs <sup>a</sup>	Genomes
<i>Photorhabdus</i>	13.2	18	6
<i>Actinopolyspora</i>	13	8	1
<i>Tumebacillus</i>	13	0	2
<i>Mycobacteroides</i>	13	0	46
<i>Actinoalloteichus</i>	12.8	29	5
<i>Herpetosiphon</i>	12	3	1
<i>Methylocaldum</i>	12	1	1
<i>Mycolicibacterium</i>	11.6	0	55
<i>Actinoplanes</i>	11.3	135	8
<i>Xenorhabdus</i>	11.1	110	8
<i>Methylovulum</i>	11	0	1
<i>Nostoc</i>	10.6	142	19
<i>Anabaena</i>	10	114	4
<i>Ktedonosporobacter</i>	10	0	1
<i>Limnoglobus</i>	10	0	1
<i>Prauserella</i>	10	0	1
<i>Trichormus</i>	10	2	2
<i>Brevibacillus</i>	9.9	13	16
<i>Gordonia</i>	9.8	57	19
<i>Dolichospermum</i>	9.5	0	2
<i>Chitinophaga</i>	9	14	9
<i>Acidisarcina</i>	9	0	1
<i>Rhodopirellula</i>	9	2	1
<i>Roseimicrobium</i>	9	0	1
<i>Segniliparus</i>	9	0	1
<i>Singulisphaera</i>	9	0	1
<i>Sandaracinus</i>	9	2	1
<i>Stanieria</i>	8.5	0	2
<i>Mycolicibacter</i>	8.4	0	5
<i>Nocardiopsis</i>	8.3	124	7
<i>Gemmata</i>	8.3	0	4
<i>Chondrocystis</i>	8	0	1
<i>Chroococcidiopsis</i>	8	0	1
<i>Frigoriglobus</i>	8	0	1
<i>Hoyosella</i>	8	0	1
<i>Lichenihabitans</i>	8	0	1
<i>Labilithrix</i>	8	0	1

<sup>a</sup> Dictionary of Natural Products on USB (ver. 30.1) から算出した報告されている天然物数。<sup>b</sup> Ueoka らによって報告されている [61]。

**Table S1.** PNT-BGC 平均数が多い上位 100 の細菌属 (続き)

Genus	Ave. of PNT-BGCs	NPs <sup>a</sup>	Genomes
<i>Roseimaritima</i>	8	0	1
<i>Pleurocapsa</i>	8	0	1
<i>Streptomonospora</i>	8	0	1
<i>Pseudonocardia</i>	7.9	32	10
<i>Calothrix</i>	7.7	12	7
<i>Methylocella</i>	7.5	0	2
<i>Microcystis</i>	7.4	240	9
<i>Aquisphaera</i>	7	0	1
<i>Halomicronema</i>	7	1	1
<i>Hahella</i>	7	10	3
<i>Leptolyngbya</i>	7	19	6
<i>Tatlockia</i>	7	0	3
<i>Tsukamurella</i>	7	5	4
<i>Xanthobacter</i>	7	5	1
<i>Thermomonospora</i>	7	4	1
<i>Stackebrandtia</i>	7	0	1
<i>Edaphobacter</i>	6.5	0	2
<i>Kroppenstedtia</i>	6.5	0	2
<i>Kordia</i>	6.5	0	2
<i>Methylosinus</i>	6.5	3	2
<i>Planctopirus</i>	6.5	0	2
<i>Teredinibacter</i>	6.5	2	2
<i>Bacillus</i>	6.2	850	791
<i>Methylobacterium</i>	6.1	9	18
<i>Geodermatophilus</i>	6	1	1
<i>Modestobacter</i>	6	0	1

<sup>a</sup> Dictionary of Natural Products on USB (ver. 30.1) から算出した報告されている天然物数。

<sup>b</sup> Ueoka らによって報告されている [61]。

**Table S2.** *Tumebacillus* 属細菌から見出された BGC

Strain (accession number)	Region	BGC type	From	To
<i>T. avium</i> AR23208 <sup>T</sup> (GCF_002162355.1)	1	NRPS	221,495	267,288
	2	T3PKS	296,916	337,977
	3	lanthipeptide-class-v	512,313	555,755
	4	RRE-containing	642,138	665,266
	5	NRPS, transAT-PKS, NRPS-like	671,649	837,526
	6	NRPS, betalactone	867,162	926,284
	7	NRPS	929,940	972,913
	8	NRPS, NRPS-like	1,435,122	1,552,615
	9	RiPP-like	1,574,051	1,578,494
	10	RiPP-like	2,166,043	2,177,005
	11	siderophore	2,386,972	2,408,068
	12	NRPS	3,007,039	3,059,609
	13	phosphonate, NRPS, T1PKS, thiopeptide, LAP	3,656,238	3,792,699
	14	NRPS, T1PKS	3,838,603	4,145,038
	15	NRPS	4,203,982	4,293,921
	16	NRPS	4,370,943	4,433,345
	17	NRPS	4,560,379	4,603,513
	18	NRPS, T1PKS	4,899,712	4,986,841
	19	NRPS, T1PKS, lanthipeptide-class-i	5,023,301	5,178,843

**Table S2.** *Tumebacillus* 属細菌から見出された BGC (続き)

Strain (accession number)	Region	BGC type	From	To
<i>T. algifaecis</i> THMBR28 <sup>T</sup> (GCF_002243515.1)	1	Phosphonate	133,617	171,992
	2	NRPS, transAT-PKS, T1PKS, siderophore	509,207	652,788
	3	RiPP-like	652,945	662,169
	4	NRPS	680,165	733,211
	5	NRPS	740,779	786,920
	6	T3PKS	1,029,731	1,070,792
	7	NRPS	1,084,652	1,130,865
	8	NRPS, T1PKS, lanthipeptide-class-i	1,398,009	1,555,025
	9	NRPS, T1PKS	1,571,094	1,633,392
	10	NRPS	1,878,088	1,920,446
	11	NRPS, T1PKS	2,135,465	2,235,681
	12	NRPS, T1PKS	2,303,267	2,617,194
	13	LAP, thiopeptide, NRPS, T1PKS, phosphonate	2,632,160	2,724,198
	14	NRPS-like, NRPS	3,072,481	3,160,109
	15	siderophore	3,792,082	3,803,917
	16	thiopeptide, LAP	3,887,745	3,921,557
	17	RiPP-like	3,982,405	3,993,367

**Table S2.** *Tumebacillus* 属細菌から見出された BGC (続き)

Strain (accession number)	Region	BGC type	From	To
<i>T. permanentifrigoris</i> DSM 18773 <sup>T</sup> (GCF_003148565.1)	2.1	T1PKS, NRPS	16,381	97,160
	2.2	ladderane	114,655	157,117
	3.1	siderophore	37,000	50,997
	3.2	NRPS	194,477	270,290
	4.1	transAT-PKS, NRPS, lanthipeptide-class-i	182,077	270,367
	5.1	T1PKS, NRPS	167,643	214,734
	6.1	RRE-containing	1	17,203
	6.2	hglE-KS	180,472	226,255
	7.1	T3PKS	19,960	61,030
	10.1	RiPP-like	18,667	29,545
	10.2	T1PKS	129,076	174,460
	11.1	NRPS, T1PKS	68,904	134,670
	13.1	siderophore	52,520	67,933
	16.1	transAT-PKS, NRPS-like	65,977	114,338
	17.1	arylpolylene	10,206	52,542
	21.1	NRPS	1	26,663
	23.1	transAT-PKS, NRPS	1	52,815
	32.1	proteusin, RRE-containing	1	12,954
	46.1	RiPP-like	1	2,673
	49.1	NRPS	1	2,378



**Table S2.** *Tumebacillus* 属細菌から見出された BGC (続き)

Strain (accession number)	Region	BGC type	From	To
<i>Tumebacillus</i> sp. BK434 (GCF_004340785.1)	1.1	phosphonate, NRPS, TIPKS, thiopeptide, LAP	206,014	363,316
	1.2	NRPS, RiPP-like, TIPKS	393,977	675,057
	1.3	NRPS, TIPKS	724,944	860,633
	1.4	NRPS	921,982	987,752
	1.5	NRPS	1,106,999	1,150,889
	2.1	NRPS, LAP	320,531	363,261
	2.2	NRPS	408,921	489,822
	2.3	NRPS	498,399	578,739
	2.4	RRE-containing	580,786	603,923
	2.5	lanthipeptide-class-v	694,909	738,339
	2.6	T3PKS	841,748	863,814
	3.1	ranthipeptide	179,406	203,848
	3.2	siderophore	386,861	407,763
	3.3	TIPKS, NRPS, transAT-PKS, RiPP-like	549,329	631,578
	4.1	NRPS, TIPKS, lanthipeptide-class-i	63,043	218,541
	4.2	TIPKS, NRPS	240,220	304,311
	5.1	NRPS	181,684	228,757
	6.1	NRPS	81,358	134,302
	17.1	NRPS-like	1	7,579

**Table S2.** *Tumebacillus* 属細菌から見出された BGC (続き)

Strain (accession number)	Region	BGC type	From	To
<i>T. amycolyticus</i> ITR2 <sup>T</sup> (GCF_016722965.1)	1.1	NRPS, T1PKS	628,923	718,608
	1.2	T3PKS	1,101,486	1,142,556
	6.1	proteusin, RRE-containing	1	10,427
	12.1	LAP, thiopeptide	592,875	622,489
	23.1	T1PKS, NRPS	68,843	149,824
	23.2	ladderane	167,534	209,996
	27.1	thiopeptide, LAP, RiPP-like	376,981	435,671
	28.1	siderophore	46,993	60,988
	28.2	lanthipeptide-class-i, NRPS, T1PKS	204,334	356,298
	30.1	NRPS-like, transAT-PKS	72,613	120,767

**Table S3.** Tumbacin (**1**) と Tumepyrzine (**4**) の物理化学的性状

	Tumbacin ( <b>1</b> )	Tumepyrzine ( <b>4</b> )
Appearance	Red powder	White powder
Molecular formula	C <sub>18</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>3</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O
Molecular weight	297	214
ESI-MS ( <i>m/z</i> ) positive	298 [M + H] <sup>+</sup>	215 [M + H] <sup>+</sup>
ESI-MS ( <i>m/z</i> ) negative	296 [M – H] <sup>–</sup>	Not tested
HR-ESI-MS ( <i>m/z</i> )		
Calcd.	298.1438 [M + H] <sup>+</sup>	215.1179 [M + H] <sup>+</sup>
Found	298.1437 [M + H] <sup>+</sup>	215.1184 [M + H] <sup>+</sup>
UV λ <sup>MeOH</sup> <sub>nm</sub> (ε )	400 (7166)	279 (5906)
IR ν (cm <sup>–1</sup> )	3226, 1611, 1451, 997, 802	3347, 1612, 1510, 1457, 1267, 1096, 928
Solubility		
Soluble	DMSO	MeOH
Insoluble	H <sub>2</sub> O	

**Table S4.** *Tumebacillus* 属細菌のスクリーニングに用いた土壌

Soil set	No.	Date	Prefecture	City	Environment
1	13849	210902	北海道	札幌市	トドの根本
1	13850	210902	北海道	札幌市	ヤチダモの根本
1	13851	210902	北海道	札幌市	ウダイカンバの根元
1	13852	210901	北海道	千歳市	コナラの根元
1	13853	210901	北海道	千歳市	エゾマツの根元
1	13854	210901	北海道	千歳市	ケヤマハンノキの根元
1	13855	210903	北海道	小樽市	サワラの根元
1	13856	210903	北海道	小樽市	オウシュウトウヒの根元
1	13857	210903	北海道	白老町	トドの根元
1	13858	210903	北海道	白老町	アカエゾマツの根元
2	13870	210918	北海道	北見市	カラマツの根元
2	13871	210918	北海道	北見市	コナラのウロ (堆積物)
2	13872	210923	長野県	大町市	コメの根元
2	13873	210923	長野県	大町市	ソバの根元
2	13874	210923	長野県	大町市	ナンテンの根元
2	13875	210923	長野県	大町市	ノリウツギの根元
2	13876	210923	長野県	大町市	カスミザクラの根元
2	13877	210923	長野県	大町市	カラマツの根元
2	13878	210923	長野県	大町市	コシアブラの根元
2	13879	210923	長野県	大町市	ハイイヌツゲの根元
3	13880	210923	長野県	大町市	アカマツの根元
3	13881	210923	長野県	大町市	マンネンスギの根元
3	13882	210923	長野県	大町市	ソヨゴの根元
3	13883	210923	長野県	大町市	コナラの根元
3	13884	210923	長野県	大町市	シデの根元
3	13885	210923	長野県	白馬村	シデの根元
3	13886	210923	長野県	白馬村	アカマツの根元
3	13887	210924	長野県	白馬村	シデの根元
3	13888	211002	群馬県	片品村	カラマツの根元
3	13889	211002	群馬県	片品村	コナラの根元
4	13762	200615	茨城県	取手市	採取者宅
4	13787	201114	東京都	町田市	金木屋の根元
4	13788	201121	東京都	町田市	竹林
4	13827	210102	神奈川県	箱根市	山
4	13828	210102	神奈川県	箱根市	山
4	13829	210418	茨城県	神栖市	砂浜
4	13761	200615	茨城県	取手市	桑の木の根元
4	13890	211002	群馬県	片品村	ツツジの根元
4	13891	211002	群馬県	片品村	モミの根元
4	13909	201011	神奈川県	川崎市	公園の土壌

**Table S5.** antiSMASH6.0.0 によって見いだされる BGC の分類

Label <sup>a</sup>	Description	Added ver. <sup>b</sup>	Last_update ver. <sup>c</sup>	BGC Class <sup>d</sup>
acyl_amino_acids	<i>N</i> -acyl amino acid cluster	4	4.1	Other
aminocoumarin	Aminocoumarin cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
amglyccycl	Aminoglycoside/aminocyclitol cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
aryl/polyene	Aryl polyene cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	PK
βlactone	β-lactone containing protease inhibitor	5	5	Other
blactam	β-lactam cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
bottromycin	Bottromycin cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	RIPP
butyrolactone	Butyrolactone cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
CDPS	tRNA-dependent cyclodi-peptide synthases	5	5	Other
cyanobactin	Cyanobactins like patellamide (AY986476)	≤ 3.0	6	RIPP
cyclic-lactone-autoinducer	agrD-like cyclic lactone autoinducer peptides (AF001782)	6	6	Other
ectoine	Ectoine cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
epipeptide	D-amino-acid containing RiPPs such as yydF (D78193)	6	6	RIPP
fatty_acid	Fatty acid cluster (loose strictness, likely from primary metabolism)	≤ 3.0	4.2	Other
furam	Furan cluster	≤ 3.0	5	Other
fungal-RiPP	Fungal RiPP with POP or UstH peptidase types and a modification	5	5	RIPP
glycocin	Glycocin cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
guanidinotides	Pheganomycin-style protein ligase-containing cluster	4	6	RIPP
halogenated	Cluster containing a halogenase and thus potentially generating a halogenated product	5	5	Other
hgIE-KS	heterocyst glycolipid synthase-like PKS	5	5	PK
hsrlactone	Homoserine lactone cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
indole	Indole cluster	≤ 3.0	4	Other
LAP	Linear azole/azoline-containing peptides	≤ 3.0	6	RIPP
ladderane	Ladderane cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
lantipeptide class I	Class I lantipeptide clusters like nisin	4.2	6	RIPP
lantipeptide class II	Class II lantipeptide clusters like mutacin II(U40620)	4.2	6	RIPP
lantipeptide class III	Class III lantipeptide clusters like labyrinthopeptin (FN178622)	4.2	6	RIPP
lantipeptide class IV	Class IV lantipeptide clusters like venezuelin (HQ328852)	4.2	6	RIPP
lantipeptide class V	Glycosylated lantipeptide/linaridin hybrids like MT210103	5.1	6	RIPP
lassopeptide	Lasso peptide cluster	≤ 3.0	5	RIPP
linaridin	Linear arid peptide such as cypemycin (HQ148718) and salinipeptin (MG788286)	≤ 3.0	≤ 3.0	RIPP
lipolanthine	Lanthipeptide class containing <i>N</i> -terminal fatty acids such as MG673929	5	5	RIPP
melanin	Melanin cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other

<sup>a</sup> antiSMASH によって BGC につけられる生合成タイプの分類ラベル

<sup>b</sup> 導入された antiSMASH のバージョン

<sup>c</sup> アップデートされた antiSMASH のバージョン

<sup>d</sup> 本研究における、BGC の生合成クラス判定

**Table S5. antiSMASH6.0.0 によって見いだされる BGC の分類 (続き)**

Label <sup>a</sup>	Description	Added ver.	Last_update ver.	BGC Class
microviridin	Microviridin cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	RIPP
NAGGN	<i>N</i> -acetylglutaminylglutamine amide	5	5	RIPP
NAPAA	no <i>N</i> -α poly-amino acids like e-Polylysine	6	6	Other
nrps	No <i>N</i> -ribosomal peptide synthetase cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	NRP
nrps-like	NRPS-like fragment	5	5	NRP
nucleoside	Nucleoside cluster	≤ 3.0	5	Other
oligosaccharide	Oligosaccharide cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
other	Cluster containing a secondary metabolite-related protein that does not fit into any other category	4	5	Other
PBDE	Polybrominated diphenyl ether cluster	4.1	4.1	Other
phenazine	Phenazine cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
phosphoglycolipid	Phosphoglycolipid cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
phosphonate	Phosphonate cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
PKS-like	Other types of PKS cluster	5	5	PK
PpyS-KS	PPY-like pyrone cluster	4.2	4.2	Other
proteusin	Proteusin cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	RIPP
PUFA	Polyunsaturated fatty acid cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
pyrrolidine	Pyrrolidines like described in BGC0001510	6	6	Other
ranthipeptide	Cys-rich peptides (aka. SCIFF: six Cys in fourty-five) like in CP001581:3481278-3502939	6	6	RIPP
RaS-RiPP	Streptide-like thioether-bond RiPPs	5	5	RIPP
redox-cofactor	Redox-cofactors such as PQQ (NC_021985:1458906-1494876)	6	6	Other
resorcinol	Resorcinol cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
RiPP-like	Other unspecified ribosomally synthesised and post-translationally modified peptide product (RiPP) cluster	4.1	6	RIPP
RRE-containing	RRE-element containing cluster	6	6	RIPP
saccharide	Saccharide cluster (loose strictness, likely from primary metabolism)	≤ 3.0	≤ 3.0	RIPP
sactipeptide	Sactipeptide cluster	≤ 3.0	6	RIPP
siderophore	Siderophore cluster	≤ 3.0	≤ 3.0	Other
spliceotide	RiPPs containing plpX type spliceases (NZ_KB235920:17899-42115)	6	6	RIPP
T1PKS	Type I PKS (Polyketide synthase)	≤ 3.0	≤ 3.0	PK
T2PKS	Type II PKS	≤ 3.0	5	PK
T3PKS	Type III PKS	≤ 3.0	≤ 3.0	PK
terpene	Terpene	≤ 3.0	4.1	Terpene
thioamitides	Thioamitide RiPPs as found in JOB01000011	5.1	6	RIPP
thioamide-NRP	Thioamide-containing non ribosomal peptide	5	5	RIPP

<sup>a</sup> antiSMASH によって BGC につけられる生成タイプの分類ラベル

<sup>b</sup> 導入された antiSMASH のバージョン

<sup>c</sup> アップデートされた antiSMASH のバージョン

<sup>d</sup> 本研究における、BGC の生成クラス判定

**Table S5.** antiSMASH6.0.0 によって見いだされる BGC の分類 (続き)

Label <sup>a</sup>	Description	Added ver.	Last_update ver.	BGC Class
thiopeptide	Thiopeptide cluster	4.2	5	RIPP
transAT-PKS	Trans-AT PKS	≤ 3.0	5	PK
transAT-PKS-like	Trans-AT PKS fragment, with trans-AT domain not found	≤ 5.0	5	PK
tropodithietic-acid	Tropodithietic acid cluster	5	5	Other

<sup>a</sup> antiSMASH によって BGC につけられる生合成タイプの分類ラベル

<sup>b</sup> 導入された antiSMASH のバージョン

<sup>c</sup> アップデートされた antiSMASH のバージョン

<sup>d</sup> 本研究における、BGC の生合成クラス判定

**Table S6.** *Actinomycetota* 門各属における PNTR-BGC 数

Family	Genus	Complete	Scaffold	Ave. all BGC	Ave. PNTR-BGC	NPs
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Crossiella</i>	0	3	57.3	48.3	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinocrispum</i>	0	1	55.0	46.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Kibdelosporangium</i>	1	3	51.8	42.3	33
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Embleya</i>	0	2	48.0	42.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Allokutzneria</i>	0	1	46.0	37.0	3
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Kutzneria</i>	2	1	45.3	36.0	9
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Thermocatellispora</i>	0	1	39.0	34.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Bailinhaonella</i>	0	1	36.0	34.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Sciscionella</i>	0	2	39.0	33.5	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Saccharothrix</i>	3	5	39.4	32.6	119
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Kitasatospora</i>	4	14	38.5	31.9	77
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Longimycelium</i>	0	1	36.0	31.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Polymorphospora</i>	1	0	33.0	30.0	3
<i>Frankiaceae</i>	<i>Frankia</i>	3	27	31.6	29.7	15
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Acrocarpospora</i>	0	4	34.5	29.5	6
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinokineospora</i>	0	12	35.5	29.4	14
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Herbidospora</i>	0	6	30.7	29.3	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Lentzea</i>	1	21	33.9	28.5	14
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Labeledaea</i>	0	1	32.0	28.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Streptosporangium</i>	1	7	31.5	27.6	74
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	31	36	31.3	27.3	328
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Sinosporangium</i>	0	1	32.0	27.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>	22	35	33.9	26.8	202
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Umezawaea</i>	0	2	31.0	26.5	2
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Microtetrastora</i>	0	3	29.0	26.3	16
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Nonomuraea</i>	4	28	30.1	26.3	57
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinosynnema</i>	2	0	27.5	25.5	62
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	5	25	30.0	25.2	289
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Solihabitans</i>	0	1	33.0	25.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Planobispora</i>	0	1	27.0	25.0	1
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Phytohabitans</i>	2	0	27.0	24.5	1
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptacidiphilus</i>	2	10	32.8	24.2	6
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinophytocola</i>	0	1	31.0	24.0	0
<i>Actinospicaceae</i>	<i>Actinospica</i>	0	1	28.0	24.0	2
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Planomonospora</i>	0	2	26.0	24.0	1
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	342	0	31.2	23.3	9360
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Saccharopolyspora</i>	7	10	29.1	23.2	148
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Alloactinosynnema</i>	1	0	32.0	23.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Sphaerisporangium</i>	0	4	26.8	22.5	9
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Microbispora</i>	0	15	26.6	22.4	57
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Mangrovihabitans</i>	0	1	25.0	22.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Micromonospora</i>	13	45	23.6	21.8	529
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Salinispora</i>	1	21	25.5	21.6	134
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Antrihabitans</i>	0	2	25.0	21.5	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinoalloteichus</i>	4	3	26.9	21.0	40
<i>Catenulisporaceae</i>	<i>Catenulispora</i>	1	0	24.0	21.0	4
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Dactylosporangium</i>	1	1	25.5	20.5	65
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Verrucosispora</i>	1	0	21.0	20.0	26
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Plantactinospora</i>	3	0	22.3	19.7	3
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Yinghuangia</i>	1	1	25.0	19.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Herbihabitans</i>	0	1	23.0	19.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Longispora</i>	0	1	25.0	18.0	1
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Gandjariella</i>	0	1	25.0	18.0	0
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Marinactinospora</i>	0	1	21.0	18.0	13
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Thermoactinospora</i>	0	1	20.0	18.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Catellatospora</i>	1	6	22.4	17.9	1
<i>Actinopolysporaceae</i>	<i>Actinopolyspora</i>	1	7	22.5	17.1	8



**Table S6.** *Actinomycetota* 門各属における PNTR-BGC 数 (続き)

Family	Genus	Complete	Scaffold	Ave. all BGC	Ave. PNTR-BGC	NPs
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Hamadaea</i>	0	1	22.0	17.0	0
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinocorallia</i>	0	1	22.0	17.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Pseudosporangium</i>	0	2	18.5	16.5	0
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacteroides</i>	76	844	19.2	16.5	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Couchioplanes</i>	1	1	18.5	16.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Catelliglobospora</i>	0	1	18.0	16.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Phytomonospora</i>	0	1	18.0	16.0	0
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Rhodococcus</i>	90	167	20.7	16.0	39
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Murinocardiopsis</i>	0	1	17.0	15.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinoplanes</i>	10	13	18.8	14.4	143
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Nocardiopsis</i>	9	23	18.8	14.3	190
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycobacterium</i>	470	0	16.0	14.2	148
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Natronosporangium</i>	1	0	19.0	14.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Asanoa</i>	0	1	17.0	14.0	0
<i>Gordoniaceae</i>	<i>Williamsia</i>	0	6	17.3	13.5	1
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycolicibacterium</i>	73	84	16.2	13.4	0
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Thermomonospora</i>	2	3	17.4	13.2	4
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Marinitenerispora</i>	0	2	16.5	12.5	0
<i>Cryptosporangiaceae</i>	<i>Cryptosporangium</i>	0	2	16.0	12.5	1
<i>Tsukamurellaceae</i>	<i>Tsukamurella</i>	7	6	15.7	12.3	28
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Prescottella</i>	15	8	16.4	12.2	0
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Skermania</i>	1	0	15.0	12.0	0
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Streptomonospora</i>	1	3	14.5	12.0	4
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Actinorugispora</i>	0	1	14.0	12.0	0
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinocatenispora</i>	2	1	16.0	11.7	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Prauserella</i>	1	6	18.3	11.4	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Pseudonocardia</i>	10	19	16.9	11.4	55
<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Stackebrandtia</i>	1	1	15.0	11.0	0
<i>Gordoniaceae</i>	<i>Gordonia</i>	35	20	13.8	10.5	60
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Thermobifida</i>	3	2	12.2	10.4	6
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycolicibacter</i>	7	3	12.3	10.2	0
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Hoyosella</i>	1	1	13.5	10.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Saccharomonospora</i>	2	8	12.7	9.7	16
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Qaidamihabitans</i>	0	1	15.0	9.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Thermopolyspora</i>	0	1	10.0	9.0	0
<i>Motilibacteraceae</i>	<i>Motilibacter</i>	0	4	9.0	8.8	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Haloechinothrix</i>	0	2	12.0	8.5	0
<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Luteipulveratus</i>	1	0	14.0	8.0	0
<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Natronoglycomyces</i>	1	0	12.0	8.0	0
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Carbonactinospora</i>	0	1	11.0	8.0	0
<i>Segniliparaceae</i>	<i>Segniliparus</i>	1	1	9.0	7.5	0
<i>Nocardiopsaceae</i>	<i>Spiractinospora</i>	1	0	11.0	7.0	0
<i>Treboniaceae</i>	<i>Trebonia</i>	0	1	11.0	7.0	0
<i>Vallicoccaceae</i>	<i>Vallicoccus</i>	0	1	8.0	7.0	0
<i>Kribbellaceae</i>	<i>Kribbella</i>	2	14	9.9	6.7	7
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinomycetospora</i>	0	3	11.7	6.7	3
<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus</i>	1	16	8.2	6.4	1
<i>Jiangellaceae</i>	<i>Jiangella</i>	0	5	8.0	6.4	7
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Myceligenerans</i>	0	3	8.0	6.3	0
<i>Mycobacteriaceae</i>	<i>Mycolicibacillus</i>	2	0	9.0	6.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Allosaccharopolyspora</i>	1	0	9.0	6.0	0
<i>Egibacteraceae</i>	<i>Egibacter</i>	1	0	8.0	6.0	0
<i>Iamiaceae</i>	<i>Aquihabitans</i>	1	0	8.0	6.0	0
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Tomitella</i>	2	0	8.0	6.0	0
<i>Actinopolymorphaceae</i>	<i>Actinopolymorpha</i>	0	2	7.0	6.0	3
<i>Kineosporiaceae</i>	<i>Kineococcus</i>	1	5	6.2	6.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Clavibacter</i>	37	16	8.7	5.8	1
<i>Rubrobacteraceae</i>	<i>Rubrobacter</i>	6	2	7.6	5.8	2

**Table S6. Actinomycetota 門各属における PNTR-BGC 数 (続き)**

Family	Genus	Complete	Scaffold	Ave. all BGC	Ave. PNTR-BGC	NPs
Microbacteriaceae	<i>Curtobacterium</i>	15	78	8.5	5.7	3
Glycomycetaceae	<i>Glycomyces</i>	0	15	10.7	5.7	2
Sporichthyaceae	<i>Sporichthya</i>	0	2	7.5	5.5	0
Microbacteriaceae	<i>Rathayibacter</i>	14	110	6.7	5.3	0
Microbacteriaceae	<i>Plantibacter</i>	2	10	7.3	5.3	0
Jiangellaceae	<i>Phytoactinopolyspora</i>	0	5	7.0	5.2	0
Baekduiaceae	<i>Baekduia</i>	1	0	7.0	5.0	0
Iamiaceae	<i>Actinomarinicola</i>	1	0	7.0	5.0	0
Ilumatobacteraceae	<i>Ilumatobacter</i>	1	0	7.0	5.0	0
Kineosporiaceae	<i>Kineosporia</i>	0	2	7.0	5.0	0
Micrococcaceae	<i>Psychromicrobium</i>	1	0	7.0	5.0	0
Geodermatophilaceae	<i>Modestobacter</i>	2	5	6.6	5.0	0
Kineosporiaceae	<i>Quadrisphaera</i>	0	2	5.5	5.0	0
Propionibacteriaceae	<i>Microlunatus</i>	3	1	5.3	5.0	1
Kineosporiaceae	<i>Angustibacter</i>	0	1	5.0	5.0	0
Solirubrobacteraceae	<i>Solirubrobacter</i>	0	3	8.7	4.7	0
Promicromonosporaceae	<i>Cellulosimicrobium</i>	8	8	5.2	4.6	0
Micrococcaceae	<i>Auritidibacter</i>	1	1	7.5	4.5	0
Dermatophilaceae	<i>Austwickia</i>	1	1	6.0	4.5	0
Actinopolysporaceae	<i>Halopolyspora</i>	0	1	9.0	4.0	0
Dermacoccaceae	<i>Flexivirga</i>	0	1	9.0	4.0	0
Micrococcaceae	<i>Neomicrococcus</i>	1	0	8.0	4.0	0
Geodermatophilaceae	<i>Cumulibacter</i>	0	1	7.0	4.0	0
Microbacteriaceae	<i>Glaciibacter</i>	0	1	7.0	4.0	0
Patulibacteraceae	<i>Patulibacter</i>	0	2	7.0	4.0	0
Dermacoccaceae	<i>Yimella</i>	1	0	6.0	4.0	0
Ruaniaceae	<i>Occultella</i>	1	1	6.0	4.0	0
Euzebyaceae	<i>Euzebya</i>	1	0	5.0	4.0	0
Jatrophihabitantaceae	<i>Jatrophihabitans</i>	1	1	5.0	4.0	0
Jiangellaceae	<i>Haloactinopolyspora</i>	0	1	5.0	4.0	0
Microbacteriaceae	<i>Diaminobutyricibacter</i>	0	1	5.0	4.0	0
Microbacteriaceae	<i>Glaciihabitans</i>	1	0	5.0	4.0	0
Micrococcaceae	<i>Renibacterium</i>	3	0	5.0	4.0	2
Propionibacteriaceae	<i>Micropruina</i>	1	0	5.0	4.0	0
Intrasporangiaceae	<i>Tetrasphaera</i>	1	5	4.5	4.0	0
Miltoncostaeaceae	<i>Miltoncostaea</i>	2	0	4.5	4.0	0
Dermabacteraceae	<i>Devriesea</i>	1	0	4.0	4.0	0
Microbacteriaceae	<i>Marisediminicola</i>	1	0	4.0	4.0	0
Propionibacteriaceae	<i>Arachnia</i>	8	0	4.0	4.0	0
Promicromonosporaceae	<i>Oerskovia</i>	1	6	4.0	3.7	0
Microbacteriaceae	<i>Agreia</i>	1	1	5.5	3.5	0
Nakamurellaceae	<i>Nakamurella</i>	3	3	4.8	3.5	0
Geodermatophilaceae	<i>Klenkia</i>	0	2	4.5	3.5	0
Microbacteriaceae	<i>Fron dih abitans</i>	2	4	5.5	3.3	0
Promicromonosporaceae	<i>Promicromonospora</i>	0	3	5.3	3.3	6
Dietziaceae	<i>Dietzia</i>	6	19	7.2	3.3	4
Dermatophilaceae	<i>Dermatophilus</i>	1	41	3.6	3.3	0
Microbacteriaceae	<i>Herbiconiux</i>	1	6	5.4	3.3	0
Bogoriellaceae	<i>Georgenia</i>	4	5	4.8	3.2	0
Micrococcaceae	<i>Paenarthrobacter</i>	9	16	6.4	3.2	0
Microbacteriaceae	<i>Cryobacterium</i>	4	28	4.3	3.1	0
Cellulomonadaceae	<i>Cellulomonas</i>	16	28	4.3	3.1	2
Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>	345	250	4.6	3.0	89
Micrococcaceae	<i>Zhihengliuella</i>	0	2	6.5	3.0	0
Microbacteriaceae	<i>Planctomonas</i>	0	1	6.0	3.0	0
Microbacteriaceae	<i>Schumannella</i>	0	2	6.0	3.0	0
Nocardiodaceae	<i>Pimelobacter</i>	1	2	6.0	3.0	0
Micrococcaceae	<i>Sinomonas</i>	1	5	5.8	3.0	0

**Table S6.** *Actinomycetota* 門各属における PNTR-BGC 数 (続き)

Family	Genus	Complete	Scaffold	Ave. all BGC	Ave. PNTR-BGC	NPs
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Subtercola</i>	2	1	5.7	3.0	0
<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Gephyromycinifex</i>	1	0	5.0	3.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Cnuibacter</i>	1	0	5.0	3.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Conyzicola</i>	0	1	5.0	3.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Diaminobutyricimonas</i>	1	0	5.0	3.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Gryllotalpicola</i>	1	1	5.0	3.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Humibacter</i>	1	0	5.0	3.0	0
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Krasilnikoviella</i>	0	1	5.0	3.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Granulicoccus</i>	0	1	5.0	3.0	0
<i>Sporichthyaceae</i>	<i>Epidermidibacterium</i>	1	0	5.0	3.0	0
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Thermobispora</i>	2	0	5.0	3.0	0
<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Blastococcus</i>	2	8	4.7	3.0	0
<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Pseudactinotalea</i>	1	1	4.0	3.0	0
<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Allobranchiibius</i>	1	0	4.0	3.0	0
<i>Egicoccaceae</i>	<i>Egicoccus</i>	1	0	4.0	3.0	0
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Luteimicrobium</i>	1	0	4.0	3.0	0
<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Mobilicoccus</i>	0	1	3.0	3.0	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Denitrobacterium</i>	1	2	3.0	3.0	0
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Intrasporangium</i>	2	0	3.0	3.0	0
<i>Kineosporiaceae</i>	<i>Pseudokineococcus</i>	0	1	3.0	3.0	0
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Puerhibacterium</i>	0	1	3.0	3.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Aestuariimicrobium</i>	0	1	3.0	3.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Auraticoccus</i>	0	1	3.0	3.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Leifsonia</i>	5	9	4.1	2.9	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Mycetocola</i>	3	3	3.3	2.8	0
<i>Brevibacteriaceae</i>	<i>Brevibacterium</i>	23	34	5.4	2.8	37
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Pseudoclavibacter</i>	1	18	4.2	2.8	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Salinibacterium</i>	6	2	4.6	2.8	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Raoultibacter</i>	2	2	2.8	2.8	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Frigoribacterium</i>	1	22	4.3	2.7	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Eggerthella</i>	12	32	2.8	2.7	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Citricoccus</i>	1	2	8.3	2.7	1
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Arthrobacter</i>	48	114	5.6	2.6	61
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Agrococcus</i>	3	4	4.1	2.6	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Kocuria</i>	14	35	5.4	2.6	2
<i>Ruaniaceae</i>	<i>Ruania</i>	4	0	5.0	2.5	0
<i>Cellulomonadaceae</i>	<i>Actinotalea</i>	1	3	3.5	2.5	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Naasia</i>	0	2	3.5	2.5	0
<i>Ornithinimicrobiaceae</i>	<i>Ornithinimicrobium</i>	6	6	3.3	2.5	1
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propioniciclava</i>	2	0	3.0	2.5	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microbacterium</i>	61	147	3.9	2.5	9
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Agromyces</i>	10	11	3.9	2.4	3
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Gordonibacter</i>	2	5	2.9	2.4	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Glutamicibacter</i>	8	10	5.4	2.4	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Pseudarthrobacter</i>	11	7	5.3	2.4	0
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Isoptericola</i>	2	6	4.3	2.4	1
<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Dermacoccus</i>	2	6	3.8	2.4	11
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Nesterenkonia</i>	2	11	4.2	2.3	4
<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Brachybacterium</i>	10	21	3.7	2.3	0
<i>Dermatophilaceae</i>	<i>Arsenicicoccus</i>	1	3	4.3	2.3	0
<i>Demequinaceae</i>	<i>Demequina</i>	1	21	2.8	2.2	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microcella</i>	3	2	3.6	2.2	0
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Terrabacter</i>	0	5	3.2	2.2	0
<i>Nocardiodaceae</i>	<i>Nocardioides</i>	42	67	4.0	2.2	11
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Micrococcus</i>	18	69	5.8	2.1	64
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinomyces</i>	31	89	2.2	2.1	101
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Cutibacterium</i>	38	78	2.2	2.0	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Paeniglutamicibacter</i>	1	0	6.0	2.0	0

**Table S6. Actinomycetota 門各属における PNTR-BGC 数 (続き)**

Family	Genus	Complete	Scaffold	Ave. all BGC	Ave. PNTR-BGC	NPs
<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Leekyejoonella</i>	0	1	5.0	2.0	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Zafaria</i>	0	1	5.0	2.0	0
<i>Acidothermaceae</i>	<i>Acidothermus</i>	1	0	4.0	2.0	3
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Chryseoglobus</i>	1	0	4.0	2.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Marinisubtilis</i>	0	1	4.0	2.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Enemella</i>	0	1	4.0	2.0	0
<i>Thermoleophilaceae</i>	<i>Thermoleophilum</i>	0	1	4.0	2.0	9
<i>Beutenbergiaceae</i>	<i>Miniimonas</i>	1	0	3.0	2.0	0
<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Calidifontibacter</i>	0	1	3.0	2.0	0
<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Metallococcus</i>	0	1	3.0	2.0	0
<i>Iamiaceae</i>	<i>Iamia</i>	1	0	3.0	2.0	0
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Terracoccus</i>	0	1	3.0	2.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Homoserinibacter</i>	0	1	3.0	2.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Microterricola</i>	1	0	3.0	2.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Yonghaparkia</i>	0	2	3.0	2.0	0
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Paraoerskovia</i>	0	1	3.0	2.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Raineyella</i>	1	1	3.0	2.0	0
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Phycococcus</i>	2	6	2.8	2.0	0
<i>Acidimicrobiaceae</i>	<i>Ferrimicrobium</i>	0	1	2.0	2.0	0
<i>Acidimicrobiaceae</i>	<i>Ferrithrix</i>	0	1	2.0	2.0	0
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Parascardovia</i>	1	1	2.0	2.0	0
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Knoellia</i>	0	2	2.0	2.0	0
<i>Jonesiaceae</i>	<i>Flavimobilis</i>	0	2	2.0	2.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Pontimonas</i>	1	0	2.0	2.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Leucobacter</i>	13	12	3.2	2.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Acidipropionibacterium</i>	12	4	1.9	1.9	0
<i>Kytococcaceae</i>	<i>Kytococcus</i>	3	3	4.0	1.8	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Rothia</i>	17	68	2.1	1.8	3
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Tessaracoccus</i>	9	2	1.8	1.7	0
<i>Jonesiaceae</i>	<i>Sanguibacter</i>	2	4	2.7	1.7	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinobaculum</i>	1	4	1.6	1.6	0
<i>Nocardioidaceae</i>	<i>Mumia</i>	1	1	3.0	1.5	0
<i>Ornithinimicrobiaceae</i>	<i>Serinicoccus</i>	4	4	1.5	1.5	3
<i>Conexibacteraceae</i>	<i>Conexibacter</i>	3	2	3.8	1.4	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Flaviflexus</i>	3	2	1.4	1.4	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Aurantimicrobium</i>	3	0	3.0	1.3	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Protaetiibacter</i>	3	0	3.0	1.3	0
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Janibacter</i>	5	13	2.9	1.3	2
<i>Nocardioidaceae</i>	<i>Aeromicrobium</i>	6	15	3.8	1.3	0
<i>Dermabacteraceae</i>	<i>Dermabacter</i>	3	4	1.3	1.3	0
<i>Nocardioidaceae</i>	<i>Marmoricola</i>	0	8	2.9	1.3	0
<i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Xylanimonas</i>	3	1	2.5	1.3	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Gulosibacter</i>	1	4	2.6	1.2	0
<i>Jonesiaceae</i>	<i>Jonesia</i>	4	1	1.2	1.2	0
<i>Nitriliruptoraceae</i>	<i>Nitriliruptor</i>	0	1	5.0	1.0	0
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Thermocrisum</i>	0	2	4.5	1.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Lacisediminihabitans</i>	0	1	4.0	1.0	0
<i>Acidimicrobiaceae</i>	<i>Acidimicrobium</i>	1	0	2.0	1.0	0
<i>Microbacteriaceae</i>	<i>Rhodoluna</i>	4	0	2.0	1.0	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Specibacter</i>	0	1	2.0	1.0	0
<i>Salsipaludibacteraceae</i>	<i>Salsipaludibacter</i>	0	1	2.0	1.0	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Actinotignum</i>	1	6	1.0	1.0	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Buchananella</i>	0	2	1.0	1.0	0
<i>Beutenbergiaceae</i>	<i>Beutenbergia</i>	1	0	1.0	1.0	0
<i>Intrasporangiaceae</i>	<i>Pedococcus</i>	0	1	1.0	1.0	0
<i>Lawsonellaceae</i>	<i>Lawsonella</i>	2	1	1.0	1.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionicicella</i>	0	1	1.0	1.0	0
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Alloscardovia</i>	0	9	0.8	0.8	0

**Table S6. Actinomycetota 門各属における PNTR-BGC 数 (続き)**

Family	Genus	Complete	Scaffold	Ave. all BGC	Ave. PNTR-BGC	NPs
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionibacterium</i>	20	25	0.8	0.7	37
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Adlercreutzia</i>	3	4	2.4	0.7	0
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Gardnerella</i>	14	47	0.7	0.7	1
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Gleimia</i>	0	3	0.7	0.7	0
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Scardovia</i>	1	2	0.7	0.7	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Arcanobacterium</i>	4	1	0.6	0.6	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Slackia</i>	2	5	0.9	0.6	1
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Bowdeniella</i>	0	2	1.0	0.5	0
<i>Atopobiaceae</i>	<i>Thermophilibacter</i>	1	1	0.5	0.5	0
<i>Bifidobacteriaceae</i>	<i>Bifidobacterium</i>	221	392	0.4	0.4	14
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Boudabousia</i>	1	2	0.3	0.3	0
<i>Atopobiaceae</i>	<i>Olsenella</i>	3	23	0.2	0.2	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Schaalia</i>	9	11	0.2	0.2	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Mobiluncus</i>	3	5	0.1	0.1	0
<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Collinsella</i>	8	137	0.1	0.1	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Trueperella</i>	16	5	0.0	0.0	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Berryella</i>	1	0	1.0	0.0	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Hugonella</i>	0	1	1.0	0.0	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Senegalimassilia</i>	0	2	1.0	0.0	0
<i>Micrococcaceae</i>	<i>Pseudoglutamicibacter</i>	0	1	1.0	0.0	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Nanchangia</i>	1	0	0.0	0.0	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Varibaculum</i>	0	4	0.0	0.0	0
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Winkia</i>	0	3	0.0	0.0	0
<i>Atopobiaceae</i>	<i>Atopobium</i>	1	6	0.0	0.0	0
<i>Atopobiaceae</i>	<i>Fannyhessea</i>	1	2	0.0	0.0	0
<i>Atopobiaceae</i>	<i>Lancefieldella</i>	1	1	0.0	0.0	0
<i>Atopobiaceae</i>	<i>Parafannyhessea</i>	0	1	0.0	0.0	0
<i>Atopobiaceae</i>	<i>Parolsenella</i>	1	1	0.0	0.0	0
<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Coriobacterium</i>	1	0	0.0	0.0	0
<i>Coriobacteriaceae</i>	<i>Enorma</i>	0	3	0.0	0.0	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Cryptobacterium</i>	1	0	0.0	0.0	0
<i>Eggerthellaceae</i>	<i>Phoenicibacter</i>	2	0	0.0	0.0	0
<i>Jonesiaceae</i>	<i>Timonella</i>	0	1	0.0	0.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Propionimicrobium</i>	0	2	0.0	0.0	0
<i>Propionibacteriaceae</i>	<i>Vaginimicrobium</i>	1	0	0.0	0.0	0
<i>Tropherymataceae</i>	<i>Tropheryma</i>	2	11	0.0	0.0	0

**Table S7.** 各科基準株間における 16S rRNA 遺伝子部分塩基配列の相同性

No.	Strain	Similarity of 16S rRNA partial sequence (%)				
		1	2	3	4	5
1	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026 <sup>T</sup> (X92594)	100.00	91.57	90.92	90.28	91.26
2	<i>Nocardia asteroides</i> DSMZ 43757 <sup>T</sup> (AF430019)	91.57	100.00	91.96	90.27	89.19
3	<i>Pseudonocardia thermophila</i> IMSNU 20112 <sup>T</sup> (AJ252830)	90.92	91.96	100.00	89.76	89.62
4	<i>Streptomyces albus</i> DSMZ 40313 <sup>T</sup> (AJ621602)	90.28	90.27	89.75	100.00	90.51
5	<i>Streptosporangium roseum</i> DSM 43021v (X89947)	91.26	89.19	89.61	90.51	100.00

**Table S8.** MSMS スペクトルライブラリに基づいて同定された化合物

R.T. (min)	<i>m/z</i>	Compound
10.46	355.16	Xanthohumol
9.44	355.16	Xanthohumol
6.30	652.40	Peptide: Val-Leu-Pro-Val-Pro
7.17	535.15	Apigenin
6.34	595.17	Vicenin 2
6.17	595.17	Vicenin 2
9.89	498.29	Taurocholic acid
7.08	565.15	Isoschaftoside
6.71	565.16	Isoschaftoside
7.24	447.12	Swertisin
7.55	983.57	Suzukacillin B
5.01	384.11	Succinoadenosine
4.30	341.22	Peptide: Pro-Pro-Lys
2.28	341.22	Peptide: Pro-Pro-Lys
6.23	342.24	Peptide: Ile-Pro-Ile
6.49	565.16	Isoschaftoside
6.61	565.16	Isoschaftoside
4.35	464.08	Adenylosuccinic acid
4.50	464.08	Adenylosuccinic acid
6.92	565.16	Isoschaftoside
11.72	482.32	Phosphatidylethanolamine (18:0/0:0)
11.52	468.31	Phosphatidylethanolamine (17:0/0:0)
11.58	468.31	Phosphatidylethanolamine (17:0/0:0)
11.36	476.28	1-Palmitoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
11.37	907.57	1-Hexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
6.99	303.05	Quercetin
7.32	303.05	Quercetin
7.47	271.06	Genistein
7.43	1025.56	Peptide: Pro-Pro-Gln-Val-Val-Val
9.40	271.06	Genistein
7.67	255.07	Daidzein
6.55	255.06	Daidzein
8.13	255.06	Daidzein
8.08	255.06	Daidzein
7.11	271.06	Daidzein
8.22	285.08	Glycitein
9.67	285.07	Prunetin
11.71	639.59	Ornithine lipid (33:0)
9.13	269.08	4'-Hydroxy-6-methoxyflavone
12.12	411.32	Ergosterol peroxide
6.91	743.20	3-(2 <i>R</i> -apiosylrutinoside)-quercetin
6.98	743.21	3-(2 <i>R</i> -apiosylrutinoside)-quercetin
7.34	503.12	6''-O-Malonyldaidzin
7.76	489.14	6''-O-Malonyldaidzin
6.28	438.24	Dicoumaroyl Spermidine
10.49	959.52	Soyasaponin B1a
10.40	959.52	Soyasaponin B1a
8.06	475.12	6''-O-Acetylgenistin
7.62	459.13	6''-O-Acetyldaidzin
7.20	433.11	Isovitexin
8.90	331.08	Tricin
6.71	447.13	Glycitin
6.62	447.13	Glycitin
6.13	433.11	Genistin
7.03	433.11	Genistin
6.50	417.12	Daidzin
6.58	417.12	Daidzin

**Table S8.** MSMS スペクトルライブラリに基づいて同定された化合物 (続き)

R.T. (min)	<i>m/z</i>	Compound
7.15	565.16	Ambocin
9.85	462.27	Taurocholic acid
9.84	480.27	Taurocholic acid
10.61	462.27	Taurocholic acid
6.69	684.39	Laxaphycin
6.60	684.40	Laxaphycin
11.34	480.28	Taurocholic acid
11.34	462.27	Taurocholic acid
10.68	423.36	Glochidone
10.60	423.36	Glochidone
11.60	510.36	Phosphatidyl choline (17:0/0:0)
11.52	510.35	Phosphatidyl choline (17:0/0:0)
11.29	494.32	Phosphatidyl choline (16:1/0:0)
11.61	522.35	Phosphatidyl choline (0:0/18:1)
6.68	499.24	Arthrobactin
9.82	411.33	<i>N</i> 2-[(9 <i>Z</i> )-1-Oxo-9-octadecen-1-yl]-L-arginine
9.05	357.28	<i>N</i> -Lauroyl-L-arginine
6.62	595.17	Vicenin 2
11.41	496.34	Phosphatidyl choline (0:0/16:1)
11.16	482.32	1-pentadecanoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine
4.83	367.15	1- $\beta$ -D-Glucopyranosyl-L-tryptophan
8.59	301.07	4,6-Dihydroxy-2-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methylene]-3(2 <i>H</i> )-benzofuranone
8.19	301.07	4,6-Dihydroxy-2-[(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)methylene]-3(2 <i>H</i> )-benzofuranone
10.58	965.51	Soyasaponin I
10.63	943.51	Soyasaponin I
10.59	943.53	Soyasaponin I

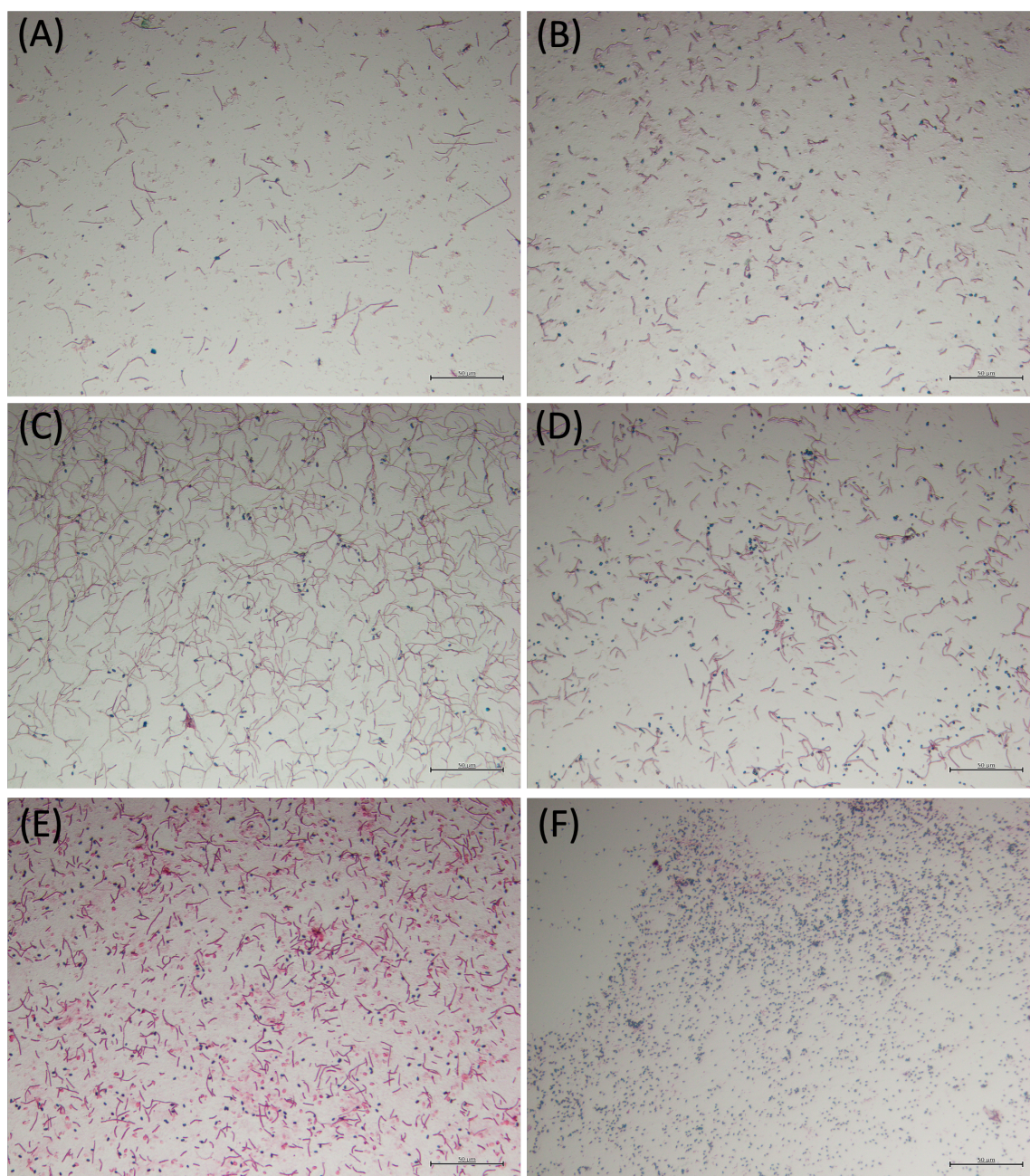


**Table S9.** Lentindole (**8**) の物理化学的性状

Lentindole ( <b>8</b> )	
Appearance	Pale-yellow powder
Molecular formula	C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S
Molecular weight	492
HR-ESI-MS ( <i>m/z</i> )	
Calcd.	493.2479 [M + H] <sup>+</sup>
Found	493.2468 [M + H] <sup>+</sup>
[α] <sub>D</sub> <sup>22</sup> (MeOH)	−10.7°
UV λ <sub>MeOH</sub> nm (ε)	240 (8572), 294 (2709)
IR ν (cm <sup>−1</sup> )	3296, 2958, 2340, 2361, 2641, 1535, 1461
Solubility	
Soluble	DMSO, MeOH, CHCl <sub>3</sub>
Slightly soluble	H <sub>2</sub> O

**Table S10.** 新規二次代謝産物探索に用いた *Pseudonocardiaceae* 菌株

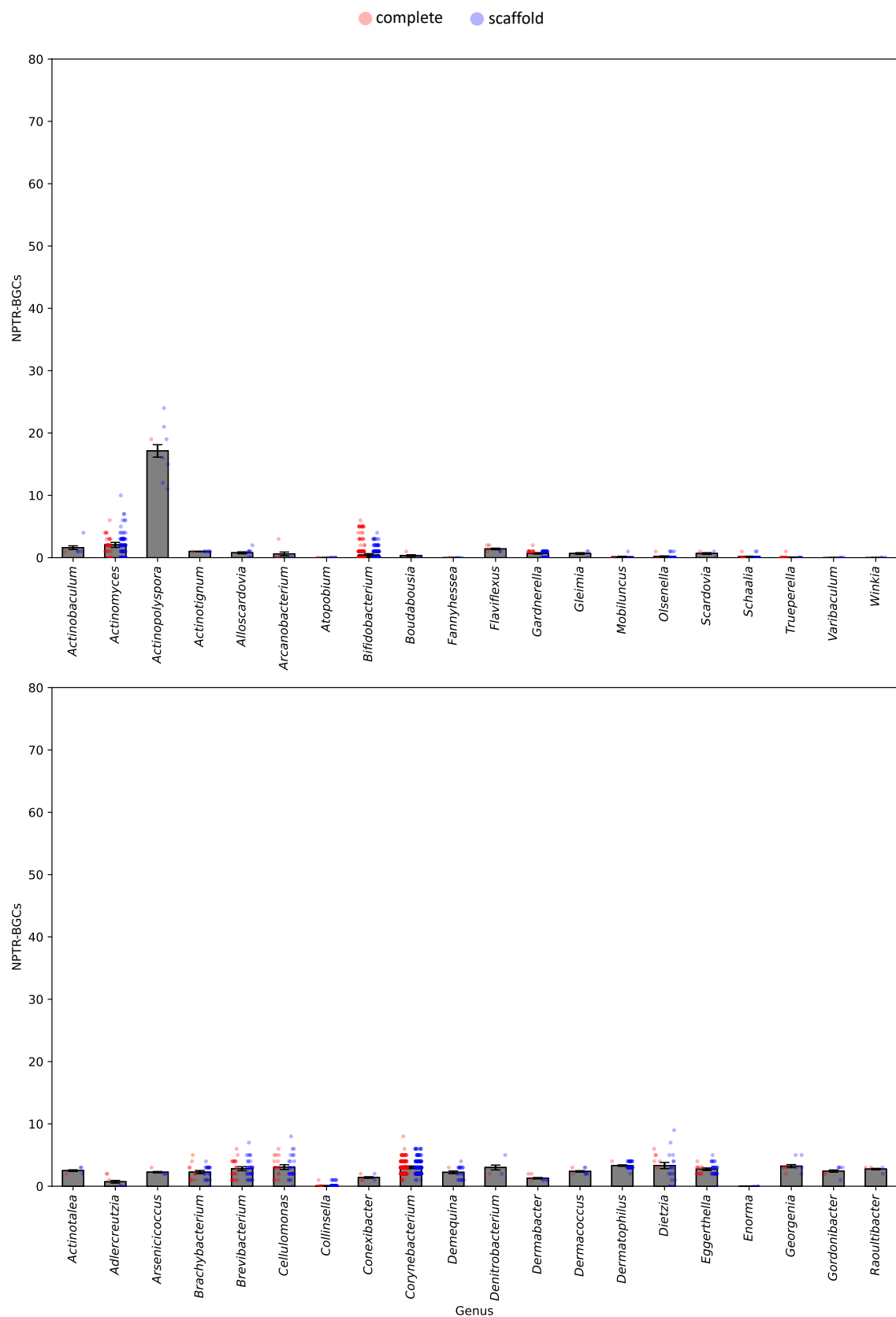
菌株	分離土壌採取地	分離土壌の特徴
<i>Kibdelosporangium</i> sp. OK19-0223	渡名喜島	<i>Diospyros ferrea</i> Bakhauizen var. <i>buxifolia</i> Bakh の根元から採取された
<i>Lentzea</i> sp. OK19-0192	渡名喜島	<i>Diospyros ferrea</i> Bakhauizen var. <i>buxifolia</i> Bakh の根元から採取された
<i>Saccharopolyspora</i> sp. KR21-0001	オーハ島	マツ属樹木の根元から採取された
<i>Saccharopolyspora</i> sp. OK19-0061	南大東島	マツ属樹木の根元から採取された
<i>Saccharopolyspora</i> sp. OK20-0167	野甫島	マツ属樹木の根元から採取された
<i>Saccharothrix</i> sp. KR21-0069	野甫島	<i>Ficus microcarpa</i> の根元から採取された
<i>Saccharothrix</i> sp. OK19-0020	南大東島	<i>Asplenium antiquum</i> Makino の根元から採取された
<i>Saccharothrix</i> sp. OK19-0052	南大東島	マツ属樹木の根元から採取された



**Fig. S1.** 芽胞染色の顕微鏡写真

bar: 50 µm、赤色: 栄養細胞、青 紺色: 芽胞もしくは死細胞

(A) *Tumebacillus avium* JCM 32188<sup>T</sup>、(B) *Tumebacillus flagellatus* DSM 25748<sup>T</sup>、(C) *Tumebacillus ginsengisoli* DSM 18389<sup>T</sup>、(D) *Tumebacillus luteolus* JCM 19866<sup>T</sup>、(E) *Tumebacillus permanentifrigoris* JCM 14557<sup>T</sup>、(F) *Bacillus subtilis* ATCC 6633

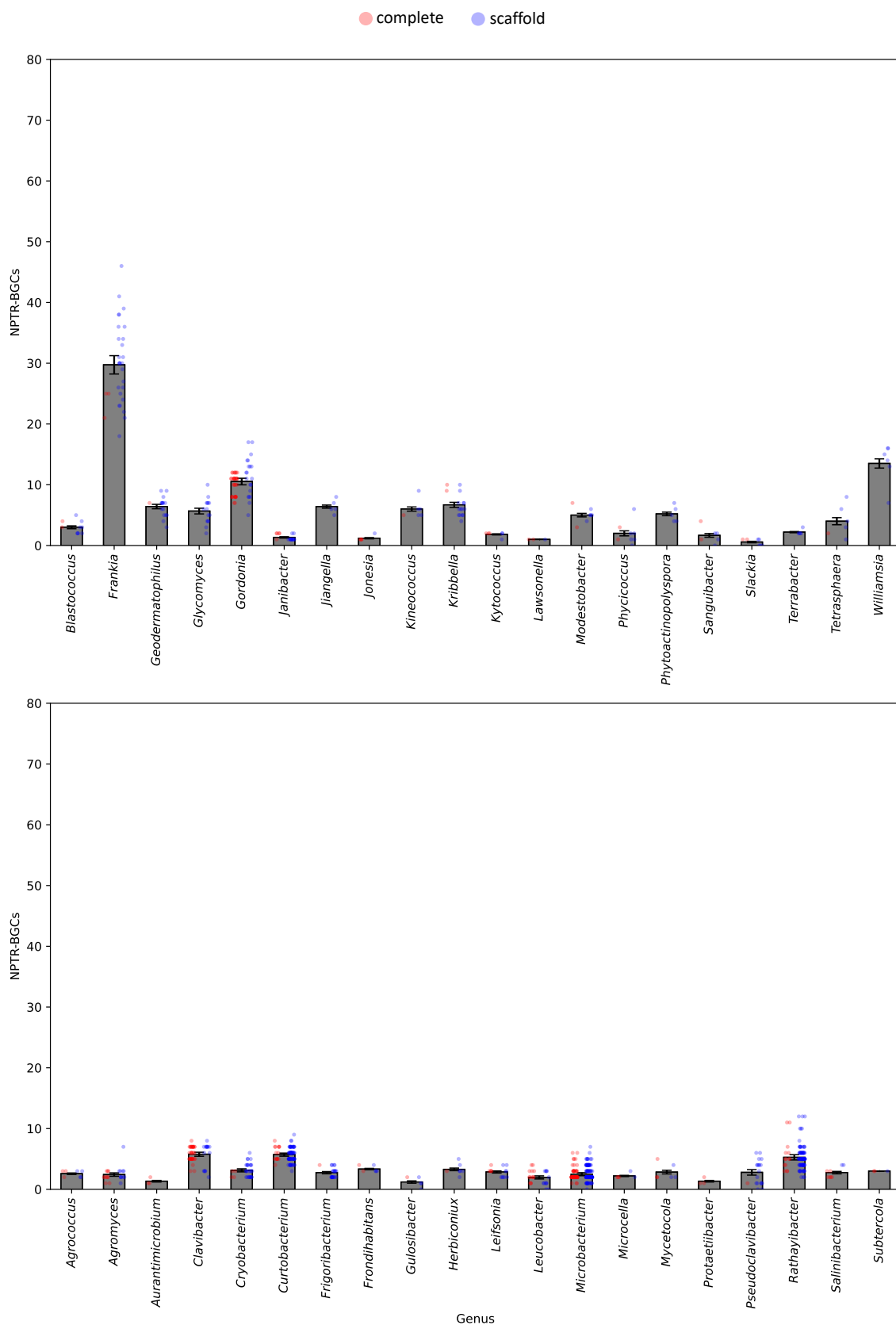


**Fig. S2. Actinomycetota 門各属における PNTR-BGC の数 (1)**

棒グラフ: PNTR-BGC の平均数、エラーバー: PNTR-BGC 数の標準誤差。

点はゲノムデータ毎の値を示しており、赤色: complete ゲノム、青色: scaffold ゲノムを表す。

データ数が 3 以上の属についてのみ示した。

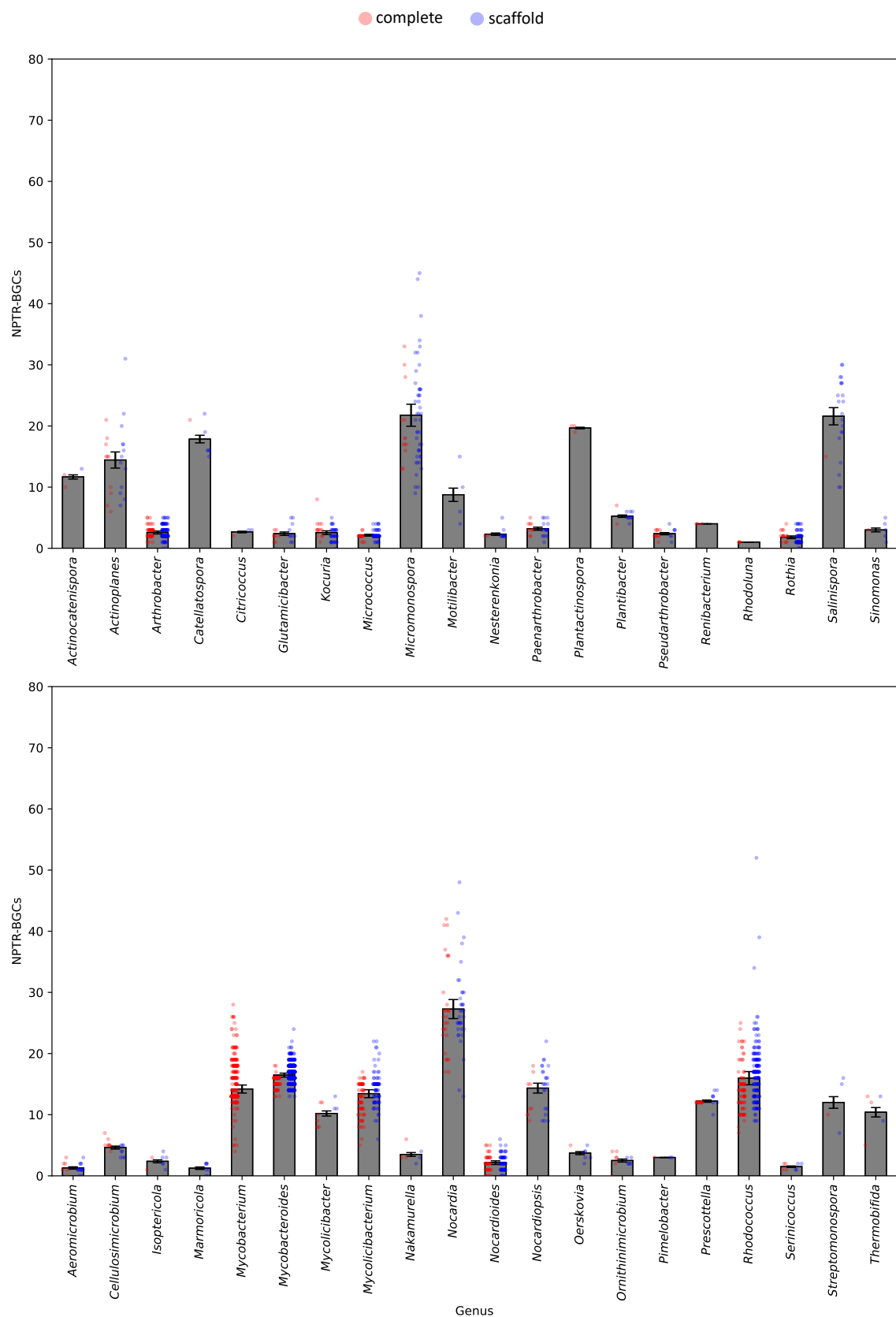


**Fig. S3. Actinomycetota 門各属における PNTR-BGC の数 (2)**

棒グラフ: PNTR-BGC の平均数、エラーバー: PNTR-BGC 数の標準誤差。

点はゲノムデータ毎の値を示しており、赤色: complete ゲノム、青色: scaffold ゲノムを表す。

データ数が 3 以上の属についてのみ示した。

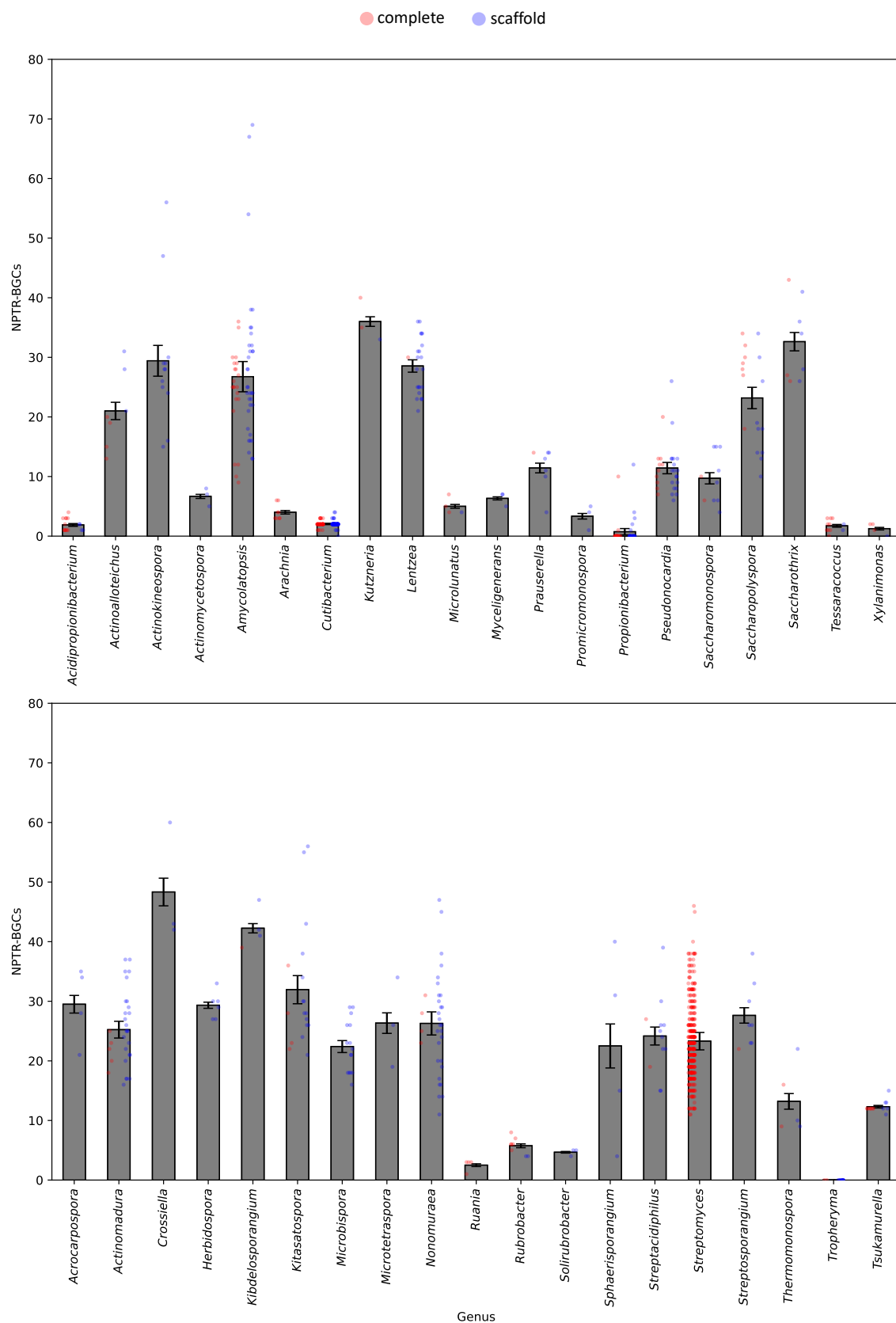


**Fig. S4. Actinomycetota 門各属における PNTR-BGC の数 (3)**

棒グラフ: PNTR-BGC の平均数、エラーバー: PNTR-BGC 数の標準誤差。

点はゲノムデータ毎の値を示しており、赤色: complete ゲノム、青色: scaffold ゲノムを表す。

データ数が 3 以上の属についてのみ示した。



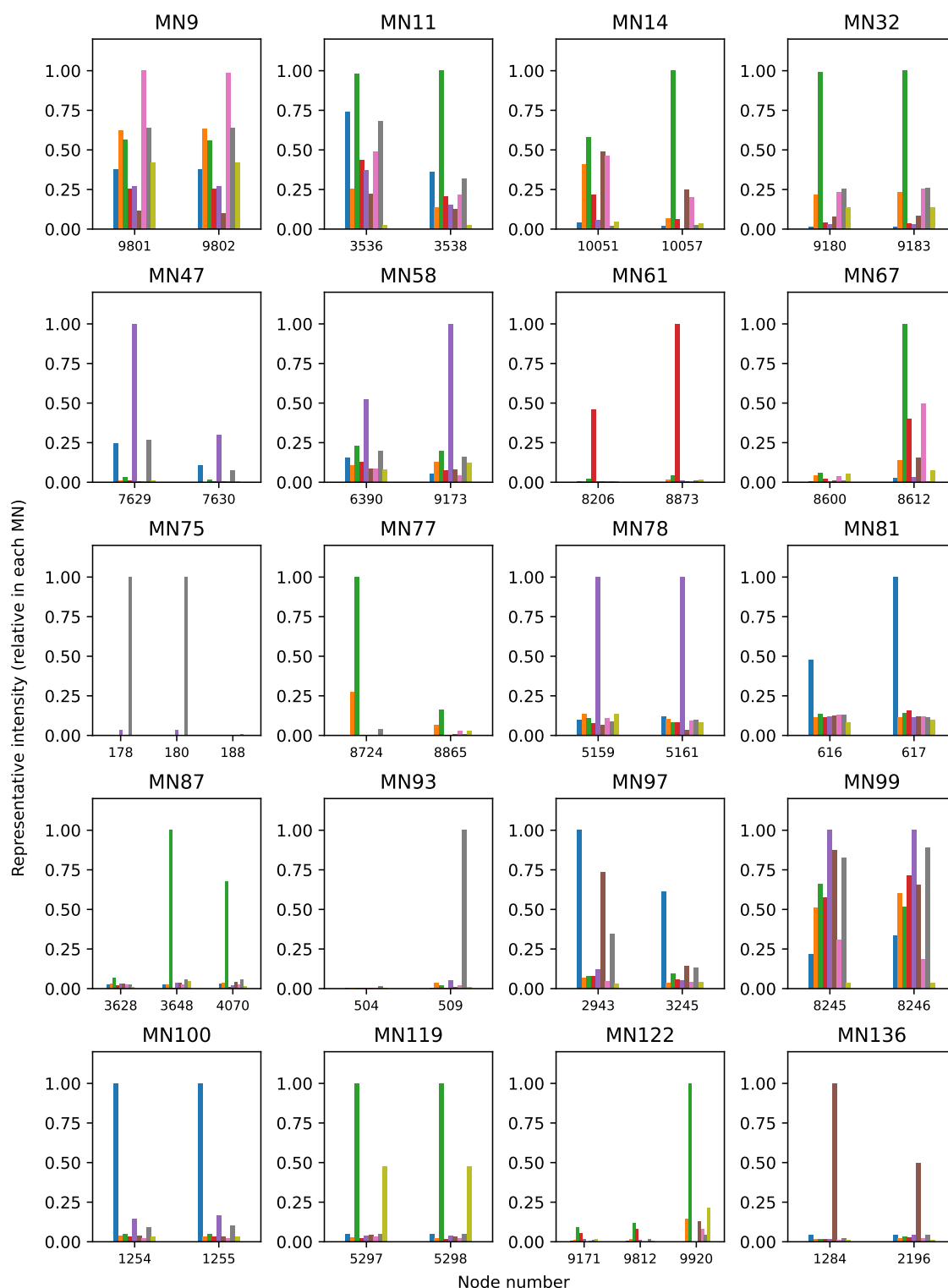
**Fig. S5. Actinomycetota 門各属における PNTR-BGC の数 (4)**

棒グラフ: PNTR-BGC の平均数、エラーバー: PNTR-BGC 数の標準誤差。

点はゲノムデータ毎の値を示しており、赤色: complete ゲノム、青色: scaffold ゲノムを表す。

データ数が 3 以上の属についてのみ示した。

■ KR21-0001 ■ KR21-0069 ■ OK19-0020 ■ OK19-0052  
■ OK19-0061 ■ OK19-0192 ■ OK19-0223 ■ OK20-0167 ■ Medium

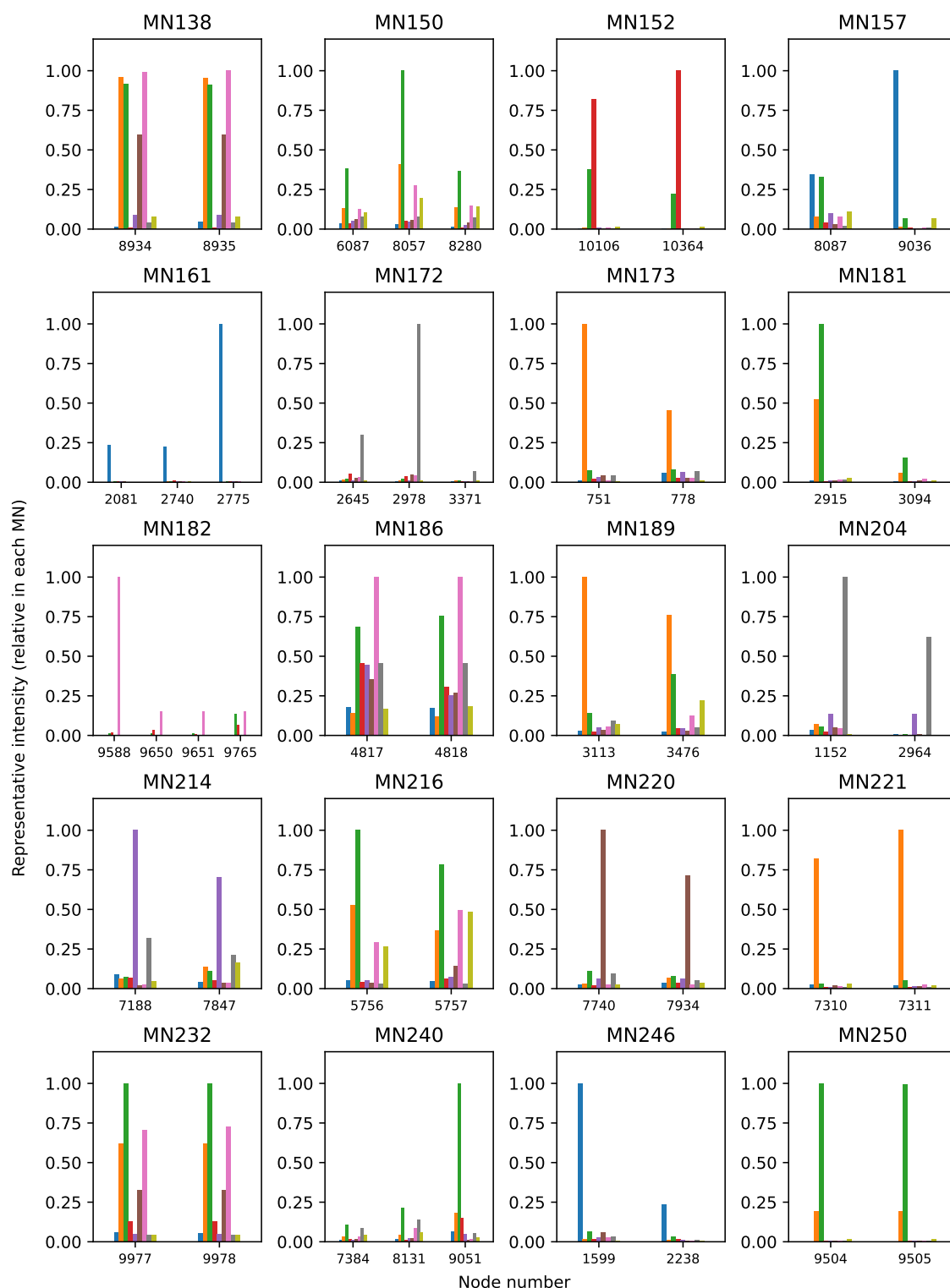


**Fig. S6.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク (UMN) における各化合物の Rep-int 相対値 (1)

ここでは、分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN のみを記載した。また、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 として算出した。

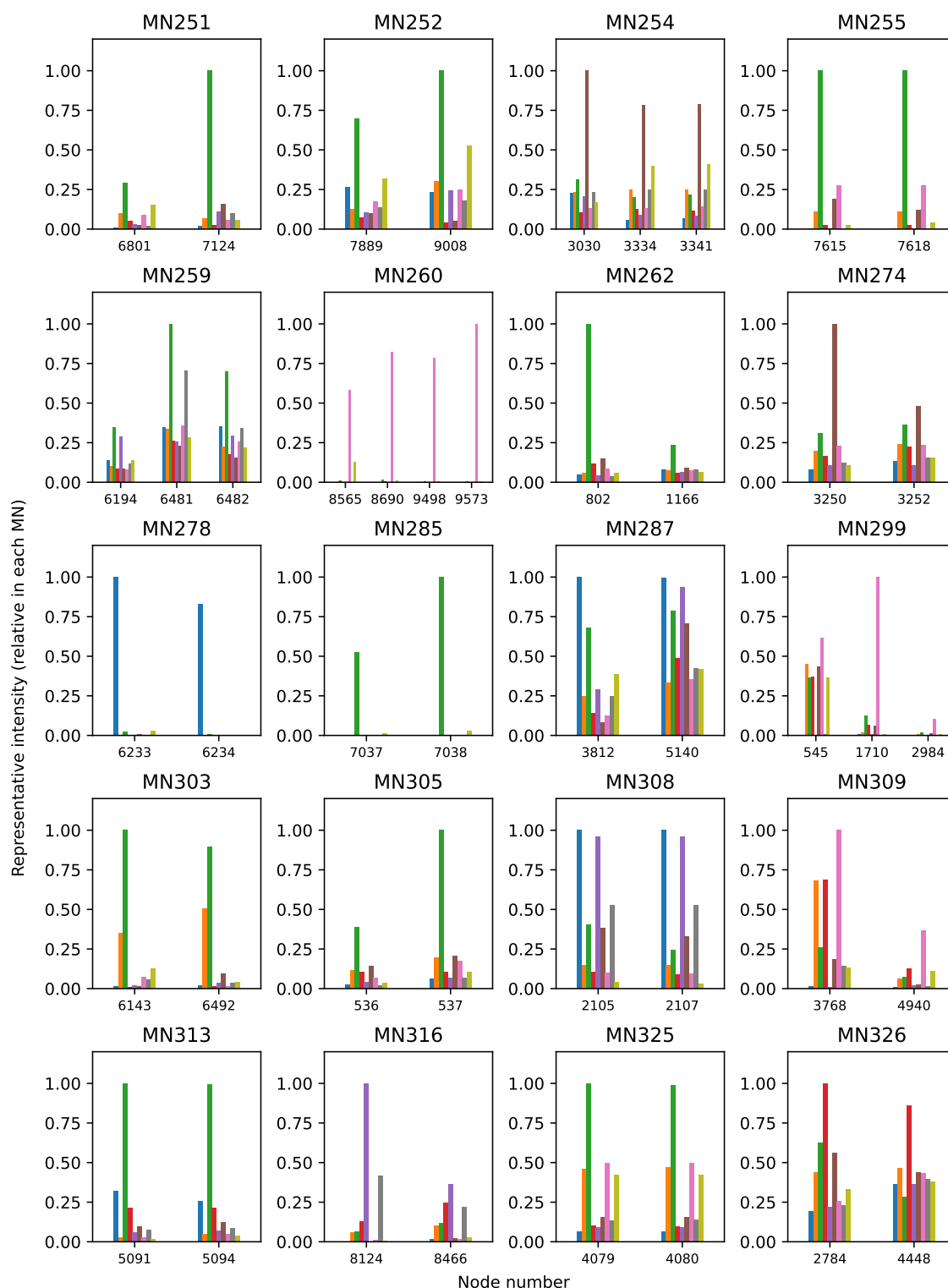


■ KR21-0001 ■ KR21-0069 ■ OK19-0020 ■ OK19-0052  
■ OK19-0061 ■ OK19-0192 ■ OK19-0223 ■ OK20-0167 ■ Medium



**Fig. S7.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク (UMN) における各化合物の Rep-int 相対値 (2)  
 ここでは、分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN のみを記載した。また、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 として算出した。

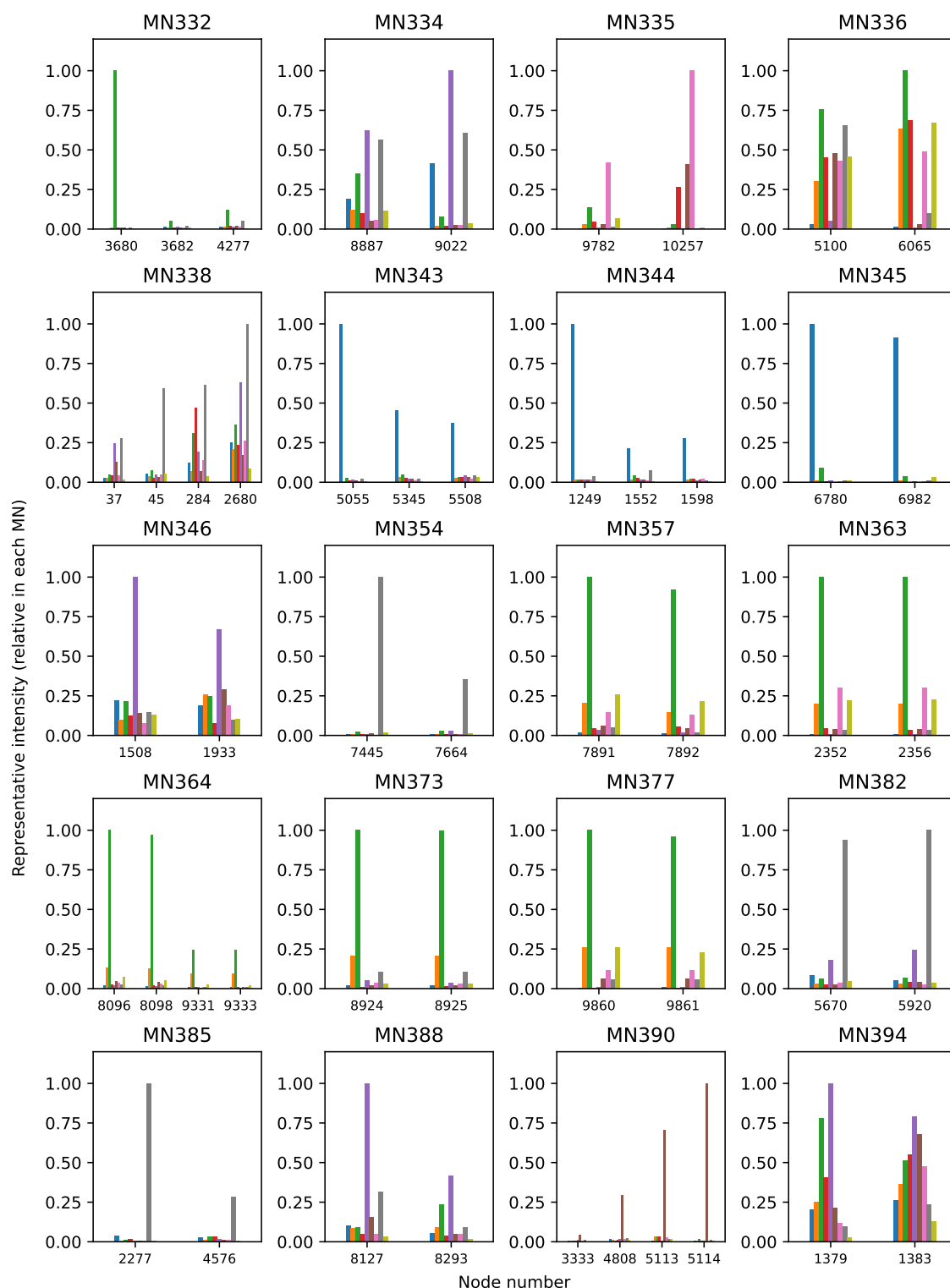
■ KR21-0001 ■ KR21-0069 ■ OK19-0020 ■ OK19-0052  
■ OK19-0061 ■ OK19-0192 ■ OK19-0223 ■ OK20-0167 ■ Medium



**Fig. S8.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク (UMN) における各化合物の Rep-int 相対値 (3)

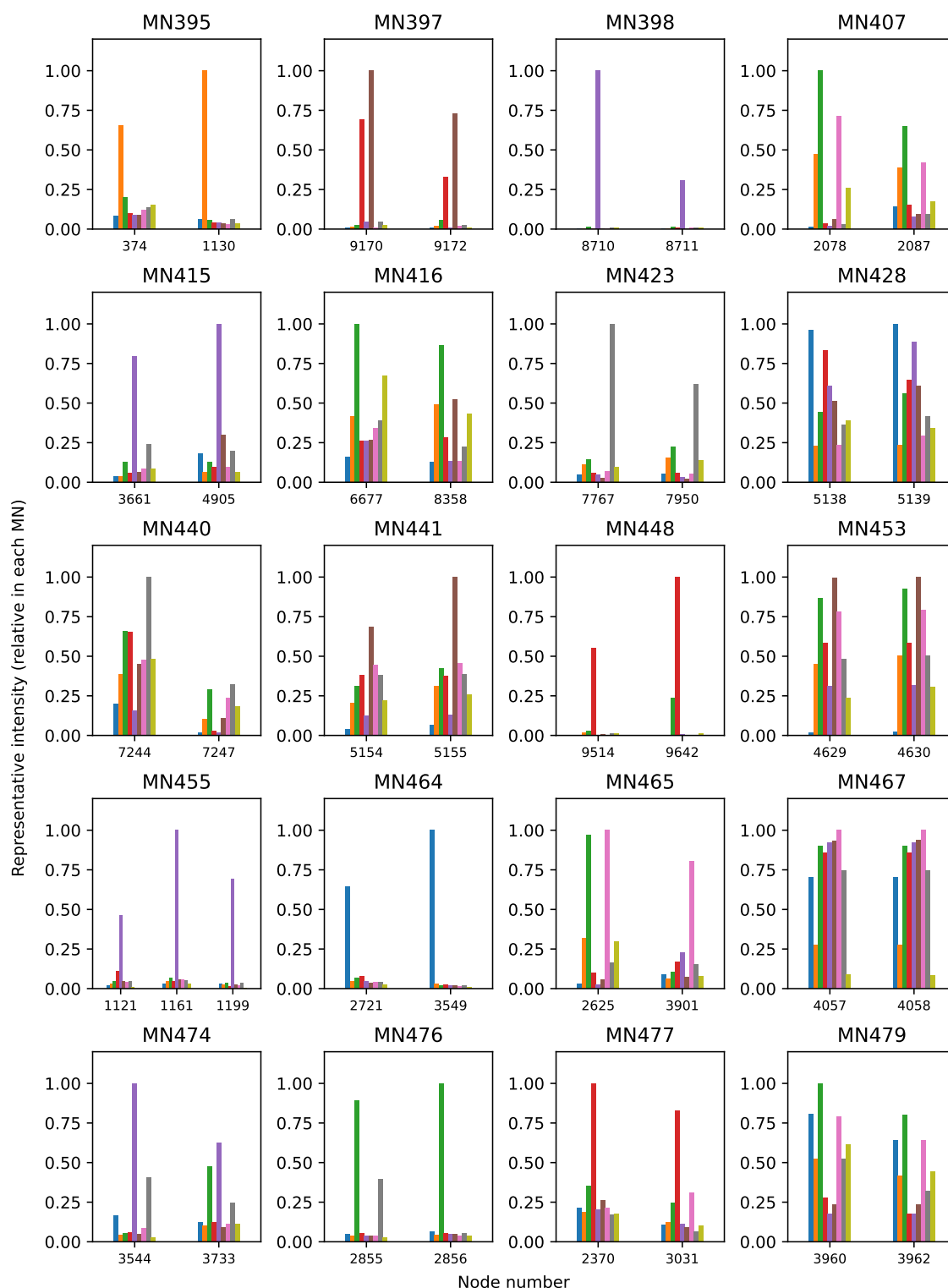
ここでは、分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN のみを記載した。また、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 として算出した。

■ KR21-0001 ■ KR21-0069 ■ OK19-0020 ■ OK19-0052  
■ OK19-0061 ■ OK19-0192 ■ OK19-0223 ■ OK20-0167 ■ Medium



**Fig. S9.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク (UMN) における各化合物の Rep-int 相対値 (4)  
 ここでは、分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN のみを記載した。また、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 として算出した。

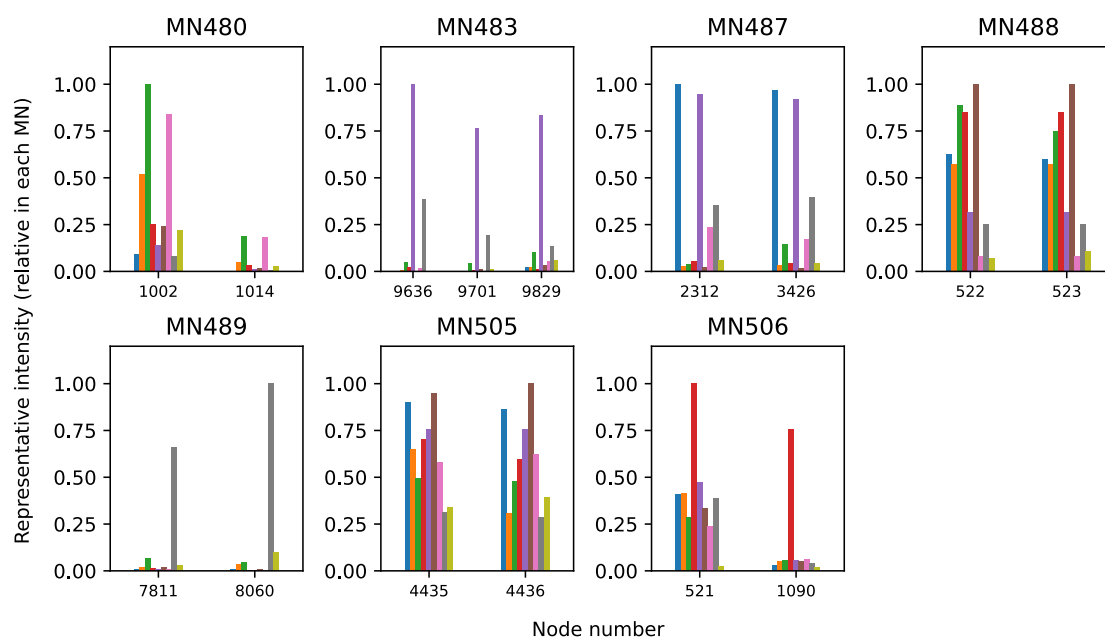
■ KR21-0001 ■ KR21-0069 ■ OK19-0020 ■ OK19-0052  
■ OK19-0061 ■ OK19-0192 ■ OK19-0223 ■ OK20-0167 ■ Medium



**Fig. S10.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク (UMN) における各化合物の Rep-int 相対値 (5)

ここでは、分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN のみを記載した。また、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 とし算出した。

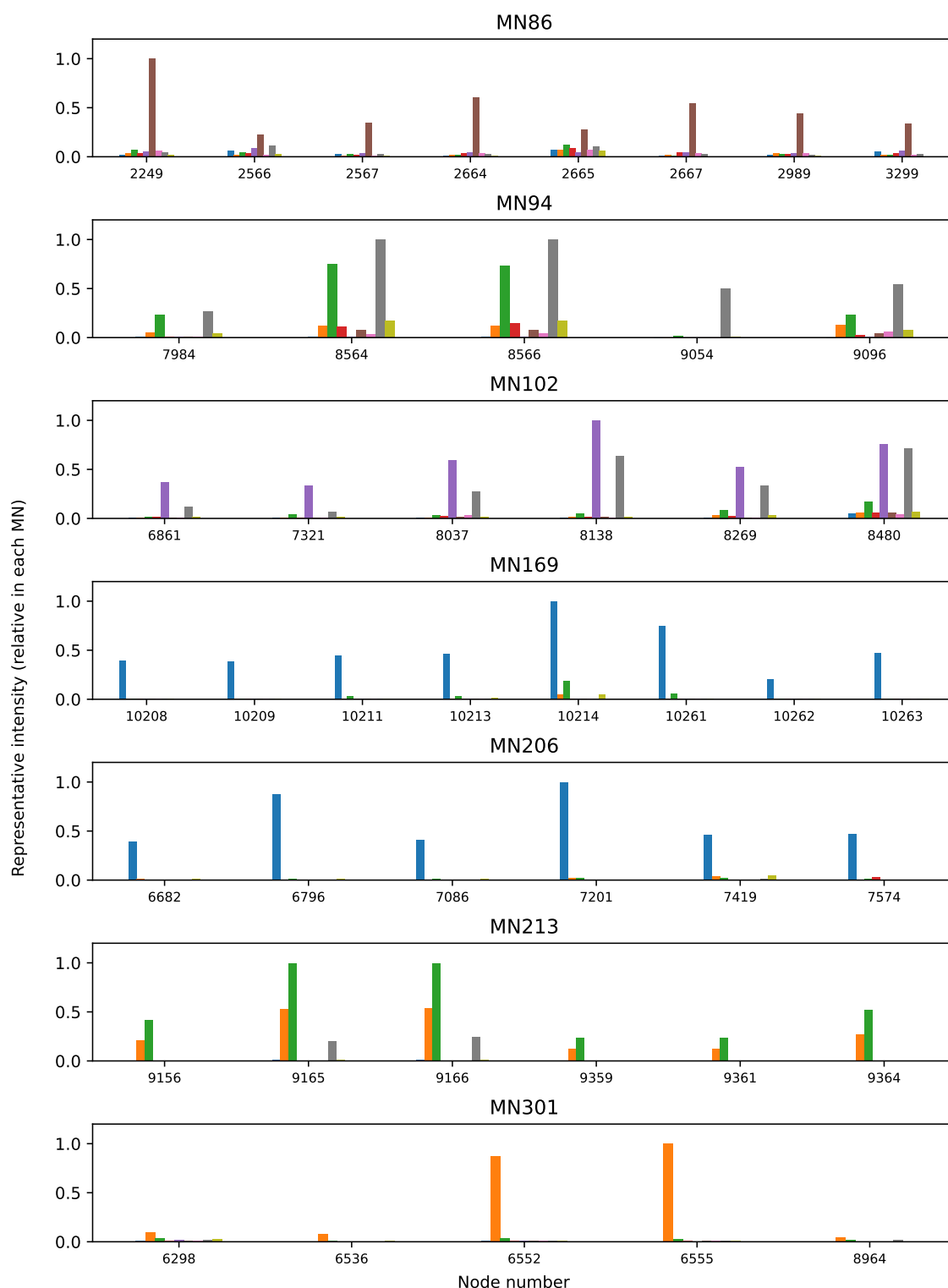
■ KR21-0001 ■ KR21-0069 ■ OK19-0020 ■ OK19-0052  
■ OK19-0061 ■ OK19-0192 ■ OK19-0223 ■ OK20-0167 ■ Medium



**Fig. S11.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク (UMN) における各化合物の Rep-int 相対値 (6)

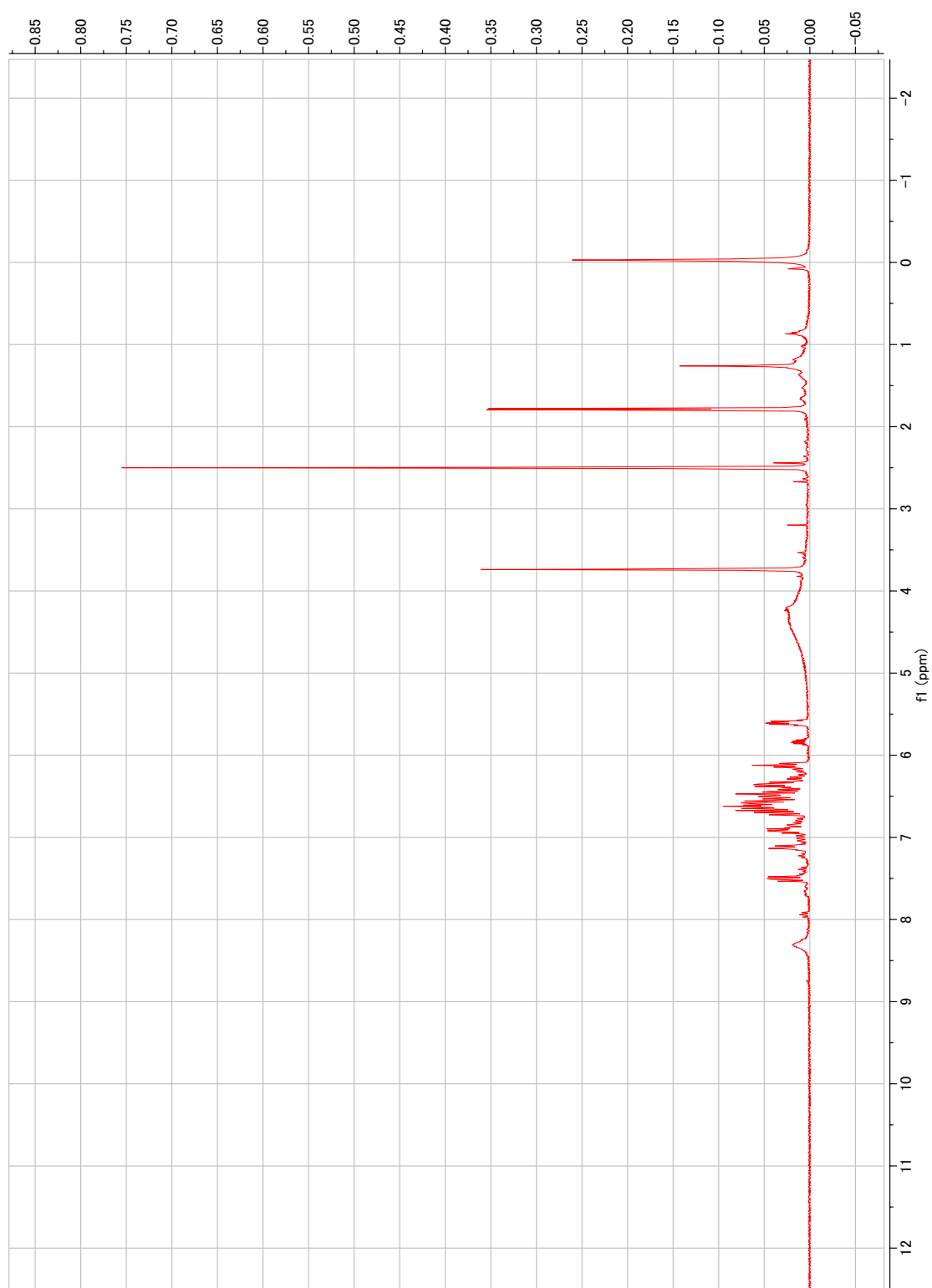
ここでは、分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN のみを記載した。また、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 として算出した。

■ KR21-0001 ■ KR21-0069 ■ OK19-0020 ■ OK19-0052  
■ OK19-0061 ■ OK19-0192 ■ OK19-0223 ■ OK20-0167 ■ Medium

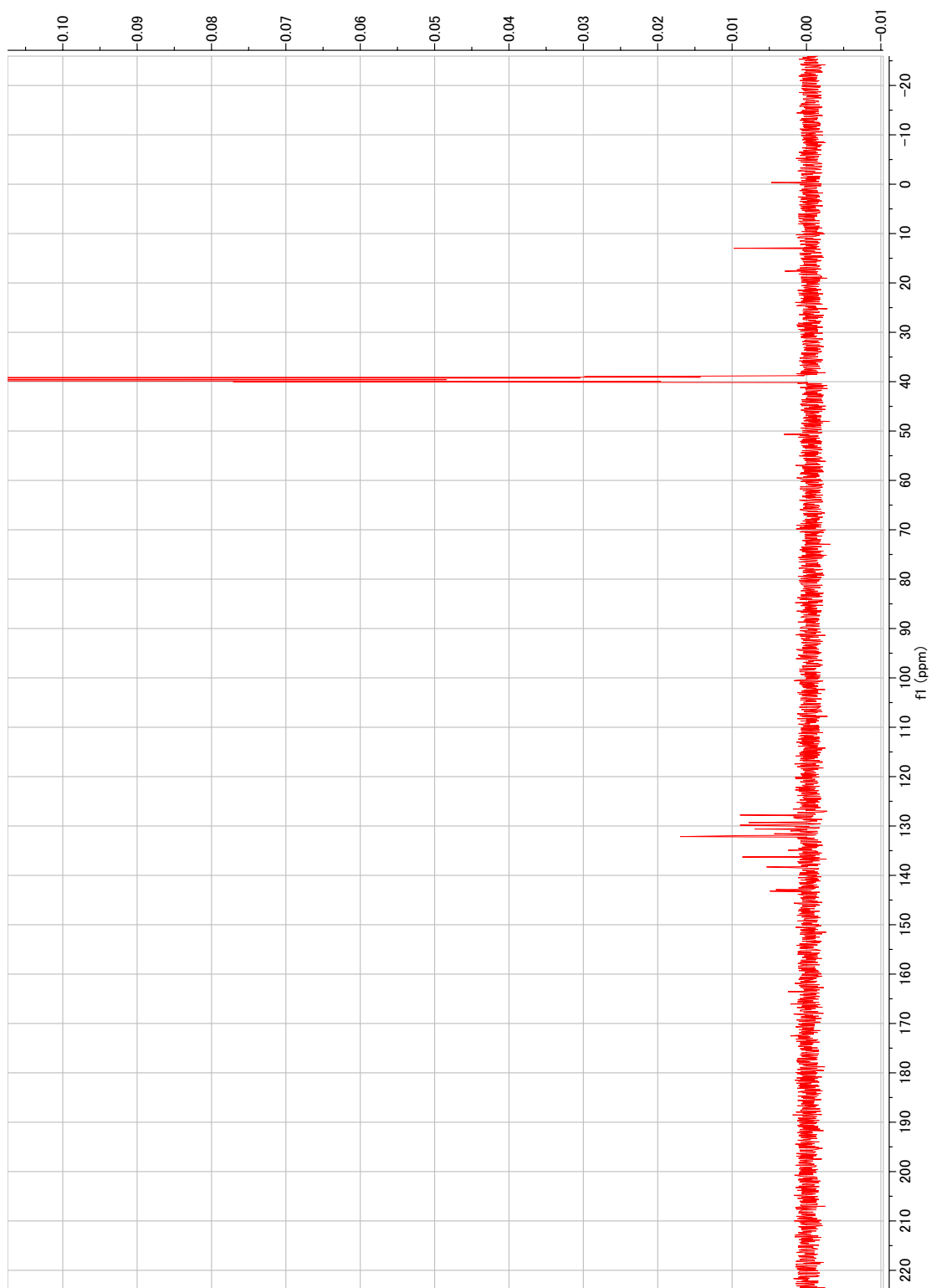


**Fig. S12.** *Pseudonocardiaceae* 科菌株のサンプルから見出された未知代謝産物分子ネットワーク (UMN) における各化合物の Rep-int 相対値 (6)

ここでは、分子ネットワークに含まれる各化合物の rep-strain が解析した菌株のいずれか 1 株のみになる UMN のみを記載した。また、同一分子ネットワーク中の最大の Rep-int を 1 として算出した。

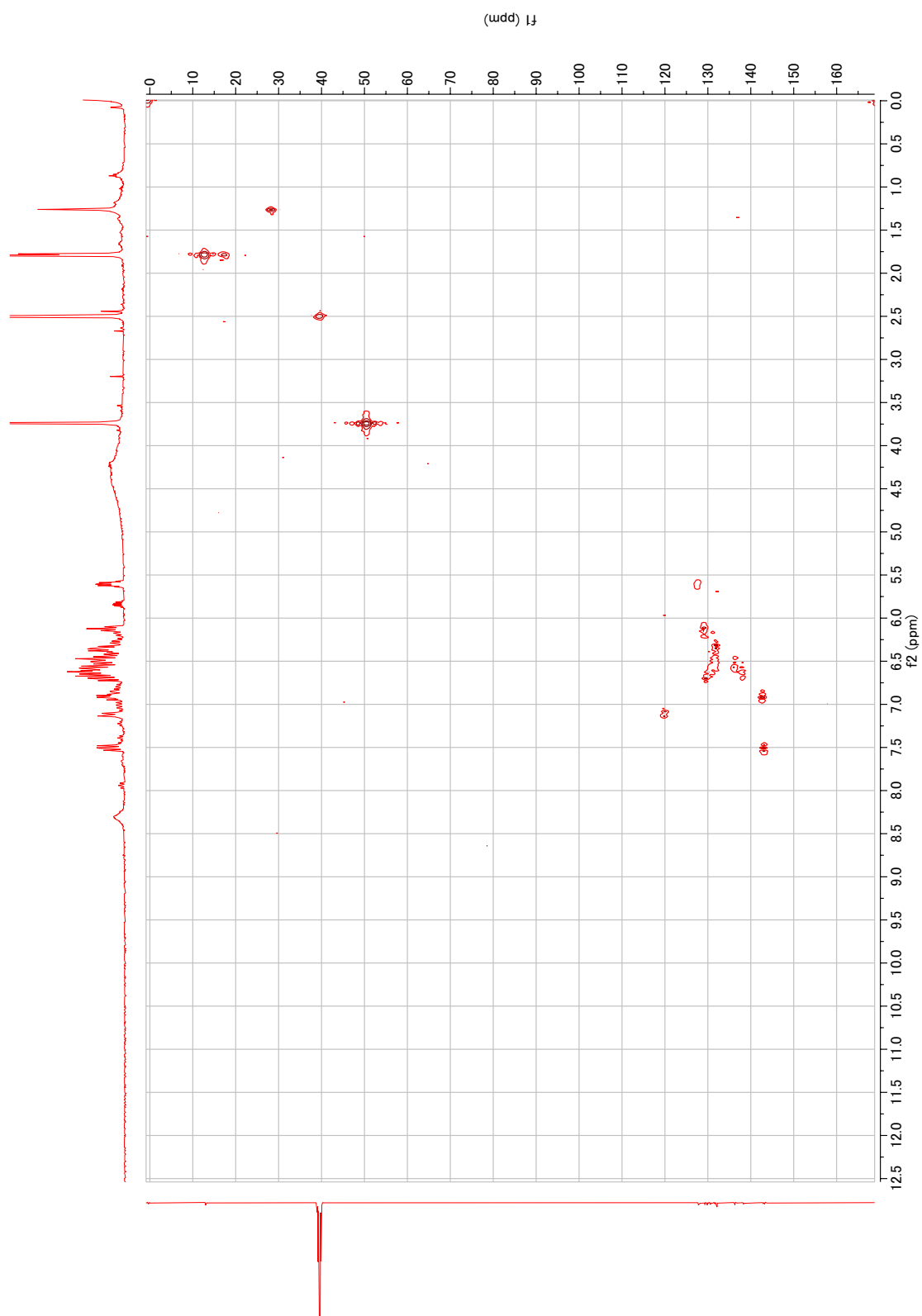


**Fig. S13.** Tumbacin (**1**) の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)

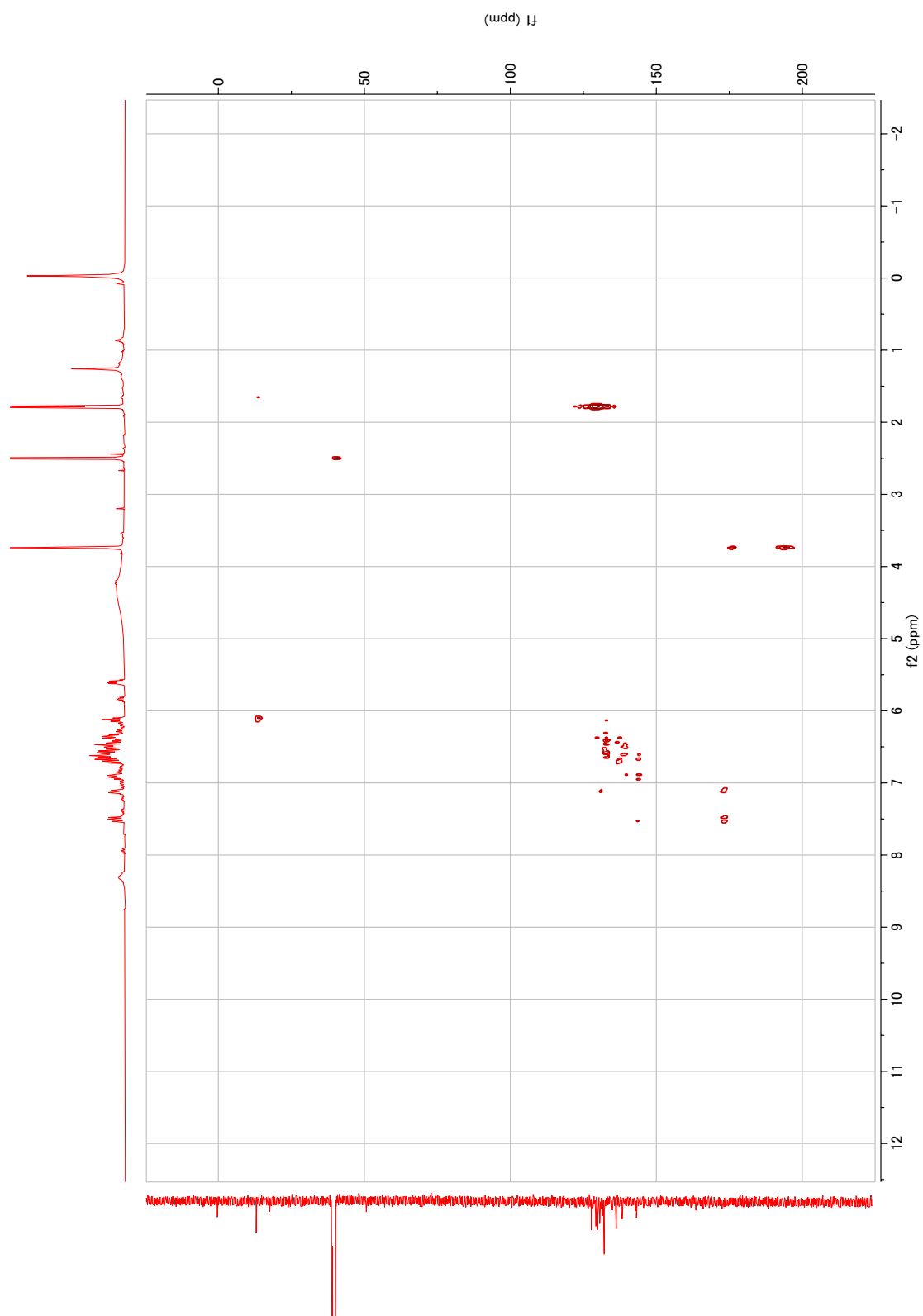


**Fig. S14.** Tumbacin (**1**) の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル ( $\text{DMSO}-d_6$ , 125 MHz)

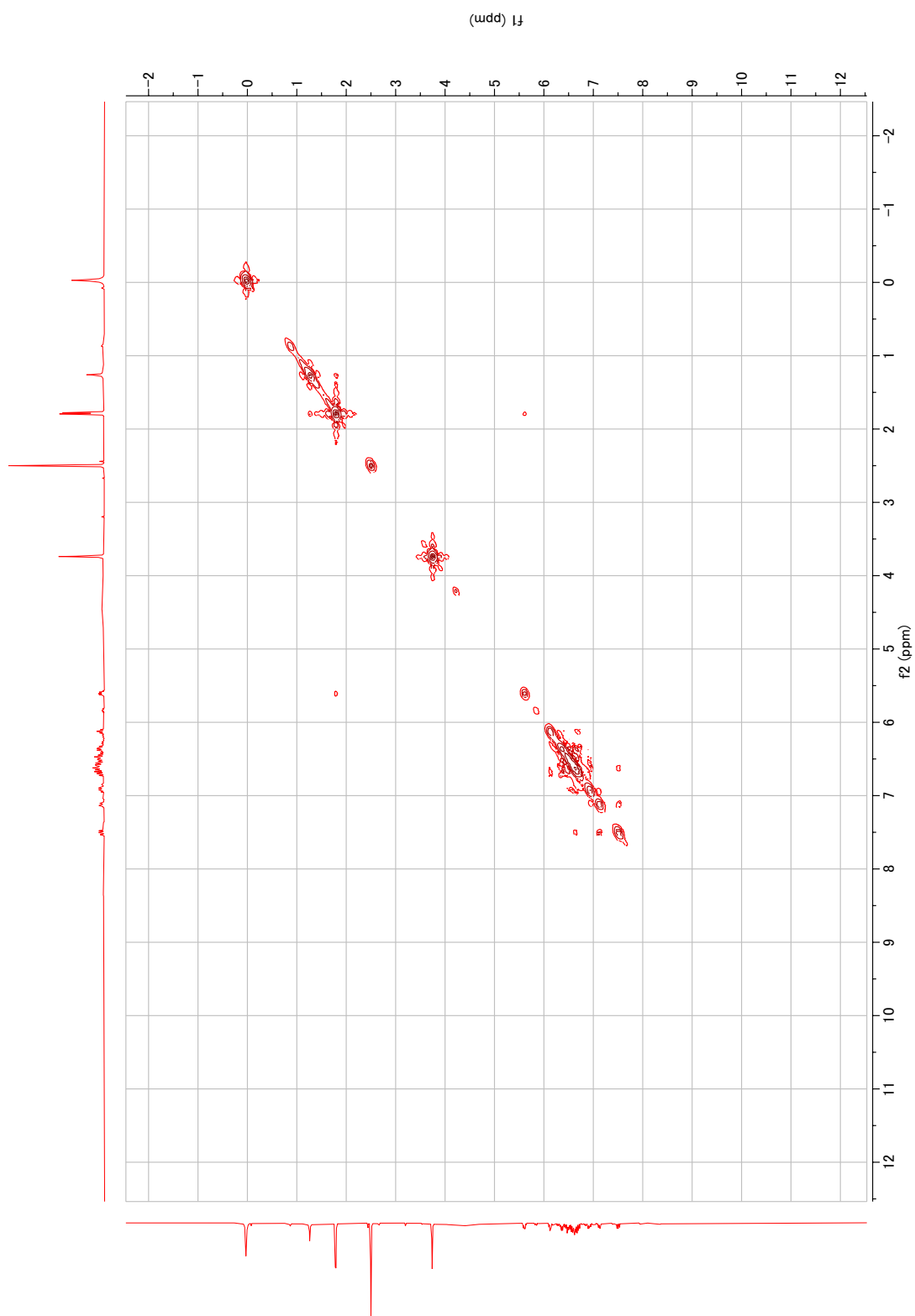




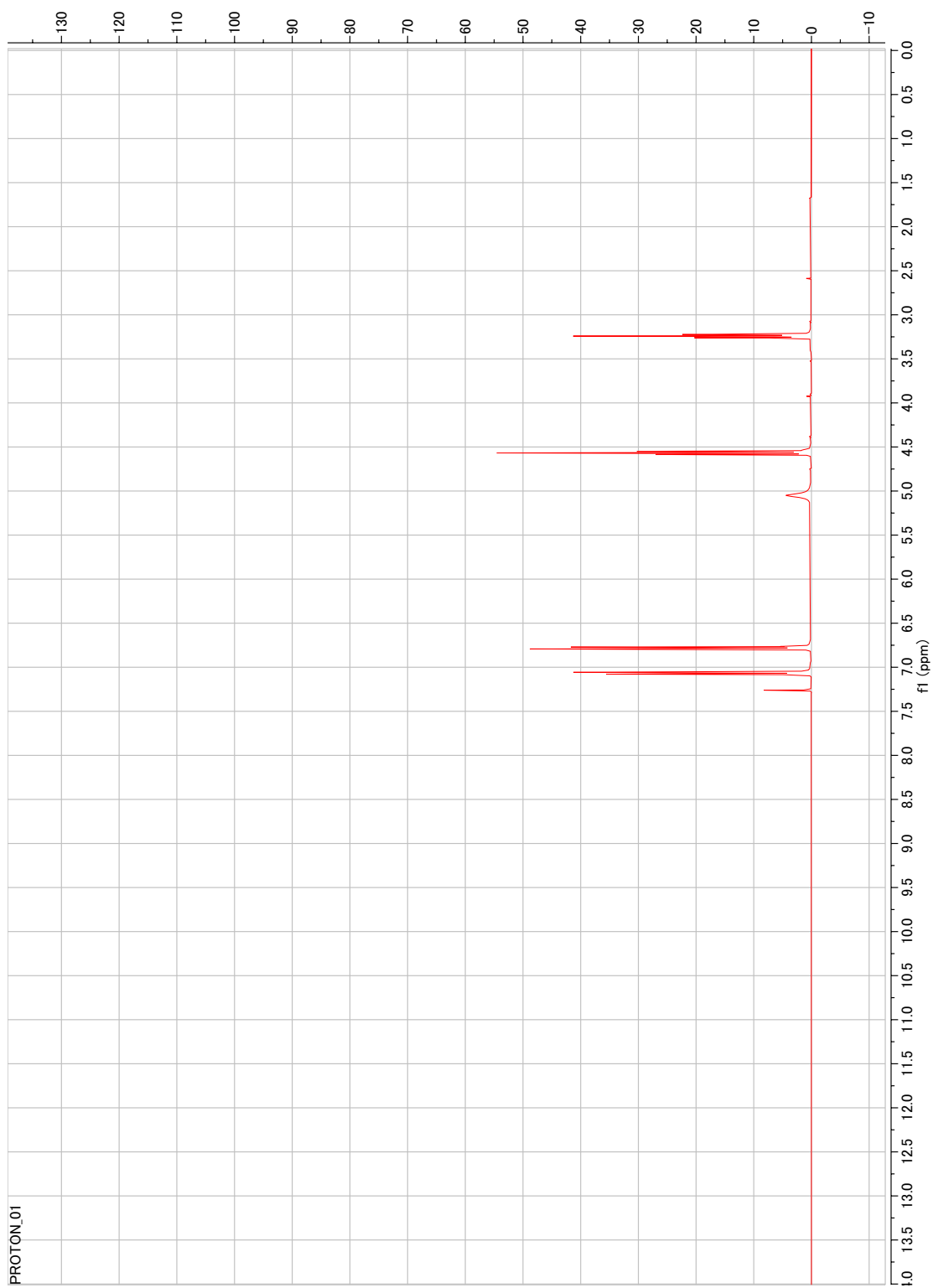
**Fig. S15.** Tumebacin (**1**) の HMQC スペクトル (DMSO- $d_6$ 、 $^1\text{H}$ : 500 MHz、 $^{13}\text{C}$ : 125 MHz)



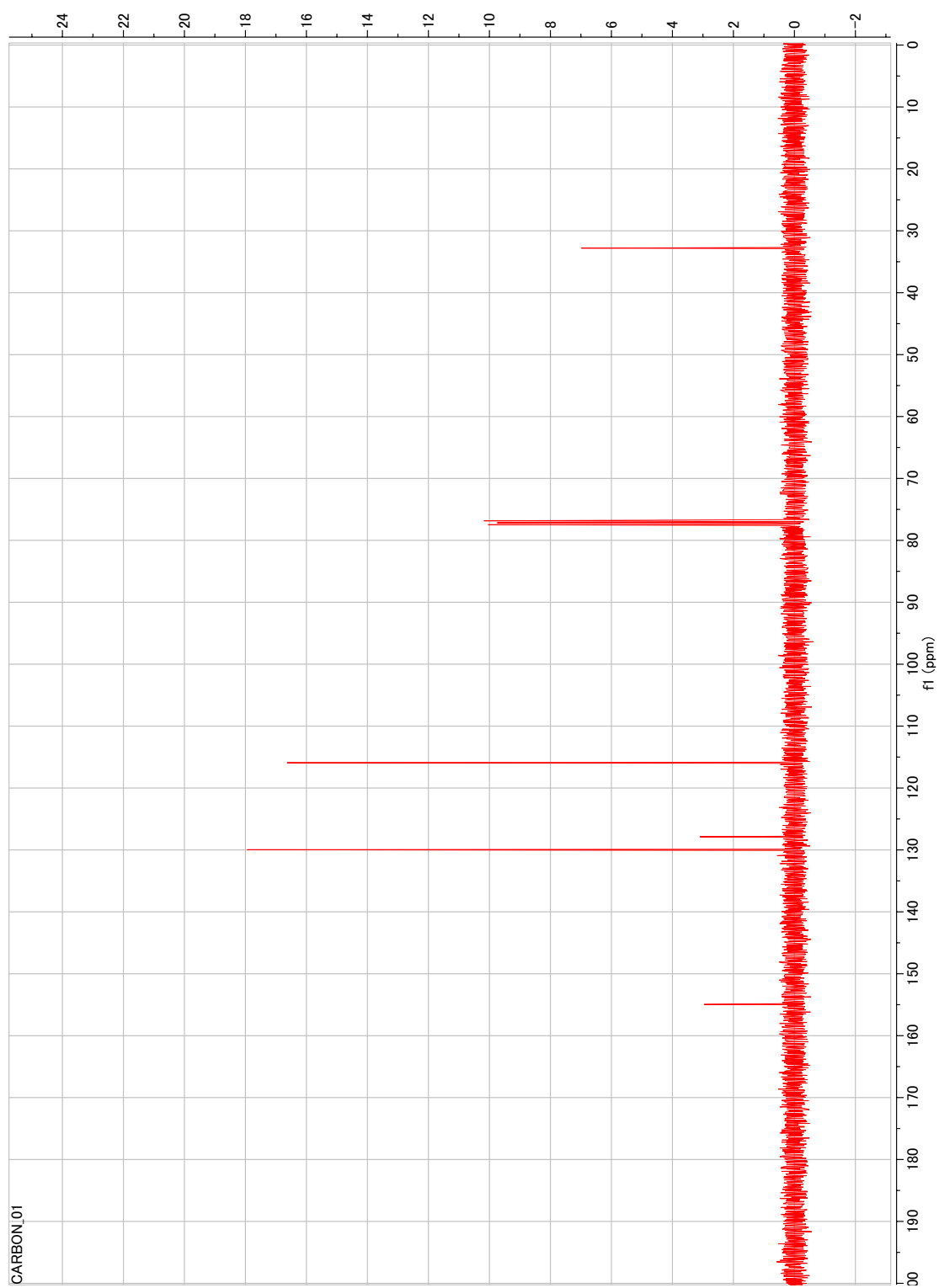
**Fig. S16.** Tumebacin (**1**) の HMBC スペクトル (DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz、 $^{13}\text{C}$ : 125 MHz)



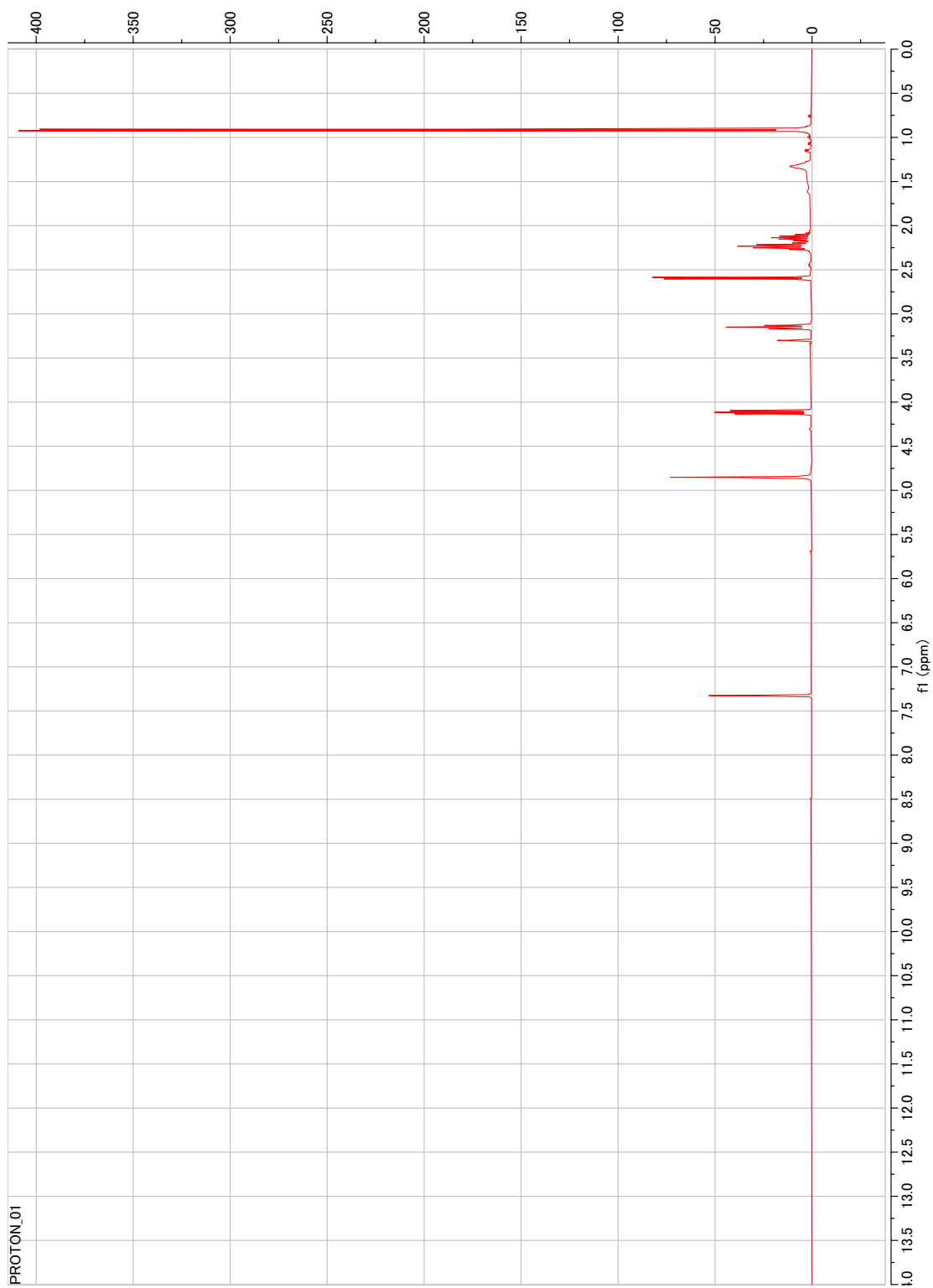
**Fig. S17.** Tumbacin (1) の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル ( $\text{DMSO}-d_6$ , 500 MHz)



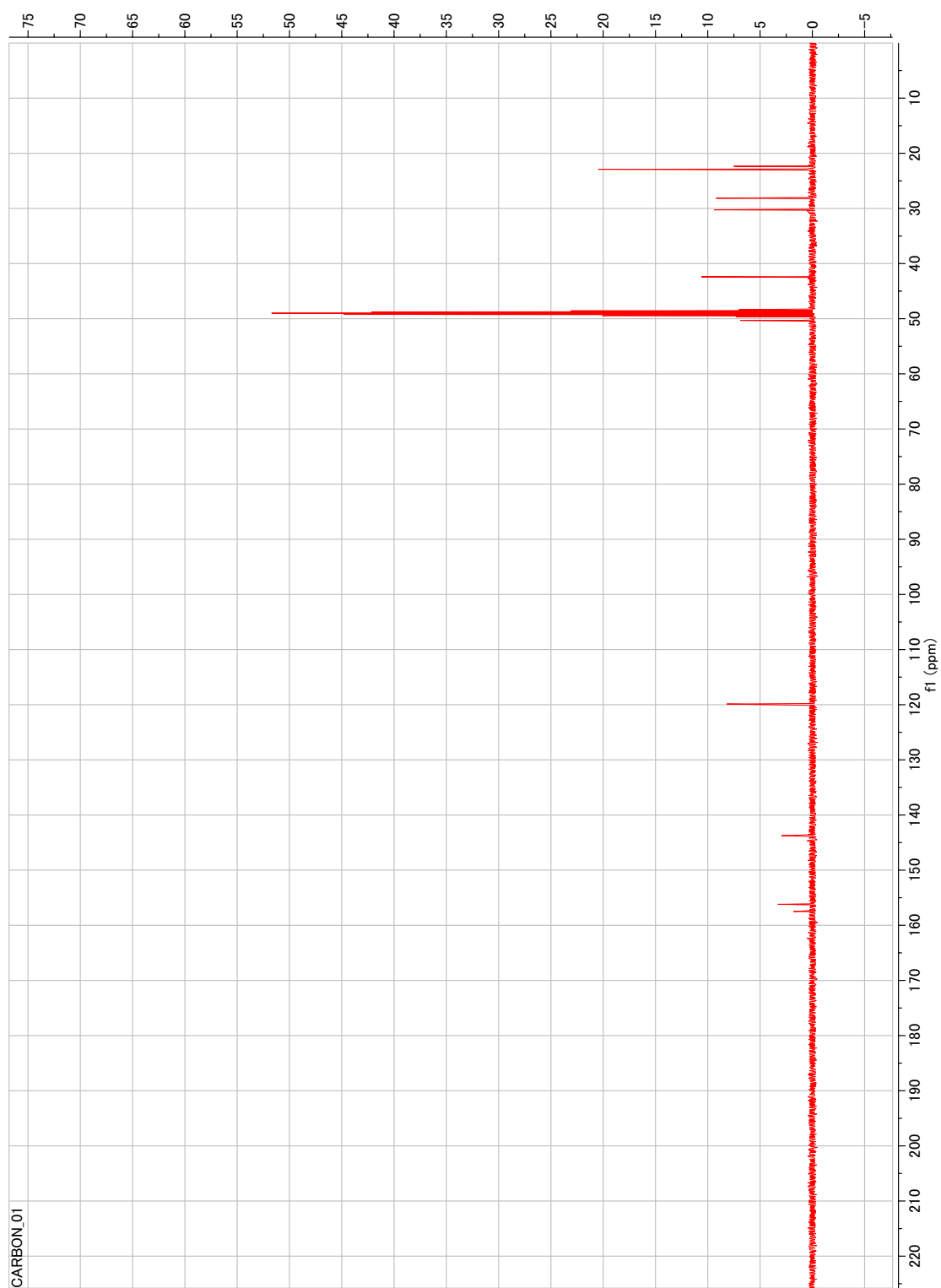
**Fig. S18.** 4-(2-Nitroethyl)phenol (**2**) の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)



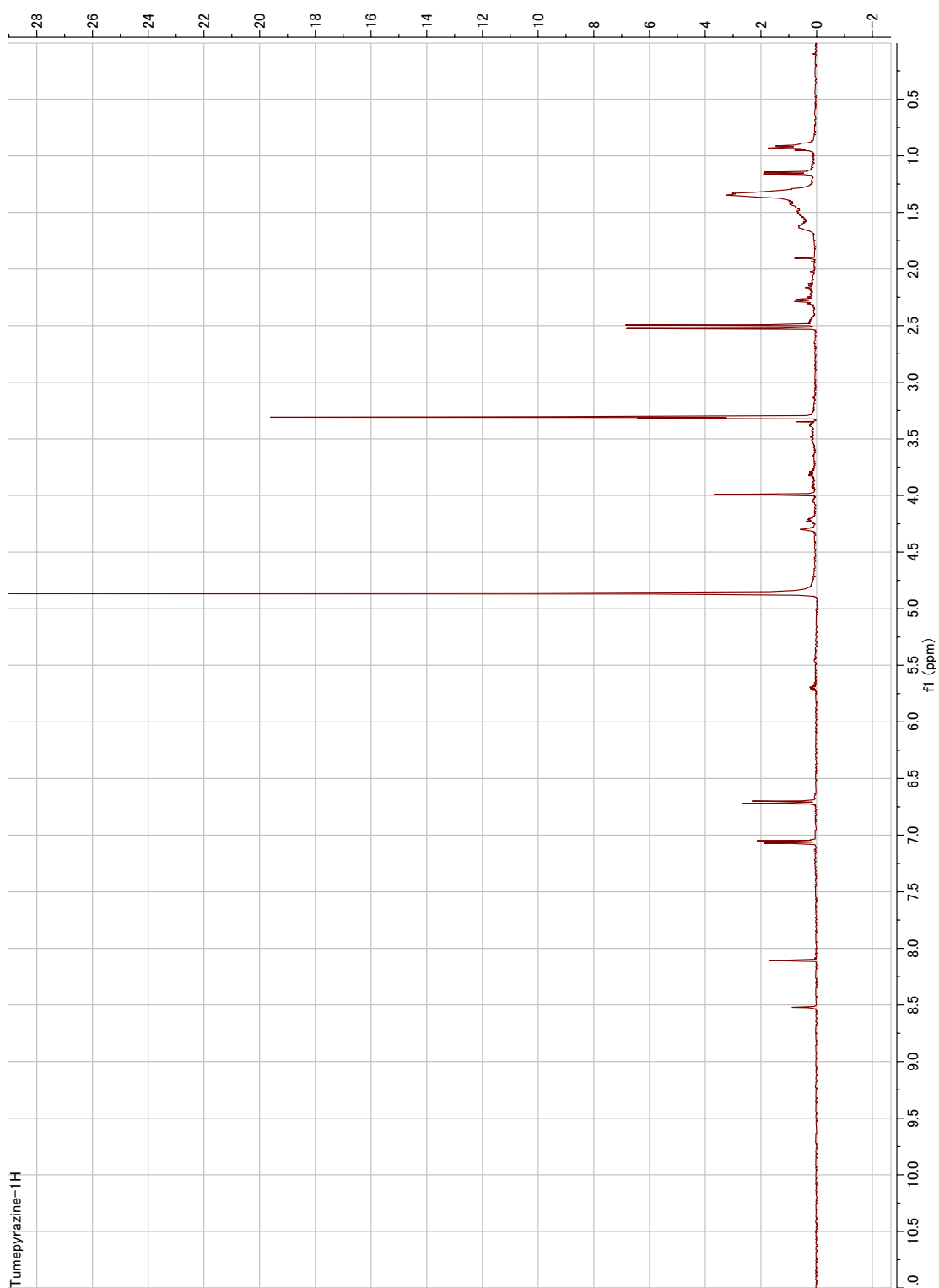
**Fig. S19.** 4-(2-Nitroethyl)phenol (**2**) の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル ( $\text{CDCl}_3$ 、100 MHz)



**Fig. S20.** Le-pyrrolopyrazine B (**3**) の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

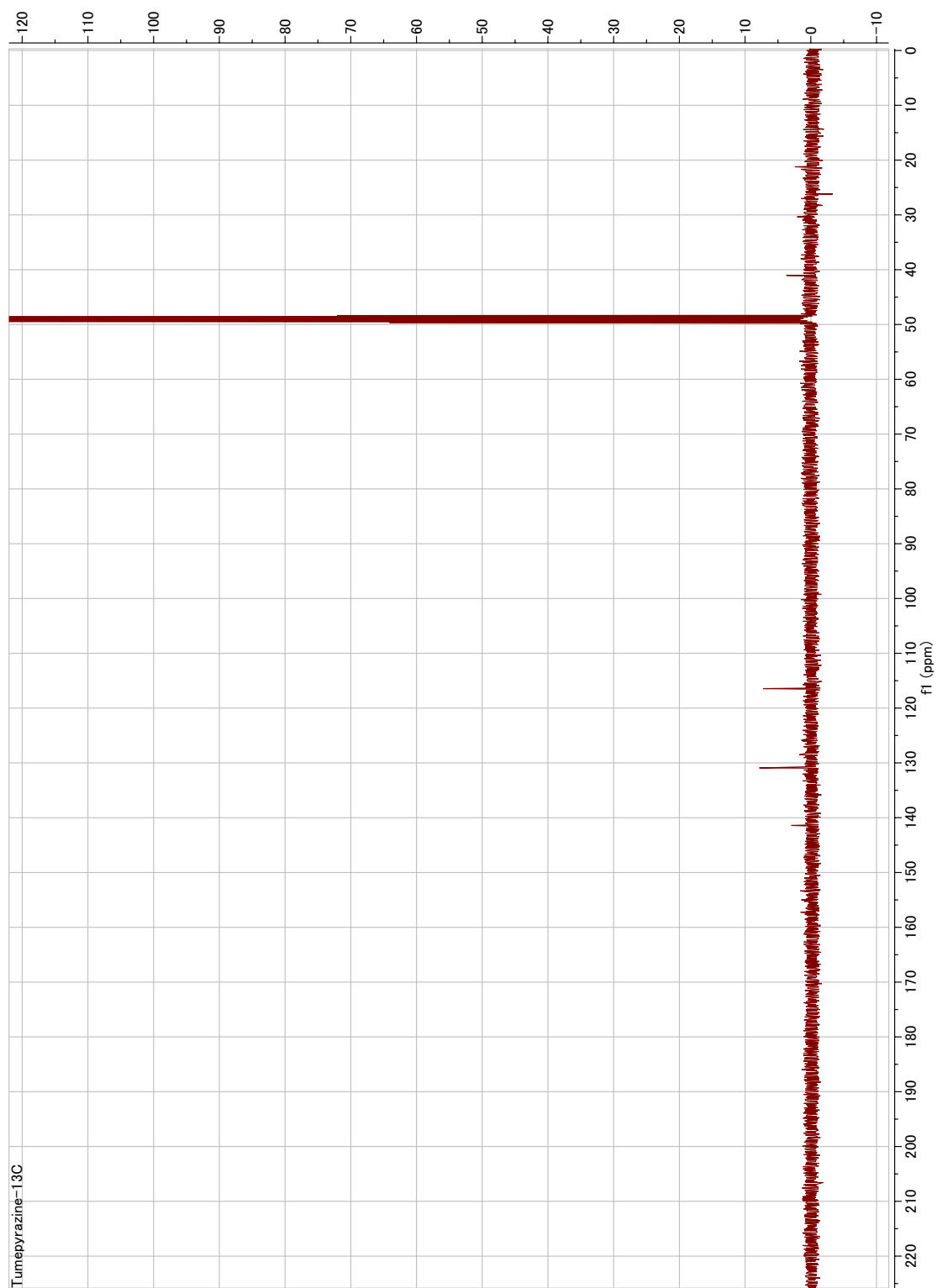


**Fig. S21.** Le-pyrrolopyrazine B (3) の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル ( $\text{CD}_3\text{OD}$ 、100 MHz)

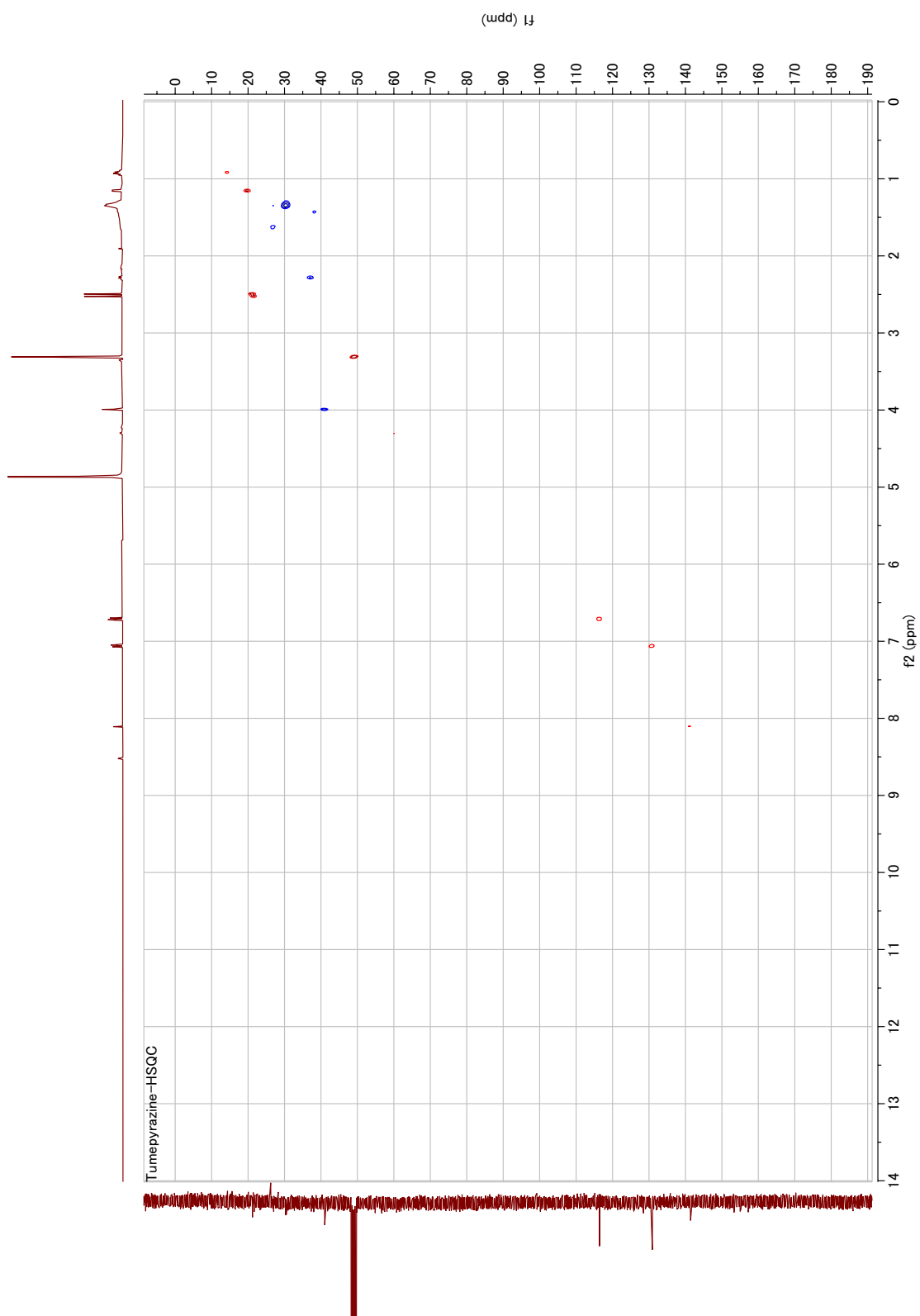


**Fig. S22.** Tumepyrazine (4) の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

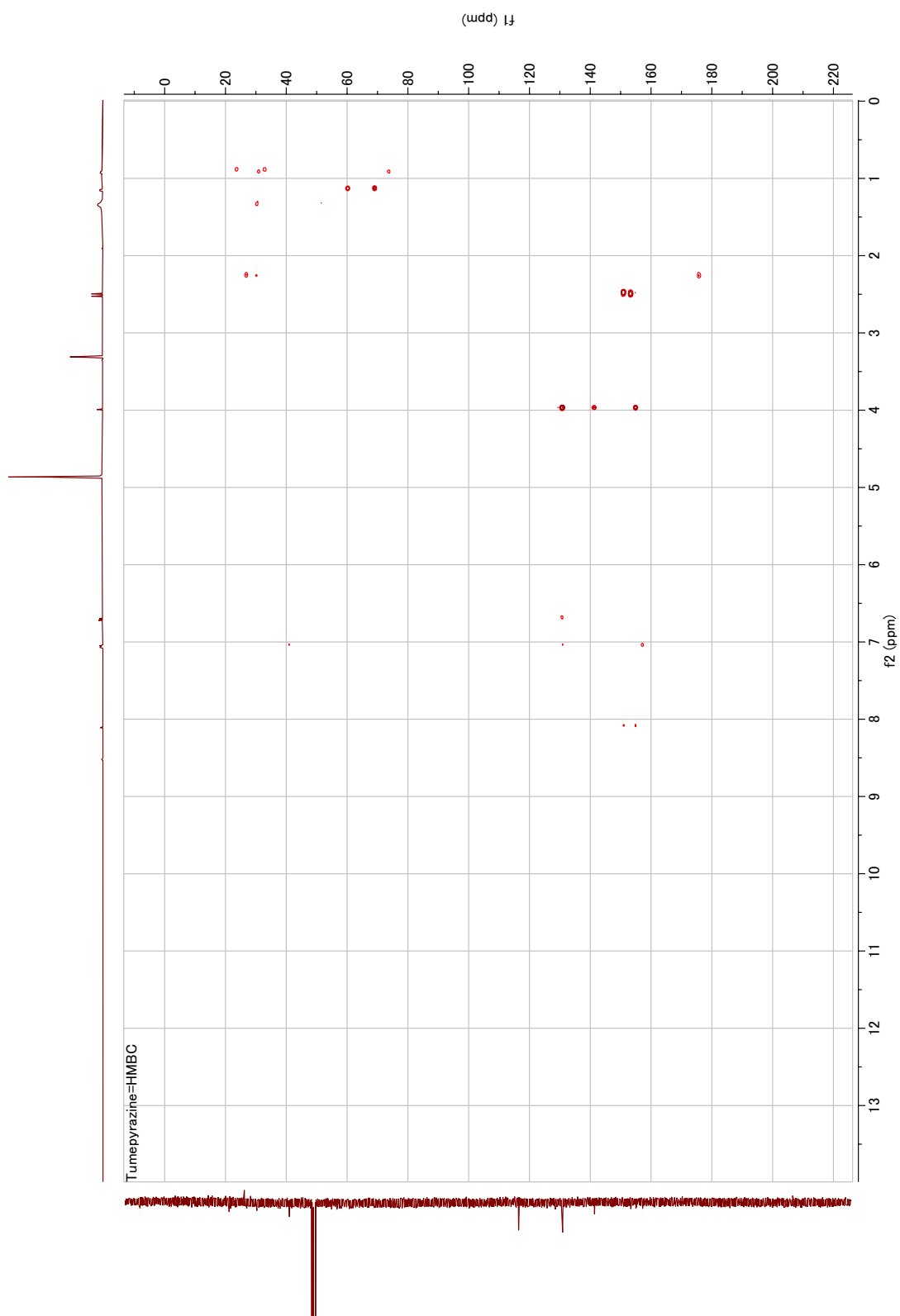




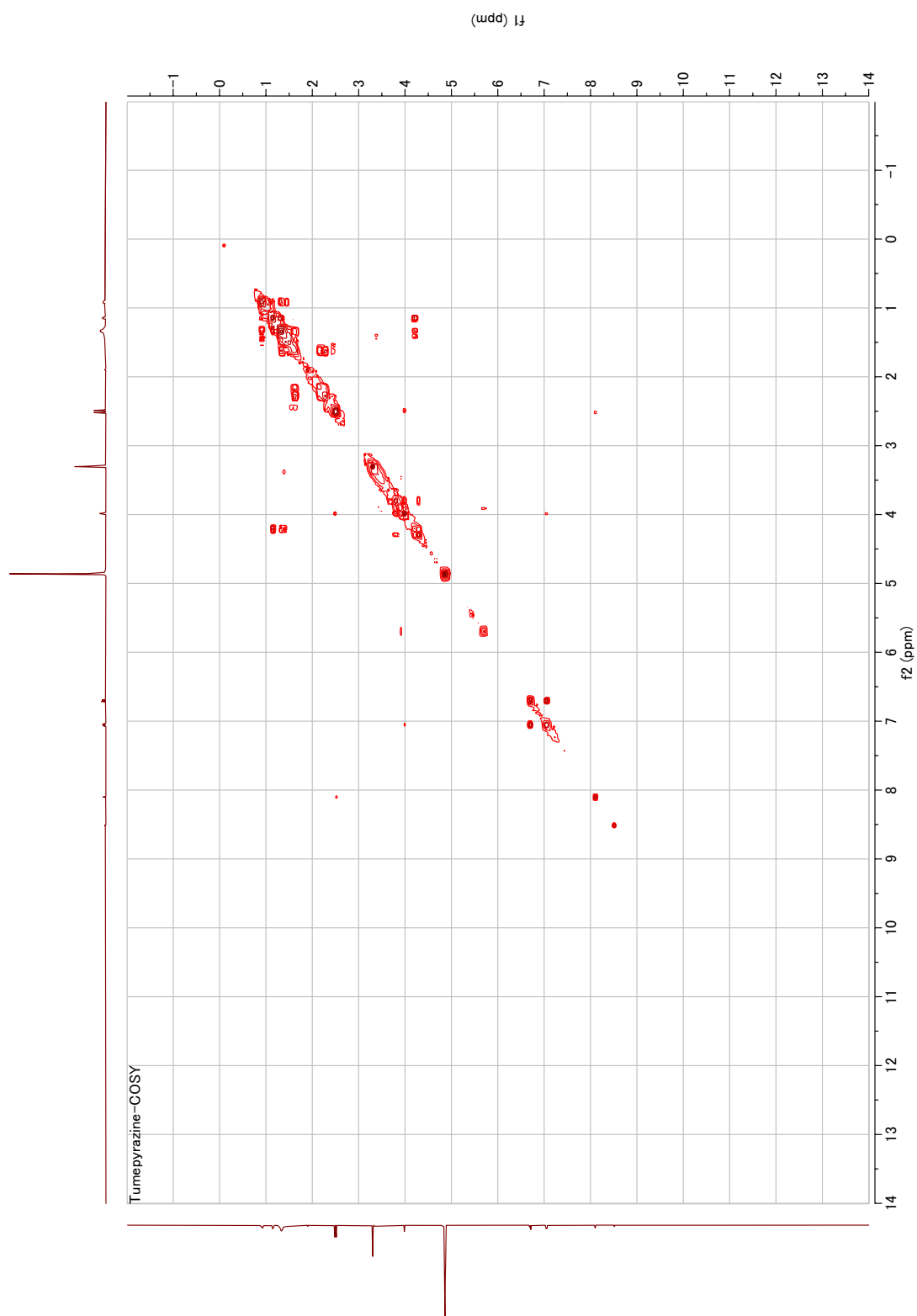
**Fig. S23.** Tumepyrzine (4) の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)



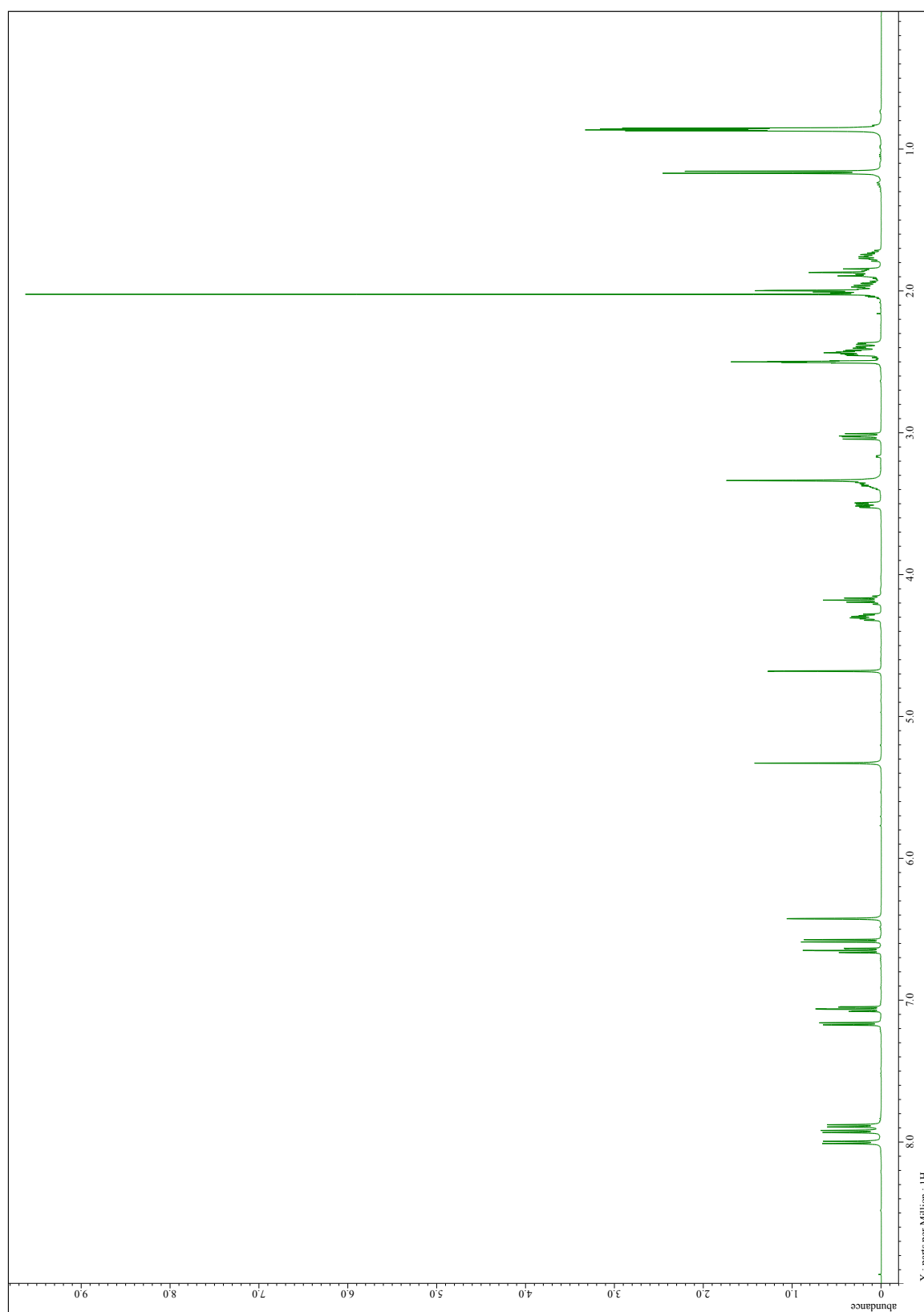
**Fig. S24.** Tumepyzine (**4**) の HSQC スペクトル (CD<sub>3</sub>OD、<sup>1</sup>H: 400 MHz、<sup>13</sup>C: 100 MHz)



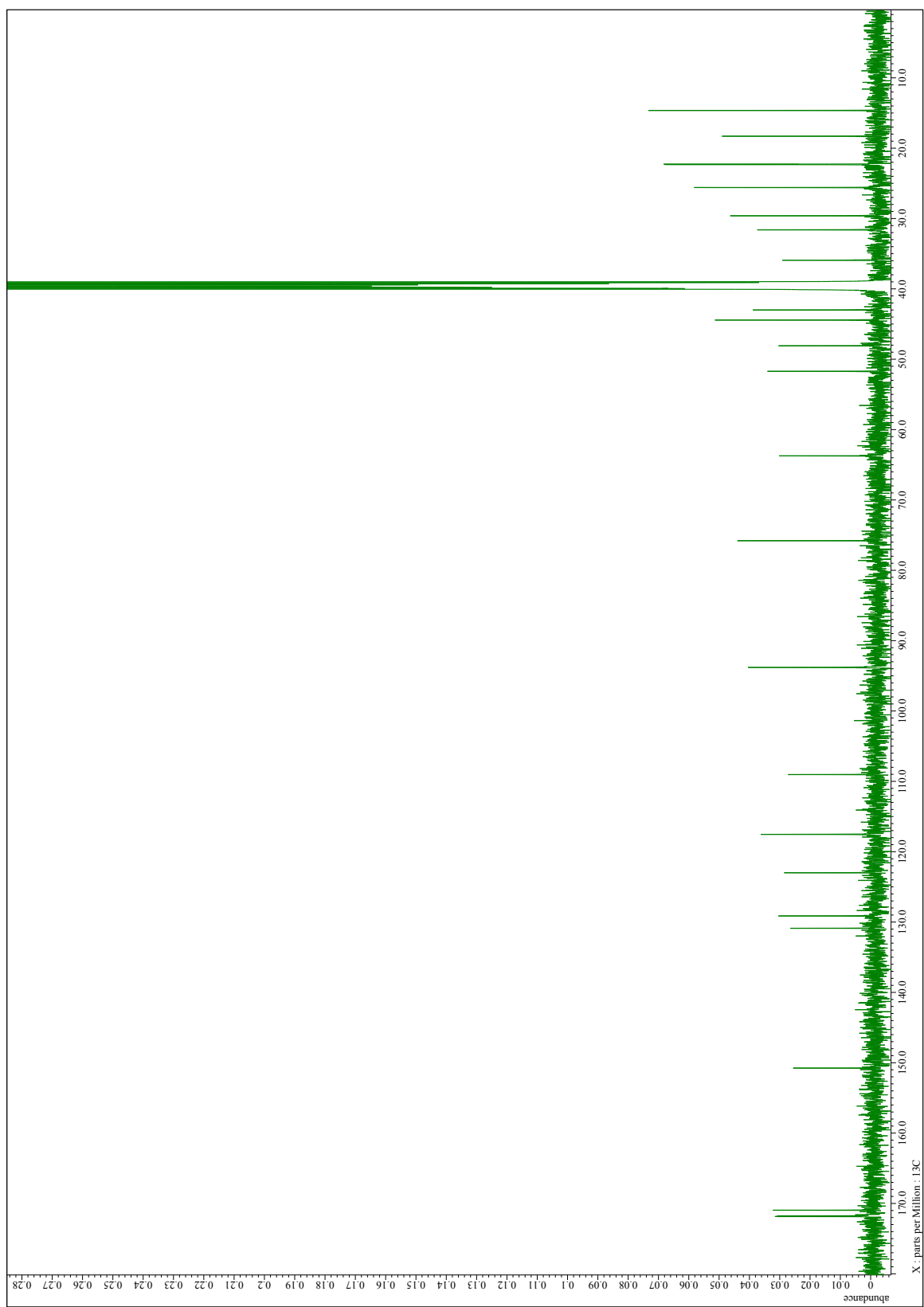
**Fig. S25.** Tumepyrzine (**4**) の HMBC スペクトル (CD<sub>3</sub>OD、<sup>1</sup>H: 400 MHz、<sup>13</sup>C: 100 MHz)



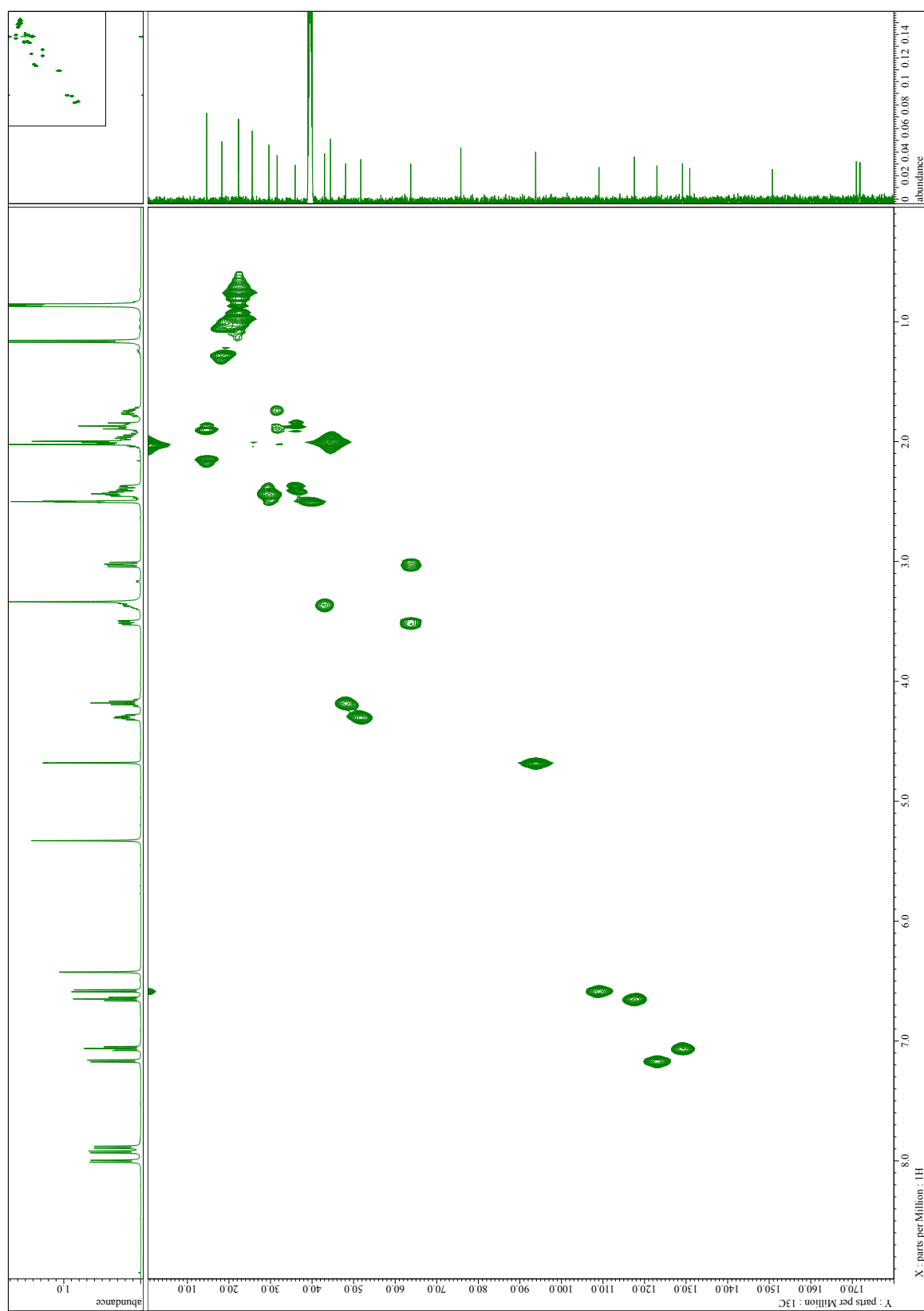
**Fig. S26.** Tumepyrizine (4) の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 100 MHz)



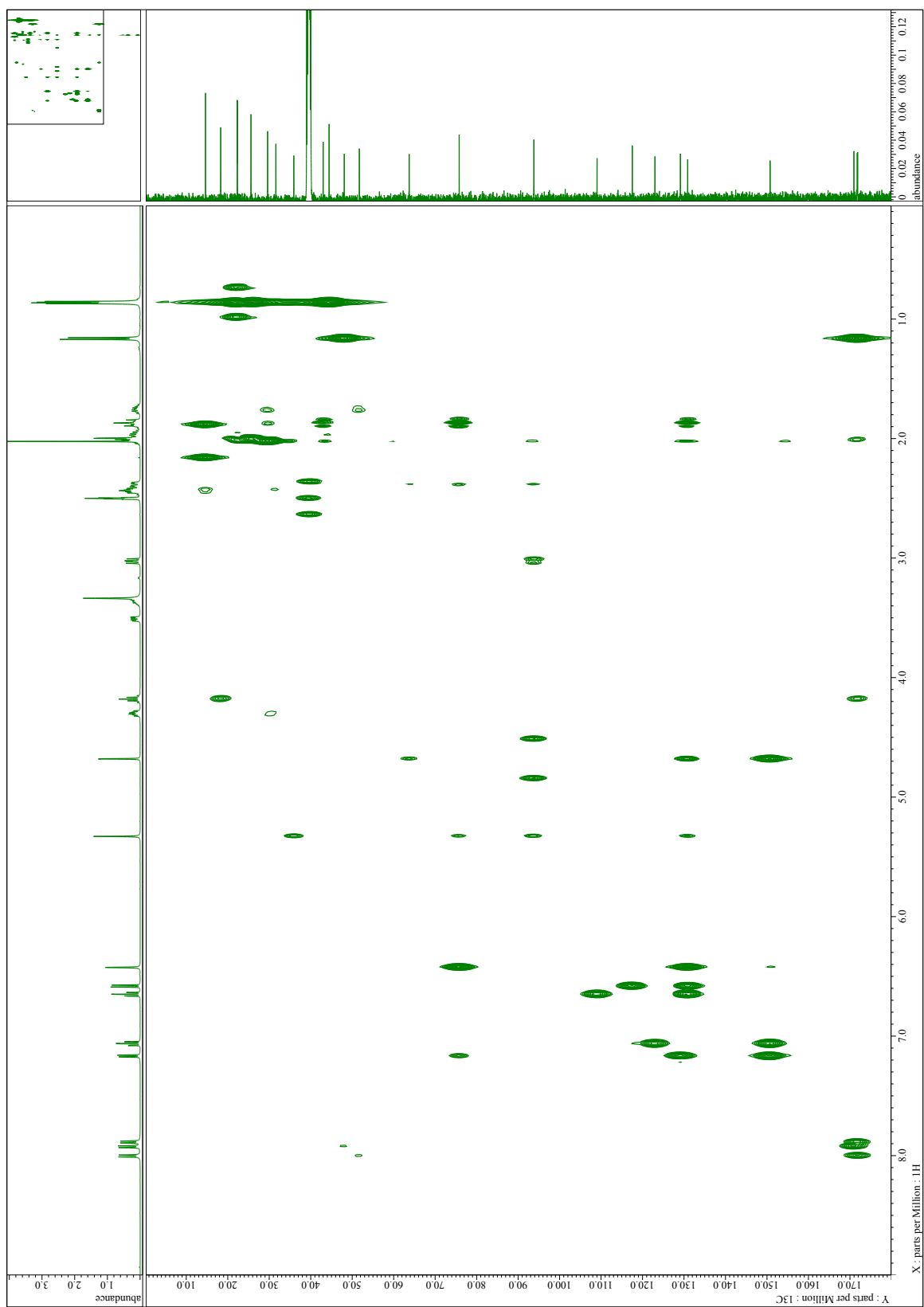
**Fig. S27.** Lentindole (**8**) の  $^1\text{H}$  NMR スペクトル (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)



**Fig. S28.** Lentindole (**8**) の  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトル ( $\text{DMSO}-d_6$  125 MHz)

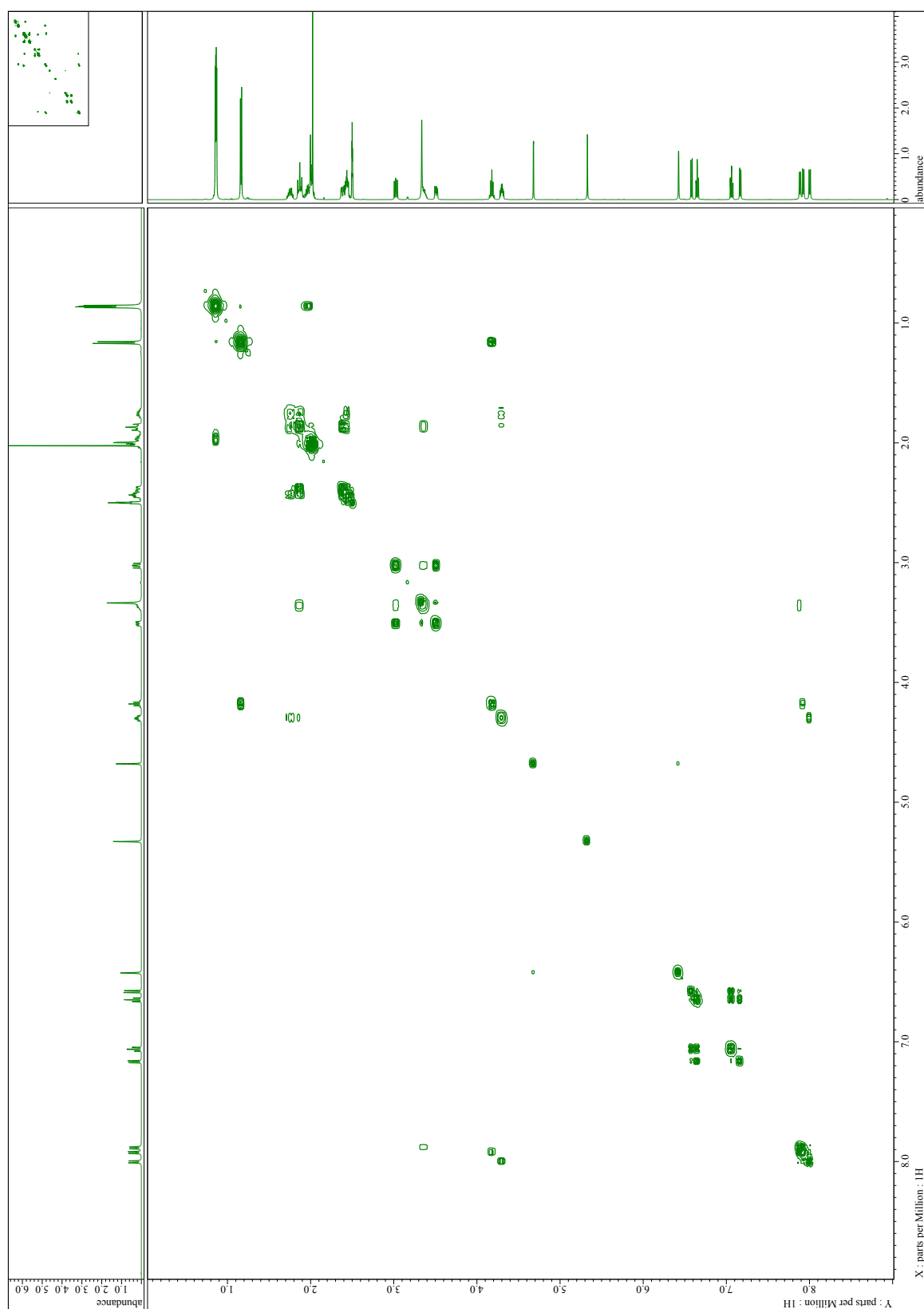


**Fig. S29.** Lentindole (8) の HMQC スペクトル (DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz)

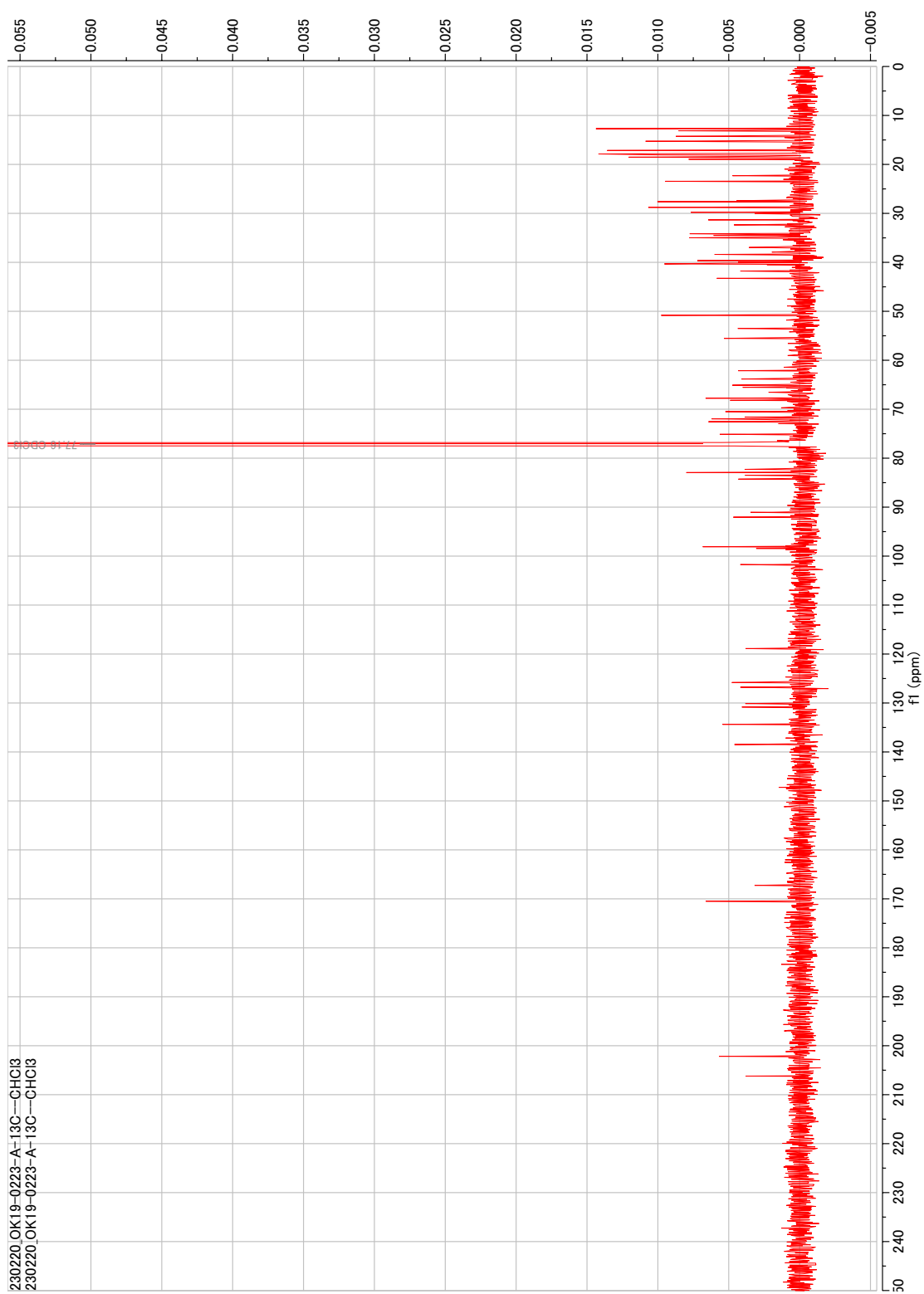


**Fig. S30.** Lentindole (**8**) の HMBC スペクトル (DMSO- $d_6$ ,  $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz)

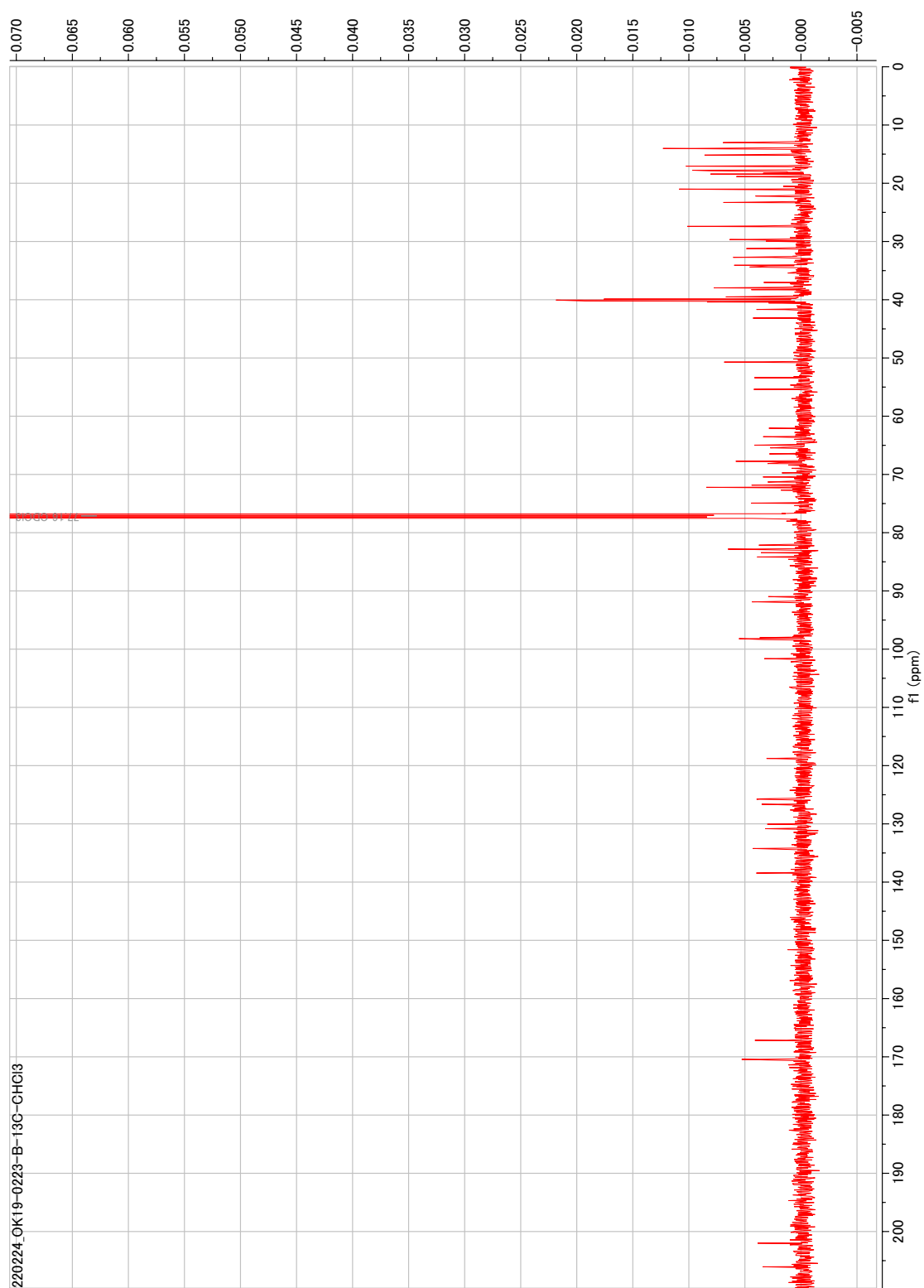




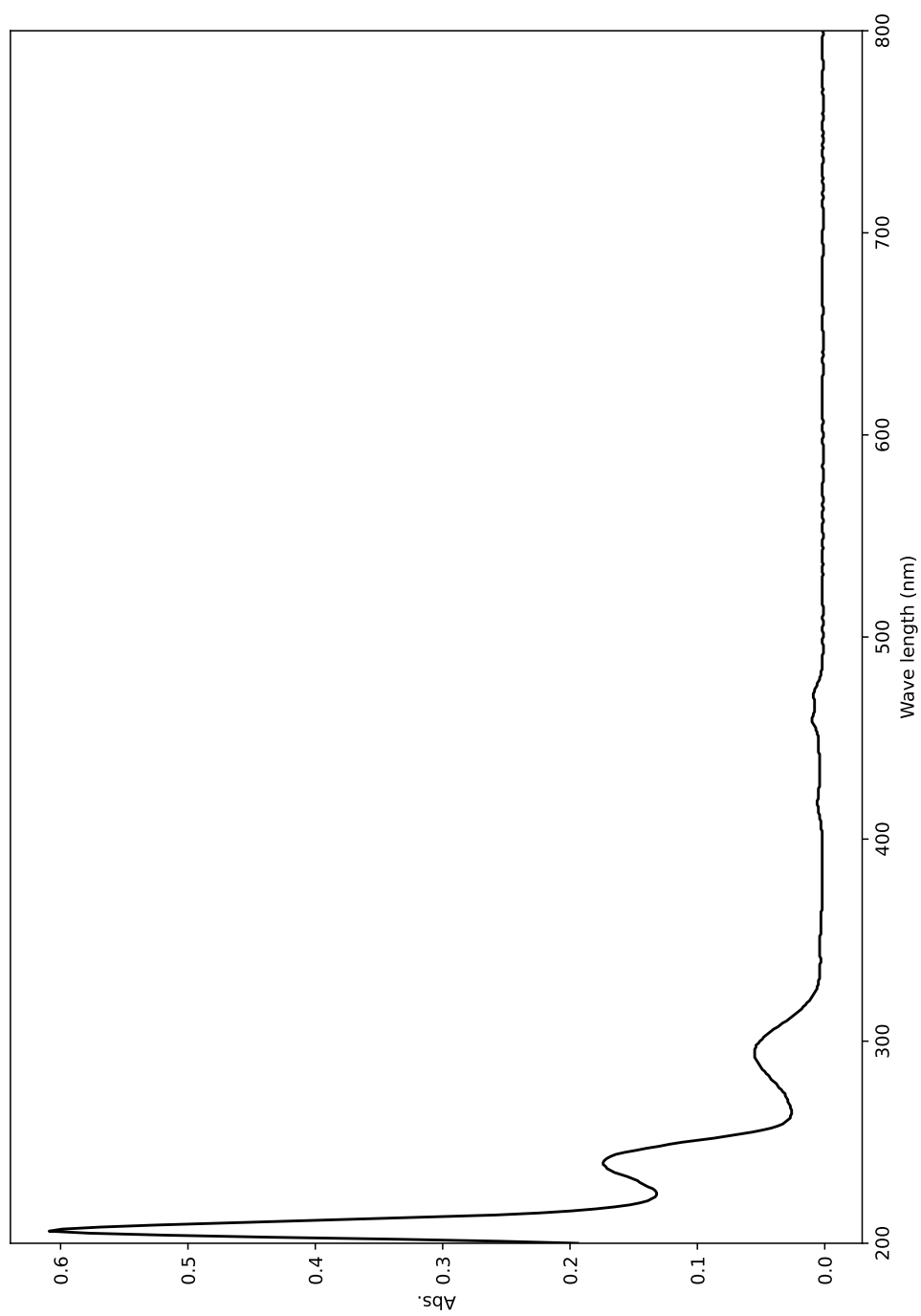
**Fig. S31.** Lentindole (**8**) の  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY スペクトル (DMSO- $d_6$ , 500 MHz)



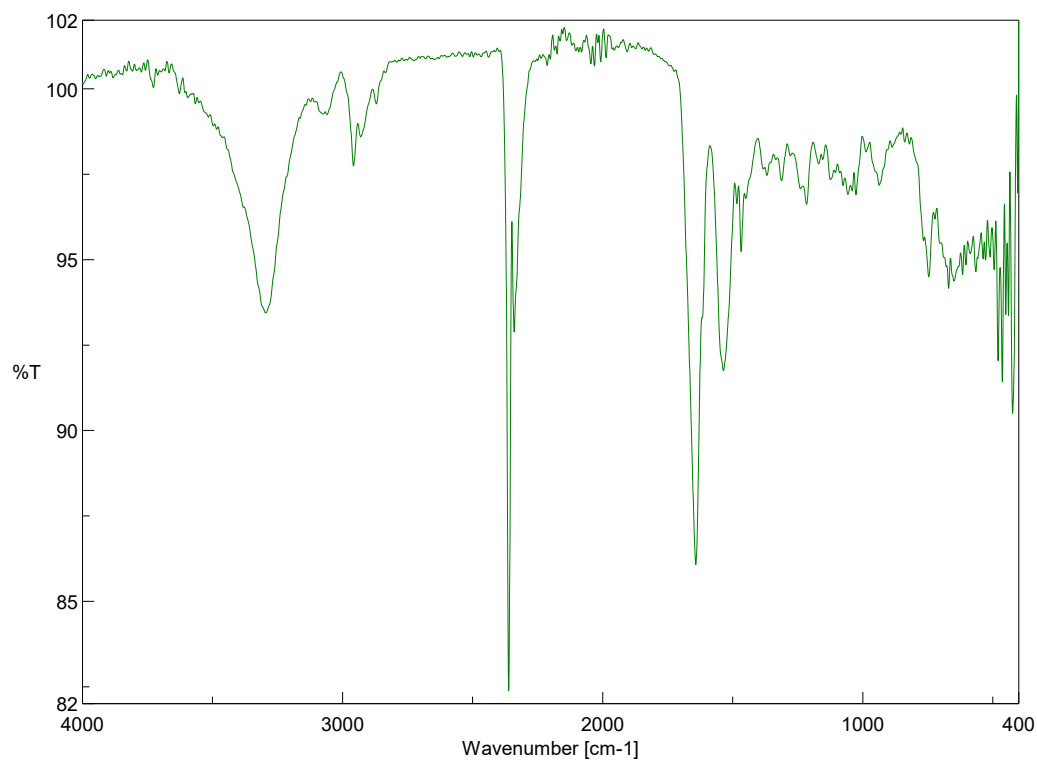
**Fig. S32.** Saccharocarcin A (**9**) の  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)



**Fig. S33.** Saccharocarcin B (**10**) の  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz)



**Fig. S34.** Lentindole (8) の UV 吸収スペクトル



[測定情報]		OK19-0192-HEjws	
機種名	FT/IR-4600typeA	[データ情報]	
シリアル番号	D096461786	作成日時	2022/11/16 15:12
付属品名	ATR PRO450-S	データタイプ	等間隔データ
付属品シリアルNo.	A097561272	横軸	Wavenumber [cm-1]
入射角	45 度	縦軸	%T
測定日時	2022/11/16 15:07	スタート	349.053 cm-1
光源	標準光源	エンド	7800.65 cm-1
検出器	TGS	データ間隔	0.964233 cm-1
積算回数	256	データ数	7729
分解	4 cm-1		
ゼロフィリング	On		
アポダイゼーション	Cosine		
ゲイン	Auto (16)		
アバーチャ	Auto (7.1 mm)		
スキャンスピード	Auto (2 mm/sec)		
フィルタ	Auto (30000 Hz)		

**Fig. S35.** Lentindole (8) の IR 吸収スペクトル

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始多大なご指導ご鞭撻を賜りました北里大学大村智記念研究所微生物機能研究室 稲橋 佑起 准教授に謹んで御礼申し上げます。また、貴重な研究環境を与えて下さいました学校法人北里研究所 大村 智 特別栄誉教授に心より感謝申し上げます。本研究を行うにあたり、種々のデータ解析や様々な実験手技のご指導を頂きました北里大学大村智記念研究所微生物機能研究室 堤 隼馬 特任助教に謹んで御礼申し上げます。天然物の構造解析に多大なるご助言を頂きました北里大学大村智記念研究所熱帯病研究センター 岩月 正人 教授、MicroED を用いた結晶構造解析をして頂きました北里大学大村智記念研究所熱帯病研究センター 渡邊 善洋 特任助手、株式会社リガク 伊藤 翔 博士、Institute of Physics of the Czech Academy of Sciences Paul Benjamin Klar Ph.D.、天然物の各種機器分析を行なって頂きその解析についてご指導下さいました北里大学 薬学部共有機器室 長井 賢一郎 講師、佐藤 倫子 氏、ジャーファーマンターでの培養を行なって頂きました北里大学大村智記念研究所微生物資源研究センター 野中 健一 准教授 (現: 帝京科学大学所属)、小島 裕貴 助手、分離に用いた土壌並びに抗菌活性試験に用いた菌株を提供して下さいました北里大学大村智記念研究所微生物資源研究センター 常盤 俊之 助手、分子ネットワーク解析について貴重なお意見を賜りました北里大学大村智記念研究所微生物応用化学研究室 酒井 一成 特別研究員、菌株の保存並びに提供をして下さいました北里大学大村智記念研究所微生物機能研究室 武 晃 助教 (現: 北里大学医学部医学研究科所属)、辻村 昌也 博士、芝崎 しおり 研究員、永吉 美穂 研究員、青木 優 研究員、菅藤 裕貴 氏、学部生の頃から研究室に温かく迎え入れて下さり、放線菌の取り扱いの基礎からご指導を頂きました北里大学感染制御科学府微生物機能研究室 松本 厚子 准教授 (現: 微生物化学研究所所属) に厚く御礼申し上げます。また、本研究を行うにあたりご助力並びにご助言賜りました、北里大学大村智記念研究所生物有機化学研究室 砂塚 敏明 教授、廣瀬 友靖 教授、野口 吉彦 特任助教、金井田 将裕 博士 (現: Rice University 所属)、中原 大生 氏、北里大学大村智記念研究所微生物応用化学研究室 浅見 行弘 教授、君嶋 葵 助教、北里大学大村智記念研究所感染制御研究センター 花木 秀明 教授、松井 秀仁 講師、琉球大学 教育学部 理科学研究専修 照屋研究室 照屋 俊明 教授、琉球大学農学部 生物活性物質学研究室 石井 貴広 准教授、株式会社リガク スタッフの皆様、日本電子株式会社 スタッフの皆様、日野 精三氏、北里大学大村智記念研究所微生物機能研究室 宮野 嶺 博士、栗野 友太 氏、春日 晟伸 氏、川島 未来 氏、高林 稜 氏、川口 彩乃 氏、香取 知里 氏、その他大村智記念研究所の皆様心より感謝申し上げます。

最後に、研究生活のみならず、これまでの人生におけるあらゆる面で私を支えて下さいました、父 菊池 勇、母 菊池 恵、妹 菊池 桃加、祖母 朝倉 富子 に深く感謝いたします。

2024 年 6 月 17 日

菊池 雄太

## 参考文献

- [1] Paul M. Dewick. 医薬品天然物化学. 南江堂, 原書第 2 版, 2004.
- [2] Rajendra Singh, Manoj Kumar, Anshumali Mittal, and Praveen Kumar Mehta. Microbial metabolites in nutrition, healthcare and agriculture. *3 Biotech*, Vol. 7, No. 1, p. 15, 2017.
- [3] D. H. Williams, M. J. Stone, P. R. Hauck, and S. K. Rahman. Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized? *Journal of Natural Products*, Vol. 52, No. 6, pp. 1189–1208, 1989.
- [4] Hassan Awad, Kamal EL-Shahed, R. Aziz, Mohamed Sarmidi, and Hesham El Enshasy. Antibiotics as Microbial Secondary Metabolites: Production and Application. *Jurnal Tekologi*, Vol. 59, pp. 101–111, 2012.
- [5] David J. Newman and Gordon M. Cragg. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, Vol. 83, No. 3, pp. 770–803, 2020.
- [6] Ben Shen. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. *Cell*, Vol. 163, No. 6, pp. 1297–1300, 2015.
- [7] Matthew I Hutchings, Andrew W Truman, and Barrie Wilkinson. Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, Vol. 51, pp. 72–80, 2019.
- [8] René J. Dubos. STUDIES ON A BACTERICIDAL AGENT EXTRACTED FROM A SOIL BACILLUS (I. PREPARATION OF THE AGENT. ITS ACTIVITY IN VITRO). *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 70, No. 1, pp. 1–10, 1939.
- [9] Rollin D. Hotchkiss and René J. Dubos. BACTERICIDAL FRACTIONS FROM AN AEROBIC SPORULATING BACILLUS. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 136, No. 3, pp. 803–804, 1940.
- [10] René J. Dubos and Rollin D. Hotchkiss. THE PRODUCTION OF BACTERICIDAL SUBSTANCES BY AEROBIC SPORULATING BACILLI. *The Journal of Experimental Medicine*, Vol. 73, No. 5, pp. 629–640, 1941.
- [11] Mark S. Butler. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, Vol. 67, No. 12, pp. 2141–2153, 2004.
- [12] Leonard Katz and Richard H Baltz. Natural product discovery: Past, present, and future. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Vol. 43, No. 2-3, pp. 155–176, 2016.
- [13] Jean-Yves Ortholand and A Ganesan. Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 8, No. 3, pp. 271–280, 2004.
- [14] Jesse W.-H. Li and John C. Vederas. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, Vol. 325, No. 5937, pp. 161–165, 2009.
- [15] Alessandro Dondoni and Alessandro Massi. Asymmetric Organocatalysis: From Infancy to Adolescence. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 47, No. 25, pp. 4638–4660, 2008.
- [16] Chunngai Hui, Fan Pu, and Jing Xu. Metal-Catalyzed Asymmetric Michael Addition in Natural Product Synthesis. *Chemistry – A European Journal*, Vol. 23, No. 17, pp. 4023–4036, 2017.
- [17] Ruiyang Bao, Haoyu Zhang, and Yefeng Tang. Biomimetic Synthesis of Natural Products: A Journey To Learn, To Mimic, and To Be Better. *Accounts of Chemical Research*, Vol. 54, No. 19, pp. 3720–3733, 2021.
- [18] Jan Grünewald and Mohamed A. Marahiel. Chemoenzymatic and Template-Directed Synthesis of Bioac-

- tive Macrocyclic Peptides. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Vol. 70, No. 1, pp. 121–146, 2006.
- [19] Kenjiro Yazawa and Keiji Numata. Recent Advances in Chemoenzymatic Peptide Syntheses. *Molecules*, Vol. 19, No. 9, pp. 13755–13774, 2014.
- [20] Jian Li, Alexander Amatuni, and Hans Renata. Recent advances in the chemoenzymatic synthesis of bioactive natural products. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 55, pp. 111–118, 2020.
- [21] Suman Chakrabarty, Evan O. Romero, Joshua B. Pyser, Jessica A. Yazarians, and Alison R. H. Narayan. Chemoenzymatic total synthesis of natural products. *Accounts of Chemical Research*, Vol. 54, No. 6, pp. 1374–1384, 2021.
- [22] Miklos Feher and Jonathan M. Schmidt. Property Distributions: Differences between Drugs, Natural Products, and Molecules from Combinatorial Chemistry. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, Vol. 43, No. 1, pp. 218–227, 2003.
- [23] Narender Singh, Rajarshi Guha, Marc Giulianotti, Clemencia Pinilla, Richard Houghten, and Jose L. Medina-Franco. Chemoinformatic Analysis of Combinatorial Libraries, Drugs, Natural Products and Molecular Libraries Small Molecule Repository. *Journal of Chemical Information and Modeling*, Vol. 49, No. 4, pp. 1010–1024, 2009.
- [24] János Bérdy. Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *The Journal of Antibiotics*, Vol. 65, No. 8, pp. 385–395, 2012.
- [25] Gerard D. Wright. Opportunities for natural products in 21st century antibiotic discovery. *Natural Product Reports*, Vol. 34, No. 7, pp. 694–701, 2017.
- [26] Satoshi Ōmura. Microbial metabolites: 45 years of wandering, wondering and discovering. *Tetrahedron*, Vol. 67, No. 35, pp. 6420–6459, 2011.
- [27] Navid J. Ayon. High-Throughput Screening of Natural Product and Synthetic Molecule Libraries for Antibacterial Drug Discovery. *Metabolites*, Vol. 13, No. 5, p. 625, 2023.
- [28] Hiroshi Tsugawa, Tomas Cajka, Tobias Kind, Yan Ma, Brendan Higgins, Kazutaka Ikeda, Mitsuhiro Kanazawa, Jean Vander Gheynst, Oliver Fiehn, and Masanori Arita. MS-DIAL: Data-independent MS/MS deconvolution for comprehensive metabolome analysis. *Nature Methods*, Vol. 12, No. 6, pp. 523–526, 2015.
- [29] Louis-Félix Nothias, Daniel Petras, Robin Schmid, Kai Dührkop, Johannes Rainer, Abinesh Sarvepalli, Ivan Protsyuk, Madeleine Ernst, Hiroshi Tsugawa, Markus Fleischauer, Fabian Aicheler, Alexander A. Aksenov, Oliver Alka, Pierre-Marie Allard, Aiko Barsch, Xavier Cachet, Andres Mauricio Caraballo-Rodriguez, Ricardo R. Da Silva, Tam Dang, Neha Garg, Julia M. Gauglitz, Alexey Gurevich, Giorgis Isaac, Alan K. Jarmusch, Zdeněk Kameník, Kyo Bin Kang, Nikolas Kessler, Irina Koester, Ansgar Korf, Audrey Le Gouellec, Marcus Ludwig, Christian Martin H., Laura-Isobel McCall, Jonathan Mc-Sayles, Sven W. Meyer, Hosein Mohimani, Mustafa Morsy, Oriane Moyne, Steffen Neumann, Heiko Neuweiger, Ngoc Hung Nguyen, Melissa Nothias-Esposito, Julien Paolini, Vanessa V. Phelan, Tomáš Pluskal, Robert A. Quinn, Simon Rogers, Bindesh Shrestha, Anupriya Tripathi, Justin J. J. van der Hooft, Fernando Vargas, Kelly C. Weldon, Michael Witting, Heejung Yang, Zheng Zhang, Florian Zubeil, Oliver Kohlbacher, Sebastian Böcker, Theodore Alexandrov, Nuno Bandeira, Mingxun Wang, and Pieter C. Dorrestein. Feature-based molecular networking in the GNPS analysis environment. *Nature Methods*, Vol. 17, No. 9, pp. 905–908, 2020.



- [30] Qihao Wu, Bailey A. Bell, Jia-Xuan Yan, Marc G. Chevrette, Nathan J. Brittin, Yanlong Zhu, Shaurya Chanana, Mitasree Maity, Doug R. Braun, Amelia M. Wheaton, Ilia A. Guzei, Ying Ge, Scott R. Rajski, Michael G. Thomas, and Tim S. Bugni. Metabolomics and Genomics Enable the Discovery of a New Class of Nonribosomal Peptidic Metallophores from a Marine *Micromonospora*. *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 145, No. 1, pp. 58–69, 2023.
- [31] Mingxun Wang, Jeremy J Carver, Vanessa V Phelan, Laura M Sanchez, Neha Garg, Yao Peng, Don Duy Nguyen, Jeramie Watrous, Clifford A Kapon, Tal Luzzatto-Knaan, Carla Porto, Amina Bouslimani, Alexey V Melnik, Michael J Meehan, Wei-Ting Liu, Max Crüsemann, Paul D Boudreau, Eduardo Esquenazi, Mario Sandoval-Calderón, Roland D Kersten, Laura A Pace, Robert A Quinn, Katherine R Duncan, Cheng-Chih Hsu, Dimitrios J Floros, Ronnie G Gavilan, Karin Kleigrewe, Trent Northen, Rachel J Dutton, Delphine Parrot, Erin E Carlson, Bertrand Aigle, Charlotte F Michelsen, Lars Jelsbak, Christian Sohlenkamp, Pavel Pevzner, Anna Edlund, Jeffrey McLean, Jörn Piel, Brian T Murphy, Lena Gerwick, Chih-Chuang Liaw, Yu-Liang Yang, Hans-Ulrich Humpf, Maria Maansson, Robert A Keyzers, Amy C Sims, Andrew R Johnson, Ashley M Sidebottom, Brian E Sedio, Andreas Klitgaard, Charles B Larson, Cristopher A Boya P, Daniel Torres-Mendoza, David J Gonzalez, Denise B Silva, Lucas M Marques, Daniel P Demarque, Egle Pociute, Ellis C O'Neill, Enora Briand, Eric J N Helfrich, Eve A Granatosky, Evgenia Glukhov, Florian Ryffel, Hailey Houson, Hosein Mohimani, Jenan J Kharbush, Yi Zeng, Julia A Vorholt, Kenji L Kurita, Pep Charusanti, Kerry L McPhail, Kristian Fog Nielsen, Lisa Vuong, Maryam Elfeki, Matthew F Traxler, Niclas Engene, Nobuhiro Koyama, Oliver B Vining, Ralph Baric, Ricardo R Silva, Samantha J Mascuch, Sophie Tomasi, Stefan Jenkins, Venkat Macherla, Thomas Hoffman, Vinayak Agarwal, Philip G Williams, Jingui Dai, Ram Neupane, Joshua Gurr, Andrés M C Rodríguez, Anne Lamsa, Chen Zhang, Kathleen Dorrestein, Brendan M Duggan, Jehad Almaliti, Pierre-Marie Alard, Prasad Phapale, Louis-Felix Nothias, Theodore Alexandrov, Marc Litaudon, Jean-Luc Wolfender, Jennifer E Kyle, Thomas O Metz, Tyler Peryea, Dac-Trung Nguyen, Danielle VanLeer, Paul Shinn, Ajit Jadhav, Rolf Müller, Katrina M Waters, Wenyuan Shi, Xueting Liu, Lixin Zhang, Rob Knight, Paul R Jensen, Bernhard Ø Palsson, Kit Pogliano, Roger G Linington, Marcelino Gutiérrez, Norberto P Lopes, William H Gerwick, Bradley S Moore, Pieter C Dorrestein, and Nuno Bandeira. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature Biotechnology*, Vol. 34, No. 8, pp. 828–837, 2016.
- [32] *Dictionary of Natural Products on USB 32.2*. CRC Press, (ver. 32.2) edition, 2023.
- [33] Aidan C. Parte, Joaquim Sardà Carbasse, Jan P. Meier-Kolthoff, Lorenz C. Reimer, and Markus Göker. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 70, No. 11, pp. 5607–5612, 2020.
- [34] List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (2023/11/19 accessed, <https://lpsn.dsmz.de/>).
- [35] Thomas Hoffmann, Daniel Krug, Nisa Bozkurt, Srikanth Duddela, Rolf Jansen, Ronald Garcia, Klaus Gerth, Heinrich Steinmetz, and Rolf Müller. Correlating chemical diversity with taxonomic distance for discovery of natural products in myxobacteria. *Nature Communications*, Vol. 9, No. 1, p. 803, 2018.
- [36] 二三雄菅原, 忠雄浅見, 智久葛山, 幸司倉持, 一男新家, 晋治永田. 天然物化学. コロナ社, 東京都, 2019.
- [37] Ben Shen. Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 7, No. 2, pp. 285–295, 2003.
- [38] James Staunton and Barrie Wilkinson. Biosynthesis of Erythromycin and Rapamycin. *Chemical Reviews*,

Vol. 97, No. 7, pp. 2611–2630, 1997.

- [39] X Ruan, A Pereda, D L Stassi, D Zeidner, R G Summers, M Jackson, A Shivakumar, S Kakavas, M J Staver, S Donadio, and L Katz. Acyltransferase domain substitutions in erythromycin polyketide synthase yield novel erythromycin derivatives. *Journal of Bacteriology*, Vol. 179, No. 20, pp. 6416–6425, 1997.
- [40] David E. Cane. Programming of Erythromycin Biosynthesis by a Modular Polyketide Synthase. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 285, No. 36, pp. 27517–27523, 2010.
- [41] Atahualpa Pinto, Meng Wang, Mark Horsman, and Christopher N. Boddy. 6-Deoxyerythronolide B Synthase Thioesterase-Catalyzed Macrocyclization Is Highly Stereoselective. *Organic Letters*, Vol. 14, No. 9, pp. 2278–2281, 2012.
- [42] Sailesh Malla, Narayan Prasad Niraula, Bijay Singh, Kwangkyoung Liou, and Jae Kyung Sohng. Limitations in doxorubicin production from *Streptomyces peucetius*. *Microbiological Research*, Vol. 165, No. 5, pp. 427–435, 2010.
- [43] Tomoko Kita, Shinsuke Imai, Hiroshi Sawada, Hidehiko Kumagai, and Haruo Seto. The Biosynthetic Pathway of Curcuminoid in Turmeric (*Curcuma longa*) as Revealed by <sup>13</sup>C-Labeled Precursors. *Bio-science, Biotechnology, and Biochemistry*, Vol. 72, No. 7, pp. 1789–1798, 2008.
- [44] Yohei Katsuyama, Tomoko Kita, Nobutaka Funa, and Sueharu Horinouchi. Curcuminoid Biosynthesis by Two Type III Polyketide Synthases in the Herb *Curcuma longa*. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 284, No. 17, pp. 11160–11170, 2009.
- [45] Bradley S. Moore, Christian Hertweck, Jörn N. Hopke, Miho Izumikawa, John A. Kalaitzis, George Nilsen, Thomas O’Hare, Jörn Piel, Paul R. Shipley, Longkuan Xiang, Michael B. Austin, and Joseph P. Noel. Plant-like Biosynthetic Pathways in Bacteria: From Benzoic Acid to Chalcone. *Journal of Natural Products*, Vol. 65, No. 12, pp. 1956–1962, 2002.
- [46] Yohei Katsuyama, Tomoko Kita, and Sueharu Horinouchi. Identification and characterization of multiple curcumin synthases from the herb *Curcuma longa*. *FEBS Letters*, Vol. 583, No. 17, pp. 2799–2803, 2009.
- [47] Yohei Katsuyama, Ken-ichi Miyazono, Masaru Tanokura, Yasuo Ohnishi, and Sueharu Horinouchi. Structural and Biochemical Elucidation of Mechanism for Decarboxylative Condensation of  $\beta$ -Keto Acid by Curcumin Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, No. 8, pp. 6659–6668, 2011.
- [48] Roderich D. Süssmuth and Andi Mainz. Nonribosomal Peptide Synthesis—Principles and Prospects. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 56, No. 14, pp. 3770–3821, 2017.
- [49] Patrick C. Schmartz, Katja Zerbe, Khaled Abou-Hadeed, and John A. Robinson. Bis-chlorination of a hexapeptide–PCP conjugate by the halogenase involved in vancomycin biosynthesis. *Organic & Biomolecular Chemistry*, Vol. 12, No. 30, pp. 5574–5577, 2014.
- [50] Yuuki Yamada, Tomohisa Kuzuyama, Mamoru Komatsu, Kazuo Shin-ya, Satoshi Omura, David E. Cane, and Haruo Ikeda. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Vol. 112, No. 3, pp. 857–862, 2015.
- [51] Ekaterina V. Tarasova, Natalia A. Luchnikova, Victoria V. Grishko, and Irina B. Ivshina. Actinomycetes as Producers of Biologically Active Terpenoids: Current Trends and Patents. *Pharmaceuticals*, Vol. 16, No. 6, p. 872, 2023.
- [52] Paul G. Arnison, Mervyn J. Bibb, Gabriele Bierbaum, Albert A. Bowers, Tim S. Bugni, Grzegorz Bulaj, Julio A. Camarero, Dominic J. Campopiano, Gregory L. Challis, Jon Clardy, Paul D. Cotter, David J. Craik, Michael Dawson, Elke Dittmann, Stefano Donadio, Pieter C. Dorrestein, Karl-Dieter Entian,

- Michael A. Fischbach, John S. Garavelli, Ulf Göransson, Christian W. Gruber, Daniel H. Haft, Thomas K. Hemscheidt, Christian Hertweck, Colin Hill, Alexander R. Horswill, Marcel Jaspars, Wendy L. Kelly, Judith P. Klinman, Oscar P. Kuipers, A. James Link, Wen Liu, Mohamed A. Marahiel, Douglas A. Mitchell, Gert N. Moll, Bradley S. Moore, Rolf Müller, Satish K. Nair, Ingolf F. Nes, Gillian E. Norris, Baldomero M. Olivera, Hiroyasu Onaka, Mark L. Patchett, Joern Piel, Martin J. T. Reaney, Sylvie Rebuffat, R. Paul Ross, Hans-Georg Sahl, Eric W. Schmidt, Michael E. Selsted, Konstantin Severinov, Ben Shen, Kaarina Sivonen, Leif Smith, Torsten Stein, Roderich D. Süssmuth, John R. Tagg, Gong-Li Tang, Andrew W. Truman, John C. Vederas, Christopher T. Walsh, Jonathan D. Walton, Silke C. Wenzel, Joanne M. Willey, and Wilfred A. van der Donk. Ribosomally synthesized and post-translationally modified peptide natural products: Overview and recommendations for a universal nomenclature. *Natural Product Reports*, Vol. 30, No. 1, pp. 108–160, 2012.
- [53] Katja Siegers, Stefan Heinzmann, and Karl-Dieter Entian. Biosynthesis of Lantibiotic Nisin: POSTTRANSLATIONAL MODIFICATION OF ITS PREPEPTIDE OCCURS AT A MULTIMERIC MEMBRANE-ASSOCIATED LANTHIONINE SYNTHETASE COMPLEX (\*). *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 271, No. 21, pp. 12294–12301, 1996.
- [54] Chan-Ick Cheigh and Yu-Ryang Pyun. Nisin Biosynthesis and its Properties. *Biotechnology Letters*, Vol. 27, No. 21, pp. 1641–1648, 2005.
- [55] Antonino Mavaro, André Abts, Patrick J. Bakkes, Gert N. Moll, Arnold J. M. Driessen, Sander H. J. Smits, and Lutz Schmitt. Substrate Recognition and Specificity of the NisB Protein, the Lantibiotic Dehydratase Involved in Nisin Biosynthesis\*. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 286, No. 35, pp. 30552–30560, 2011.
- [56] Marnix H. Medema, Renzo Kottmann, Pelin Yilmaz, Matthew Cummings, John B. Biggins, Kai Blin, Irene de Bruijn, Yit Heng Chooi, Jan Claesen, R. Cameron Coates, Pablo Cruz-Morales, Srikanth Duddela, Stephanie Düsterhus, Daniel J. Edwards, David P. Fewer, Neha Garg, Christoph Geiger, Juan Pablo Gomez-Escribano, Anja Greule, Michalis Hadjithomas, Anthony S. Haines, Eric J. N. Helfrich, Matthew L. Hillwig, Keishi Ishida, Adam C. Jones, Carla S. Jones, Katrin Jungmann, Carsten Kegler, Hyun Uk Kim, Peter Kötter, Daniel Krug, Joleen Masschelein, Alexey V. Melnik, Simone M. Mantovani, Emily A. Monroe, Marcus Moore, Nathan Moss, Hans-Wilhelm Nützmann, Guohui Pan, Amrita Pati, Daniel Petras, F. Jerry Reen, Federico Rosconi, Zhe Rui, Zhenhua Tian, Nicholas J. Tobias, Yuta Tsunematsu, Philipp Wiemann, Elizabeth Wyckoff, Xiaohui Yan, Grace Yim, Fengan Yu, Yunchang Xie, Bertrand Aigle, Alexander K. Apel, Carl J. Balibar, Emily P. Balskus, Francisco Barona-Gómez, Andreas Bechthold, Helge B. Bode, Rainer Borriss, Sean F. Brady, Axel A. Brakhage, Patrick Caffrey, Yi-Qiang Cheng, Jon Clardy, Russell J. Cox, René De Mot, Stefano Donadio, Mohamed S. Donia, Wilfred A. van der Donk, Pieter C. Dorrestein, Sean Doyle, Arnold J. M. Driessen, Monika Ehling-Schulz, Karl-Dieter Entian, Michael A. Fischbach, Lena Gerwick, William H. Gerwick, Harald Gross, Bertolt Gust, Christian Hertweck, Monica Höfte, Susan E. Jensen, Jianhua Ju, Leonard Katz, Leonard Kaysser, Jonathan L. Klassen, Nancy P. Keller, Jan Kormanec, Oscar P. Kuipers, Tomohisa Kuzuyama, Nikos C. Kyrpides, Hyung-Jin Kwon, Sylvie Lautru, Rob Lavigne, Chia Y. Lee, Bai Linquan, Xinyu Liu, Wen Liu, Andriy Luzhetskyy, Taifo Mahmud, Yvonne Mast, Carmen Méndez, Mikko Metsä-Ketelä, Jason Micklefield, Douglas A. Mitchell, Bradley S. Moore, Leonilde M. Moreira, Rolf Müller, Brett A. Neilan, Markus Nett, Jens Nielsen, Fergal O’Gara, Hideaki Oikawa, Anne Osbourn, Marcia S. Osburne, Bo-

- hdan Ostash, Shelley M. Payne, Jean-Luc Pernodet, Miroslav Petricek, Jörn Piel, Olivier Ploux, Jos M. Raaijmakers, José A. Salas, Esther K. Schmitt, Barry Scott, Ryan F. Seipke, Ben Shen, David H. Sherman, Kaarina Sivonen, Michael J. Smanski, Margherita Sosio, Evi Stegmann, Roderich D. Süssmuth, Kapil Tahlan, Christopher M. Thomas, Yi Tang, Andrew W. Truman, Muriel Viaud, Jonathan D. Walton, Christopher T. Walsh, Tilmann Weber, Gilles P. van Wezel, Barrie Wilkinson, Joanne M. Willey, Wolfgang Wohlleben, Gerard D. Wright, Nadine Ziemert, Changsheng Zhang, Sergey B. Zotchev, Rainer Breitling, Eriko Takano, and Frank Oliver Glöckner. Minimum Information about a Biosynthetic Gene cluster. *Nature Chemical Biology*, Vol. 11, No. 9, pp. 625–631, 2015.
- [57] Marnix H. Medema, Kai Blin, Peter Cimermanic, Victor de Jager, Piotr Zakrzewski, Michael A. Fischbach, Tilmann Weber, Eriko Takano, and Rainer Breitling. antiSMASH: Rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Research*, Vol. 39, pp. W339–W346, 2011.
- [58] Karen Clark, Ilene Karsch-Mizrachi, David J. Lipman, James Ostell, and Eric W. Sayers. GenBank. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44, No. D1, pp. D67–D72, 2016.
- [59] GenBank prokaryotes.txt file (2023/12/16 downloaded).
- [60] Stephan Brinkmann, Michael Kurz, Maria A. Patras, Christoph Hartwig, Michael Marner, Benedikt Leis, André Billion, Yolanda Kleiner, Armin Bauer, Luigi Toti, Christoph Pöverlein, Peter E. Hammann, Andreas Vilcinskis, Jens Glaeser, Marius Spohn, and Till F. Schäberle. Genomic and Chemical Decryption of the Bacteroidetes Phylum for Its Potential to Biosynthesize Natural Products. *Microbiology Spectrum*, Vol. 10, No. 3, pp. e02479–21, 2022.
- [61] Reiko Ueoka, Agneya Bhushan, Silke I. Probst, Walter M. Bray, R. Scott Lokey, Roger G. Linington, and Jörn Piel. Genome-Based Identification of a Plant-Associated Marine Bacterium as a Rich Natural Product Source. *Angewandte Chemie International Edition*, Vol. 57, No. 44, pp. 14519–14523, 2018.
- [62] Silke C. Wenzel and Rolf Müller. Myxobacteria—‘microbial factories’ for the production of bioactive secondary metabolites. *Molecular BioSystems*, Vol. 5, No. 6, pp. 567–574, 2009.
- [63] Pedro N. Leão, Niclas Engene, Agostinho Antunes, William H. Gerwick, and Vitor Vasconcelos. The chemical ecology of cyanobacteria. *Natural Product Reports*, Vol. 29, No. 3, pp. 372–391, 2012.
- [64] Karin Kleigrew, Lena Gerwick, David H. Sherman, and William H. Gerwick. Unique marine derived cyanobacterial biosynthetic genes for chemical diversity. *Natural Product Reports*, Vol. 33, No. 2, pp. 348–364, 2016.
- [65] Ting Ding, Luo-Jie Yang, Wei-Dong Zhang, and Yun-Heng Shen. The secondary metabolites of rare actinomycetes: Chemistry and bioactivity. *RSC Advances*, Vol. 9, No. 38, pp. 21964–21988, 2019.
- [66] Richa Salwan and Vivek Sharma. Molecular and biotechnological aspects of secondary metabolites in actinobacteria. *Microbiological Research*, Vol. 231, p. 126374, 2020.
- [67] Chantal D. Bader, Fabian Panter, and Rolf Müller. In depth natural product discovery - Myxobacterial strains that provided multiple secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, Vol. 39, p. 107480, 2020.
- [68] Mudasir Ahmad Bhat, Awdhesh Kumar Mishra, Mujtaba Aamir Bhat, Mohammad Iqbal Banday, Ommer Bashir, Irfan A. Rather, Safikur Rahman, Ali Asghar Shah, and Arif Tasleem Jan. Myxobacteria as a Source of New Bioactive Compounds: A Perspective Study. *Pharmaceutics*, Vol. 13, No. 8, p. 1265, 2021.
- [69] *Dictionary of Natural Products on USB*. CRC Press, (ver. 30.1) edition, 2021.

- [70] Reiko Ueoka, Philipp Sondermann, Stefan Leopold-Messer, Yizhou Liu, Rei Suo, Agneya Bhushan, Lida Vadakumchery, Ute Greczmiel, Yoko Yashiroda, Hiromi Kimura, Shinichi Nishimura, Yojiro Hoshikawa, Minoru Yoshida, Annette Oxenius, Shigeki Matsunaga, R. Thomas Williamson, Erick M. Carreira, and Jörn Piel. Genome-based discovery and total synthesis of janustatins, potent cytotoxins from a plant-associated bacterium. *Nature Chemistry*, Vol. 14, No. 10, pp. 1193–1201, 2022.
- [71] *Dictionary of Natural Products on DVD*. CRC Press, 2016.
- [72] Hiroyuki Ikeda, Nobuaki Matsumori, Makoto Ono, Akinori Suzuki, Akira Isogai, Hiromichi Nagasawa, and Shohei Sakuda. Absolute Configuration of Aflastatin A, a Specific Inhibitor of Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus*. *The Journal of Organic Chemistry*, Vol. 65, No. 2, pp. 438–444, 2000.
- [73] Adam P. Michael, Emily J. Grace, Mike Kotiw, and Russell A. Barrow. Ravenic Acid, a New Tetramic Acid Isolated from a Cultured Microfungus, *Penicillium* sp. *Journal of Natural Products*, Vol. 65, No. 9, pp. 1360–1362, 2002.
- [74] Anokha S. Ratnayake, Rohan A. Davis, Mary Kay Harper, Charles A. Veltri, Cynthia D. Andjelic, Louis R. Barrows, and Chris M. Ireland. Aurantosides G, H, and I: Three New Tetramic Acid Glycosides from a Papua New Guinea *Theonella* s *winhoei*. *Journal of Natural Products*, Vol. 68, No. 1, pp. 104–107, 2005.
- [75] Quynh Pham Bao Nguyen, Jae Nyoung Kim, and Taek Hyeon Kim. S-Benzyl isothiuronium chloride as a recoverable organocatalyst for the reduction of conjugated nitroalkenes with Hantzsch ester. *Tetrahedron*, Vol. 68, No. 32, pp. 6513–6516, 2012.
- [76] Fujinori Hanawa, Satoshi Tahara, and G. H. Neil Towers. Antifungal nitro compounds from Skunk Cabbage ( *Lysichitum americanum* ) leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry*, Vol. 53, No. 1, pp. 55–58, 2000.
- [77] Shanren Li, Xiuli Wu, Limei Zhang, Yuemao Shen, and Liangcheng Du. Activation of a Cryptic Gene Cluster in *Lysobacter enzymogenes* Reveals a Module/Domain Portable Mechanism of Nonribosomal Peptide Synthetases in the Biosynthesis of Pyrrolopyrazines. *Organic Letters*, Vol. 19, No. 19, pp. 5010–5013, 2017.
- [78] Jack R. Koransky, Stephen D. Allen, and V. R. Dowell, Jr. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 35, No. 4, pp. 762–765, 1978.
- [79] Blaire Steven, Min Qun Chen, Charles W. Greer, Lyle G. Whyte, and Thomas D. Niederberger. *Tumebacillus Permanentifrigoris* gen. nov., sp. nov., an aerobic, spore-forming bacterium isolated from Canadian high Arctic permafrost. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 58, No. 6, pp. 1497–1501, 2008.
- [80] Sang-Hoon Baek, Yingshun Cui, Sun-Chang Kim, Chang-Hao Cui, Chengri Yin, Sung-Taik Lee, and Wan-Taek Im. *Tumebacillus Ginsengisoli* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 61, No. 7, pp. 1715–1719, 2011.
- [81] Qingyan Wang, Nengzhong Xie, Yan Qin, Naikun Shen, Jing Zhu, Huizhi Mi, and Ribo Huang. *Tumebacillus Flagellatus* sp. nov., an  $\alpha$ -amylase/pullulanase-producing bacterium isolated from cassava wastewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 63, No. Pt\_9, pp. 3138–3142, 2013.
- [82] Yu-Fan Wu, Bo Zhang, Peng Xing, Qing-Long Wu, and Shuang-Jiang Liu. *Tumebacillus Algifaecis*

- sp. nov., isolated from decomposing algal scum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 65, No. Pt\_7, pp. 2194–2198, 2015.
- [83] Jihee Her, Sathiyaraj Srinivasan, and Sang-Seob Lee. *Tumebacillus Luteolus* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 65, No. Pt\_11, pp. 4107–4112, 2015.
- [84] Jong-Hwa Kim and Wonyong Kim. *Tumebacillus Soli* sp. nov., isolated from non-rhizosphere soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 66, No. 6, pp. 2192–2197, 2016.
- [85] Hojun Sung, Hyun Sik Kim, June-Young Lee, Woorim Kang, Pil Soo Kim, Dong-Wook Hyun, Euon Jung Tak, Mi-Ja Jung, Ji-Hyun Yun, Min-Soo Kim, Na-Ri Shin, Tae Woong Whon, Jeong Rae Rho, Sun Duk Park, Hyung Eun Shim, and Jin-Woo Bae. *Tumebacillus Avium* sp. nov., isolated from the gut of a cinereous vulture, *Aegypius monachus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 68, No. 5, pp. 1659–1664, 2018.
- [86] Kai Blin, Simon Shaw, Katharina Steinke, Rasmus Villebro, Nadine Ziemert, Sang Yup Lee, Marnix H Medema, and Tilmann Weber. antiSMASH 5.0: Updates to the secondary metabolite genome mining pipeline. *Nucleic Acids Research*, Vol. 47, No. W1, pp. W81–W87, 2019.
- [87] *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 30th edition, 2020.
- [88] Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Alan Filipinski, and Sudhir Kumar. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 30, No. 12, pp. 2725–2729, 2013.
- [89] Juchenga Zhang, Xueqiong Yang, Hao Zhou, Yabin Yang, and Zhongtao Ding. New Natural Products of Rare *Actinomycetes* from 2006 to 2018. *Chinese Journal of Organic Chemistry*, Vol. 39, No. 4, p. 982, 2019.
- [90] Jorge C. Navarro-Muñoz, Nelly Selem-Mojica, Michael W. Mullooney, Satria A. Kautsar, James H. Tryon, Elizabeth I. Parkinson, Emmanuel L. C. De Los Santos, Marley Yeong, Pablo Cruz-Morales, Sahar Abubucker, Arne Roeters, Wouter Lokhorst, Antonio Fernandez-Guerra, Luciana Teresa Dias Capelini, Anthony W. Goering, Regan J. Thomson, William W. Metcalf, Neil L. Kelleher, Francisco Barona-Gomez, and Marnix H. Medema. A computational framework to explore large-scale biosynthetic diversity. *Nature Chemical Biology*, Vol. 16, No. 1, pp. 60–68, 2020.
- [91] Erko Stackebrandt. Taxonomic parameters revisited: Tarnished gold standards. *Microbial Today*, Vol. 33, p. 152, 2006.
- [92] Petr Brázda, Lukáš Palatinus, and Martin Babor. Electron diffraction determines molecular absolute configuration in a pharmaceutical nanocrystal. *Science*, Vol. 364, No. 6441, pp. 667–669, 2019.
- [93] Bo Wang and Yiqing Lin. Absolute configuration determination of SMTP-7 via microcrystal electron diffraction (MicroED). *Chemical Communications*, Vol. 58, No. 94, pp. 13071–13074, 2022.
- [94] Paul Klar, Yasar Krysiak, Hongyi Xu, Gwladys Steciuk, Jung Cho, Xiaodong Zou, and Lukas Palatinus. Chirality and accurate structure models by exploiting dynamical effects in continuous-rotation 3D ED data, 2021.
- [95] Yoshihiro Watanabe, Shuhei Takahashi, Sho Ito, Toshiyuki Tokiwa, Yoshihiko Noguchi, Haruki Azami, Hiroki Kojima, Mayuka Higo, Sayaka Ban, Kenichiro Nagai, Tomoyasu Hirose, Toshiaki Sunazuka, Takashi Yaguchi, Kenichi Nonaka, and Masato Iwatsuki. Hakuhybotrol, a polyketide produced by Hy-

- pomyces pseudocorticicola, characterized with the assistance of 3D ED/MicroED. *Organic & Biomolecular Chemistry*, Vol. 21, No. 11, pp. 2320–2330, 2023.
- [96] Ann C. Horan, Marcia C. Shearer, Vinod Hegde, Martha L. Beyazova, Beverly C. Brodsky, Arthur King, Raymond Berrie, Kathleen Cardaci, and Maxwell Nimeck. A Family of Novel Macrocyclic Lactones, the Saccharocarcons Produced by *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *antibiotica* I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Properties. *The Journal of Antibiotics*, Vol. 50, No. 2, pp. 119–125, 1997.
- [97] Vinod R. Hegde, Mahesh G. Patel, Pradip R. Das, Birendra Pramanik, and Mohindar S. Puar. A Family of Novel Macrocyclic Lactones, the Saccharocarcons Produced by *Saccharothrix aerocolonigenes* subsp. *antibiotica* II. Physico-chemical Properties and Structure Determination. *The Journal of Antibiotics*, Vol. 50, No. 2, pp. 126–134, 1997.
- [98] Xin-Ying Jia, Zhen-Hua Tian, Lei Shao, Xu-Dong Qu, Qun-Fei Zhao, Jian Tang, Gong-Li Tang, and Wen Liu. Genetic Characterization of the Chlorothricin Gene Cluster as a Model for Spirotetronate Antibiotic Biosynthesis. *Chemistry & Biology*, Vol. 13, No. 6, pp. 575–585, 2006.
- [99] Laura Vieweg, Sebastian Reichau, Rainer Schobert, Peter F. Leadlay, and Roderich D. Süßmuth. Recent advances in the field of bioactive tetronates. *Natural Product Reports*, Vol. 31, No. 11, pp. 1554–1584, 2014.
- [100] Nuala A. O’Leary, Mathew W. Wright, J. Rodney Brister, Stacy Ciufu, Diana Haddad, Rich McVeigh, Bhanu Rajput, Barbara Robbertse, Brian Smith-White, Danso Ako-Adjei, Alexander Astashyn, Azat Badretdin, Yiming Bao, Olga Blinkova, Vyacheslav Brover, Vyacheslav Chetvernin, Jinna Choi, Eric Cox, Olga Ermolaeva, Catherine M. Farrell, Tamara Goldfarb, Tripti Gupta, Daniel Haft, Eneida Hatcher, Wratkan Hlavina, Vinita S. Joardar, Vamsi K. Kodali, Wenjun Li, Donna Maglott, Patrick Masterson, Kelly M. McGarvey, Michael R. Murphy, Kathleen O’Neill, Shashikant Pujar, Sanjida H. Rangwala, Daniel Rausch, Lillian D. Riddick, Conrad Schoch, Andrei Shkeda, Susan S. Storz, Hanzhen Sun, Francoise Thibaud-Nissen, Igor Tolstoy, Raymond E. Tully, Anjana R. Vatsan, Craig Wallin, David Webb, Wendy Wu, Melissa J. Landrum, Avi Kimchi, Tatiana Tatusova, Michael DiCuccio, Paul Kitts, Terence D. Murphy, and Kim D. Pruitt. Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: Current status, taxonomic expansion, and functional annotation. *Nucleic Acids Research*, Vol. 44, No. D1, pp. D733–D745, 2016.
- [101] Kai Blin, Simon Shaw, Alexander M Kloosterman, Zach Charlop-Powers, Gilles P van Wezel, Marnix H Medema, and Tilmann Weber. antiSMASH 6.0: Improving cluster detection and comparison capabilities. *Nucleic Acids Research*, Vol. 49, No. W1, pp. W29–W35, 2021.
- [102] Brad Chapman and Jeffrey Chang. Biopython: Python tools for computational biology. *ACM SIGBIO Newsletter*, Vol. 20, No. 2, pp. 15–19, 2000.
- [103] Stephen F. Altschul, Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 215, No. 3, pp. 403–410, 1990.
- [104] G. M. Sheldrick. Crystal structure refinement with SHELXL. *Acta Crystallographica Section C: Structural Chemistry*, Vol. 71, No. 1, pp. 3–8, 2015.
- [105] O. V. Dolomanov, L. J. Bourhis, R. J. Gildea, J. A. K. Howard, and H. Puschmann. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *Journal of Applied Crystallography*, Vol. 42, No. 2, pp. 339–341, 2009.
- [106] Yuta Kikuchi, Miku Kawashima, Masato Iwatsuki, Aoi Kimishima, Hayama Tsutsumi, Yukihiro Asami, and Yuki Inahashi. Comprehensive analysis of biosynthetic gene clusters in bacteria and discovery of

*Tumebacillus* as a potential producer of natural products. *The Journal of Antibiotics*, Vol. 76, No. 6, pp. 316–323, 2023.