

平成17年度科学研究費補助金（基盤研究（S））研究状況報告書

ふりがな（ローマ字）		EBIZUKA YUTAKA					
①研究代表者名氏		海老塚 豊		②所属研究機関・部局・職		東京大学・大学院薬学系研究科・教授	
③研究課題名	和文	機能ゲノム学的戦略による分子多様性の開拓					
	英文	Functional Genomics Approach to Exploiting Molecular Diversity					
④研究経費		平成15年度	平成16年度	平成17年度	平成18年度	平成19年度	総合計
17年度以降は内約額 金額単位：千円		15,400	29,300	9,000	9,600	9,900	73,200
⑤研究組織（研究代表者及び研究分担者）							
氏名	所属研究機関・部局・職	現在の専門	役割分担（研究実施計画に対する分担事項）				
海老塚 豊	東京大学・大学院薬学系研究科・教授	天然物化学	研究の統括、基質類縁体のデザインおよび合成、新機能酵素のデザインと評価 新規 Type-I PKSのクローニングと機能解析、酵素タンパクの大量発現 新規OSCのクローニングと機能解析、構造情報に基づく基質生成物特異性変換				
藤井 勲	東京大学・大学院薬学系研究科・助教授	天然物化学					
渋谷 雅明	東京大学・大学院薬学系研究科・助教授	天然物化学					
海外共同研究者 成 忠基	韓国全南大学校・薬学大学・教授	生薬学	骨格修飾酵素遺伝子の探索と異種発現による機能同定				
⑥当初の研究目的（交付申請書に記載した研究目的を簡潔に記入してください。）							
<p>微生物や植物の生産する天然物は、医薬品をはじめとする有用物質の探索源、供給源として最も有望視されている。それら天然物の構造多様性は、多段階の酵素反応からなる分岐的な生合成経路により創出されている。本研究においては、天然物の中でも最も構造多様性に富むポリケタイドおよびトリテルペンの基本骨格構築にかかわる生合成酵素を取り上げ、有機化学及び分子生物学的手法を駆使し、精密な構造および機能解析を基盤とした分子多様性の創出を試みる。</p> <p>まず、①植物・微生物のゲノム情報を活用し、効率的に新規生合成酵素遺伝子をクローニングし、②個々の酵素機能を異種生物における発現により同定する。③組み換え酵素タンパクの <i>in vitro</i> の反応により基質生成物特異性を詳細に解析する。この際、非生理的基質や合成基質類縁体の適用により、潜在酵素機能を最大限に引きだし分子多様性の拡大を計る。ついで④大量異種発現した酵素タンパクを精製・結晶化し、X線結晶構造解析を行う。⑤結晶の得られない酵素については、機能を異にする相同酵素間でのキメラの作成や点変異酵素の作成により、活性部位構造についての情報を得る。さらに、⑥得られた活性部位構造情報をもとに、基質・生成物特異性の改変を試みる。⑦これらの結果を総合的に解析し、基質・生成物・反応特異性を支配している基本原理を化学的に記述し、未だ自然界から得られていない「超天然物」とも言うべき「非天然型天然物」を生成する人工酵素を合理的にデザイン作製する。このことは、これら生合成酵素の自然界における未来の機能分化を先取りすることに他ならない。以上を総括し、遺伝子組み換え酵素による実用的な有用化合物の供給系の開発、また新機能物質探索源となる人工分子ライブラリー構築への可能性を検証する。</p>							

⑦これまでの研究経過 (研究の進捗状況について、必要に応じて図表等を用いながら、具体的に記入してください。)

1) トリテルペン合成酵素

初年度から 2 年間にわたり複数のトリテルペン生産植物から、トリテルペン合成酵素のクローニングを行った。カボチャ(*Cucurbita pepo*)からクルビタシン生合成に関与するクルビタジエノール合成酵素、全ゲノム配列が決定されたシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)から、複数の閉環産物を与えるクローン、閉環後開裂した生成物を与えるクローン、三環性の生成物を与えるクローンなどを、そして、セイヨウタンポポ(*Taraxacum officinale*)から計 10 種のトリテルペン合成酵素のクローンを得た。得られた酵素の機能解析から、反応の終了がプロトンの引き抜きだけでなく水の添加でも生じ、水の添加の反応の立体化学の制御は酵素によって厳密に制御されていることを見いだした。また、トリテルペン合成酵素は炭素-炭素結合形成反応とメチル基及びヒドリドの転位反応により骨格を創出するのに加え、環状構造形成後、炭素-炭素結合の開裂反応も行うことも見いだした。これらの知見は、本年度から計画している酵素機能の改変による天然物の分子多様性の拡大にとって有用な知見であると考えている。また、セイヨウタンポポのクローンの中には、これまでセイヨウタンポポから単離の報告のないアキレオールなどのトリテルペンを生成物として与えるクローンも 3 種含まれていた。この結果は、機能ゲノム学的アプローチによる新規化合物の探索の可能性を示すものと考えられる。次に、新規有用物質の生産及び反応機構の解明を目的に、 β -アミリン合成酵素の基質アナログに対する反応の解析を行った。末端二重結合を還元したもの、二つの末端メチル基を欠損したもの、及び、メチリデン基を付加させたもの(MOS)などの基質アナログを化学合成し、エンドウ由来 β -アミリン合成酵素と反応させた。その結果、MOS 以外の基質アナログは基質として認識され bacchar-12-en-3 β -ol などの複数の非天然型新規環状ポリプレノイド位置異性体の生成が高収率で認められた。また、化学合成した安定同位体標識基質を反応させ、生成物を詳細に検討したところ、本来の β -アミリンの生成の際に経る反応中間体と同型のビスノルバックレニル 1 級カチオンの代わりに、熱力学的により安定で E 環がよりひずみの少ない 6 員環構造をとるビスノルオレアニル 2 級カチオンの生成を経て進行することが明らかとなった。一方、MOS は阻害剤として働き、しかも放射標識した MOS を用いた実験から MOS が酵素タンパクと結合することが明らかとなった。この知見はペプチドマッピングによる活性部位を構成するアミノ酸の同定の可能性を示唆するものである。

2) 糸状菌ポリケタイド生合成酵素

還元型ポリケタイド化合物ソラナピロンを生産するバレイシヨ夏疫病菌 *Alternaria solani* より新規デカケタイド化合物アルタナピロンの合成酵素遺伝子 *pksN* を既に取得しているが、さらに 2 種の還元型ポリケタイド合成酵素(PKS)遺伝子 *pksF*、*pksK* をクローニングした。*pksF* 形質転換体は C₂₂、C₂₃ の 2 種のポリエン系ポリケタイドを生産し、その構造解析の結果から、PKSF は 10 回の縮合反応後の β -カルボニルの還元の有無により、C₂₂ ポリエンピロンと C₂₃ ポリエンフェノール化合物を生成するものと考えられる。また、*A. solani* よりさらに 4 種の新規 PKS 遺伝子をクローニングし、現在、異種糸状菌発現系を用いた機能同定を進めている。ヒト DNA トポイソメラーゼ I 阻害物質トポピロン類を生産する糸状菌 *Phoma* sp. BAUA 2861 株よりクローニングした新規芳香族 PKS 遺伝子 *pnk2* が、トポピロン生合成のノナケタイド合成酵素をコードすることを確認した。これは糸状菌の芳香族型ノナケタイド PKS として同定された最初の例であり、PKS による鎖長制御機構解明への足掛りとなることが期待される。アスペルギルス症原因菌 *Aspergillus fumigatus* のヒトへの感染要因となっている DHN-メラニンの生合成において、ヘプタケタイドであるナフトピロン YWA1 からペンタケタイドであるテトラヒドロキシナフタレン T4HN への骨格変換の鍵反応を触媒する酵素 Ayg1p について、大量発現、精製を行い、精製酵素を用いて本酵素がヘプタケタイド YWA1 の側鎖アシル基とナフタレン環の炭素-炭素結合を加水分解的に開裂し、アセト酢酸と T4HN を生成することを実証した。また、本酵素の大腸菌での発現系を確立し、部位特異的変異体の解析から、セリン残基が活性中心として働き、アシル化酵素中間体を経る反応機構であることを明らかにした。本酵素 Ayg1p は polyketide shortening 反応を触媒する酵素として同定、特性化された初めての例である。また、繰り返し型タイプ I PKS である糸状菌 PKS のドメイン機能の解析を進めているが、ペンタケタイド T4HN 合成酵素 PKS1 の C 末端のクライゼンサイクラゼドメイン(CYC)の機能について、本酵素の CYC 変異体、並びにヘプタケタイドであるナフトピロン YWA1 合成酵素 WA の CYC とのキメラ体を発現させた結果、PKS1 の CYC は、WA の CYC とは異なり、クライゼン型の閉環反応だけではなく、生成物の炭素鎖長の制御にも関与することを明らかにした。さらに酵母を宿主とした繰り返し型タイプ I PKS 発現系をヘプタケタイド合成酵素 Alb1p について確立し、その CYC ドメインを単独のタンパクとして発現させ、これが Alb1p PKS の ACP 上に生成したヘプタケタイド中間体に独立した CYC 酵素として作用できることを初めて明らかにした。これは、繰り返し型タイプ I PKS の機能ドメインを単独の酵素タンパクとして発現させ、その機能を確認した初めての例である。

⑧特記事項 (これまでの研究において得られた、独創性・新規性を格段に発展させる結果あるいは可能性、新たな知見、学問的・学術的なインパクト等特記すべき事項があれば記入してください。)

1) トリテルペン合成酵素

1955年に Ruzicka らによって提唱されたイソプレン則以来、トリテルペンの骨格形成機構についての研究が多く有機化学者によって精力的になされてきた。トリテルペン合成酵素は膜タンパク質であり不安定なため、酵素学的研究は遅れていたが、近年の分子生物学の進歩により、異種発現系を用いての酵素活性の検出が可能となり急速に進展した。高等植物から単離されたトリテルペン骨格は 80 種を越え、その構造の精密さから、骨格の数に対応する酵素が存在するものと考えられていたが、本研究において、シロイヌナズナを初めとして多くの植物に複数の生成物を与える多機能型酵素が存在することが明らかとなり、80 種を越えるトリテルペン骨格は、単一生成物を与える酵素と多機能型酵素の両者によって作り出されることが明らかとなった。この結果は 1 種の酵素が 1 種の生成物を与え、生成物に対応する数の酵素が存在するという従来の考え方を大きく変える新しい知見であり、学問的インパクトは非常に大きい。また、多機能型酵素の存在は、単機能型トリテルペン合成酵素が他の骨格のトリテルペンを生成物として与える潜在的能力を持つことを示唆しており、酵素の機能改変による新規トリテルペンの創出を格段に発展させるものと思われる。

また、シロイヌナズナから開裂型トリテルペンを生成物として与える酵素が見いだされたことにより、これまで生合成機構が不明であった開裂型トリテルペンの骨格が、トリテルペン合成酵素によって創りだされることが明らかとなった。この新たな知見は、トリテルペン合成酵素に起因するトリテルペン骨格の構造多様性が増大したことのみならず、トリテルペン合成酵素が炭素-炭素結合形成反応とメチル基及びヒドリドの転位反応に加えて、環状構造形成後、炭素-炭素結合の開裂反応も行うことを示しており、有機化学的インパクトが極めて大きい。

また、トリテルペン合成酵素は基質特異性が厳密であると考えられていたが、ジデメチルオキシドスクアレンやジオキシドスクアレンなどの基質類縁体が基質として反応することが明らかとなった。この知見は、今後の基質類縁体を用いた新規化合物の創出の可能性を格段に発展させるものと考えられる。

2) 糸状菌ポリケタイド合成酵素

ポリケタイド合成酵素反応において、生成物の炭素鎖長が如何に決定されるか、その制御機構を明らかにすることは、今後、反応特異性、生成物特異性の改変を目指す上で、重要な点である。バクテリアに見られるモジュール型の PKS では、モジュールの数によって縮合回数、つまり生成物の炭素鎖長が基本的に決定されるのに対し、糸状菌などの繰り返し型タイプ I PKS においては、見かけ上の繰り返し反応を制御する機構については手探りの状態であった。これまでの本研究により新たに芳香族ノナケタイド合成酵素遺伝子 *pnk2* をクローニングしたが、これにより繰り返し型タイプ I PKS として、テトラケタイドから、ペンタケタイド、ヘプタケタイド、ノナケタイド各 PKS 遺伝子を手中にすることができたことになり、今後、繰り返し型タイプ I PKS がどのように鎖長制御、縮合回数の制御をしているか解析を進める上で、必要な素材を得ることができたものと考えている。

また、ヘプタケタイド生成物をペンタケタイドに変換する polyketide shortening 反応を触媒する加水分解する初めての酵素として、*Aspergillus fumigatus* より *Ayg1p* を精製、特性化、機能解析することができた。これは PKS 反応産物に直接働きその鎖長変換反応を触媒する酵素の存在を示した初めての例であり、本酵素をポリケタイド生合成系のエンジニアリングに応用することが期待される。また、芳香族型 PKS に見いだした Claisen cyclase ドメイン(CYC)について、酵母発現系を利用することにより、単独の酵素として発現、機能することを示したが、これは繰り返し型タイプ I PKS のドメインが単独で機能することを示した最初の例であり、各芳香族型 PKS について、その CYC の精製、特性化、構造解析に道を開くものであり、CYC ドメイン酵素を利用した閉環様式の変換などへの応用が考えられる。

高脂血剤ロバスタチンを始めとして、繰り返し型タイプ I PKS 反応中に C-メチル化を伴い生成する還元型ポリケタイド類が知られているが、PKS のメチルトランスフェラーゼドメインによる C-メチル化の位置特異性を決定する機構は不明であるが、今回、*Alternaria solani* より先にクローニングした *pksN* について、alternapyrone 生成において、9 回の縮合反応のうち 8 回の反応においてメチル基転移反応が生じていることを確認し、現在さらに cell-free 系を用いた検討を進めており、これら還元型 PKS におけるメチル化制御機構の解明につながるものと考えている。

- ⑨研究成果の発表状況 (この研究費による成果の発表に限り、学術誌等に発表した論文(掲載が確定しているものを含む。)の全著者名、論文名、学協会誌名、巻(号)、最初と最後のページ、発表年(西暦)、及び国際会議、学会等における発表状況について記入してください。なお、代表的な論文3件に○を、また研究代表者に下線を付してください。)
- (1) Hong Zhang, Masaaki Shibuya, Shinso Yokota and Yutaka Ebizuka: Oxidosqualene Cyclases from Cell Suspension Cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*. Molecular Evolution of Oxidosqualene Cyclases in Higher Plants. *Biol. Pharm. Bull.*, **26**, 642-650 (2003).
 - (2) Yutaka Ebizuka, Yuji Katsube, Takehiko Tsutsumi, Tetsuo Kushihiro and Masaaki Shibuya: Functional Genomics Approach to the Study of Triterpene Biosynthesis. *Pure Appl. Chem.*, **75**, 369-374 (2003).
 - (3) Koji Ichinose, Makoto Ozawa, Keiko Itou, Kanako Kunieda and Yutaka Ebizuka: Cloning, Sequencing and Heterologous Expression of the Medermycin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces* sp. AM-7161 towards Comparative Analysis of the Benzoisochromanone Gene Clusters. *Microbiology-SGM*, **149**, 1633-1645 (2003).
 - (4) Miho Izumikawa, Michio Murata, Kazuo Tachibana, Yutaka Ebizuka and Isao Fujii: Cloning of Modular Type I Polyketide Synthase Genes from Salinomycin Producing Strain of *Streptomyces albus*. *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 3401-3405 (2003).
 - (5) Gento Tsuji, Tomomi Sugahara, Isao Fujii, Yuichiro Mori, Yutaka Ebizuka, Tomonori Shiraiishi and Yasuyuki Kubo: Evidence for Involvement of Two Naphthol Reductases in the First Reduction Step of Melanin Biosynthesis Pathway of *Colletotrichum lagenarium*. *Mycol. Res.*, **107**, 854-860 (2003).
 - (6) Hiroki Maruyama, Susumu Okamoto, Yasuyuki Kubo, Gento Tsuji, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka, Keiko Furihata, Yoichi Hayakawa, Hiromichi Nagasawa and Shohei Sakuda: Isolation of Abikoviromycin and Dihydroabikoviromycin as Inhibitors of Polyketide Synthase Involved in Melanin Biosynthesis by *Colletotrichum lagenarium*. *J. Antibiotics*, **56**, 801-804 (2003).
 - (7) Shuiqin Wu, Naoharu Watanabe, Satoru Mita, Yoshihiro Ueda, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka: Two O-Methyltransferases Isolated from Flower Petals of *Rosa chinensis* var. *spontanea*. *J. Biosci. Bioeng.*, **96**, 119-128 (2003).
 - (8) Makoto Ozawa, Takaaki Taguchi, Takayuki Itoh, Yutaka Ebizuka, Kevin I. Booker-Milburn, G. Richard Stephenson and Koji Ichinose: Structure and Biosynthetic Implication of (*S*)-NHAB, a Novel Shunt Product, from a Disruptant of the *actV*FORFA Gene for Actinorhodin Biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*A3(2). *Tetrahedron*, **59**, 8793-8798 (2003).
 - (9) Yuichi Sakano, Masaaki Shibuya, Hiroshi Tomoda, Satoshi Omura and Yutaka Ebizuka: Lanopylins A1, B1, A2 and B2, Novel Lanosterol Synthase Inhibitors from *Streptomyces* sp. K99-5041. *J. Antibiotics*, **56**, 817-826 (2003).
 - (10) Ikuro Abe, Yuichi Sakano, Hideya Tanaka, Weiwei Lou, Hiroshi Noguchi, Masaaki Shibuya and Yutaka Ebizuka: Enzymatic Cyclization of 22,23-Dihydro-2,3-oxidosqualene into Euph-7-en- β -ol and Bacchar-12-en- β -ol by Recombinant β -Amyrin Synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 3426-3427 (2004).
 - (11) Shuiqin Wu, Naoharu Watanabe, Satoru Mita, Hideo Dohra, Yoshihiro Ueda, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka: The Key Role of Phloroglucinol O-Methyltransferase in the Biosynthesis of *Rosa chinensis* Volatile 1,3,5-Trimethoxybenzene. *Plant Physiology*, **135**, 95-102 (2004).
 - (12) Ikuro Abe, Yuichi Sakano, Megumi Sodeyama, Hideya Tanaka, Hiroshi Noguchi, Masaaki Shibuya and Yutaka Ebizuka: Mechanism and Stereochemistry of Enzymatic Cyclization of 24,30-Bisnor-2,3-oxidosqualene by Recombinant β -Amyrin Synthase. *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 6880-6881 (2004).
 - (13) Masaaki Shibuya, Shinya Adachi and Yutaka Ebizuka: Cucurbitadienol Synthase, the First Committed Enzyme for Cucurbitacin Biosynthesis, is a Distinct Enzyme from Cycloartenol Synthase for Phytosterol Biosynthesis. *Tetrahedron*, **60**, 6995-7003 (2004).
 - (14) Hiroaki Hayashi, Pengyu Huang, Shinya Katagiri, Kenichiro Inoue, Shinya Adachi, Masaaki Shibuya and Yutaka Ebizuka: Differential Expression of Three Oxidosqualene Cyclase mRNAs in *Glycyrrhiza glabra*. *Biol. Pharm. Bull.*, **27**, 1086-1092 (2004).
 - (15) Akira Watanabe and Yutaka Ebizuka: Unprecedented Mechanism of Chain Length Determination in Fungal Aromatic Polyketide Synthases. *Chem. & Biol.*, **11**, 1101-1106 (2004).
 - (16) Miyuki Otsuka, Koji Ichinose, Isao Fujii and Yutaka Ebizuka: Cloning, Sequencing, and Functional Analysis of an Iterative Type I Polyketide Synthase Gene Cluster for Biosynthesis of the Antitumor Chlorinated Polyenone Neocarzilin in *Streptomyces carzinostaticus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 3468-3476 (2004).
 - (17) Yuichi Sakano, Masaaki Shibuya, Yuichi Yamaguchi, Rokuro Masuma, Hiroshi Tomoda, Satoshi Omura and Yutaka Ebizuka: Epohelmims A and B, Novel Lanosterol Synthase Inhibitors from a Fungal Strain FKI-0929. *J. Antibiotics*, **57**, 564-568 (2004).
 - (18) Takaaki Taguchi, Kanako Kunieda, Mayuko Takeda-Shitaka, Daisuke Takaya, Noriaki Kawano, Meriel R. Kimberley, Kevin I. Booker-Milburn, G. Richard Stephenson, Hideaki Umeyama, Yutaka Ebizuka and Koji Ichinose: Remarkably Different Structures and Reactions of Ketoreductases for the Opposite Stereochemical Control in the Biosynthesis of BIQ Antibiotics. *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 5917-5927 (2004).
 - (19) Isao Fujii, Yoshinori Yasuoka, Huei-Fung Tsai, Yun C. Chang, K. J. Kwon-Chung and Yutaka Ebizuka: Hydrolytic Polyketide Shortening by Ayl1p, a Novel Enzyme Involved in Fungal Melanin Biosynthesis. *J. Biol. Chem.*, **279**, 44613-44620 (2004).

- (20) Hisashi Noma, Hideya Tanaka, Hiroshi Noguchi, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka and Ikuro Abe: Enzymatic Formation of a Novel Unnatural Tetracyclic Sesterterpene by β -Amyrin Synthase. *Tetrahedron Lett.*, **45**, 8299-8301 (2004).
- (21) Kevin I. Booker-Milburn, Rebecca Gillan, Meriel Kimberley, Takaaki Taguchi, Koji Ichinose, G. Richard Stephenson, Yutaka Ebizuka and David A. Hopwood: Enantioselective Reduction of β -Keto-Acids with Engineered *Streptomyces coelicolor*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 1121-1125 (2005).
- (22) Rie Tanaka, Yuichi Sakano, Akito Nagatsu, Masaaki Shibuya, Yutaka Ebizuka and Yukihiro Goda: Synthesis of Digalactosyl Diacylglycerols and their Structure-inhibitory Activity on Human Lanosterol Synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 159-162 (2005).
- (23) Yuichi Sakano, Motoh Musuga, Rie Tanaka, Hiroyuki Sukanuma, Takahiro Inakuma, Masatake Toyoda, Yukihiro Goda, Masaaki Shibuya and Yutaka Ebizuka: Inhibition of Human Lanosterol Synthase by the Constituents of *Colocasia esculenta* (taro). *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 299-304 (2005).
- (24) Yasuyo Seshime, Praveen Rao Juvvadi, Isao Fujii and Katsuhiko Kitamoto: Discovery of a Novel Superfamily of Type III Polyketide Synthases in *Aspergillus oryzae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 253-260 (2005).

総説等

- (1) 海老塚豊: 8. 生合成—世界の動向と海洋天然物、I 海洋天然物化学、先端化学シリーズV、日本化学会編、丸善 (2003).
- (2) 渋谷雅明: トリテルペンサポニンの構造多様性と分子的起源、薬学雑誌, **123**, suppl. 3, 158-161 (2003).
- (3) Isao Fujii, Akira Watanabe and Yutaka Ebizuka: More Functions for Multifunctional Polyketide Synthases. *Advances in Fungal Biotechnology for Industry, Medicine and Agriculture*. (Eds. J. Tkacz & L. Lange), Chapter 6, pp. 97-125, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York (2004).
- (4) Isao Fujii, Akira Watanabe and Yutaka Ebizuka: The *Aspergillus nidulans* Polyketide Synthase WA. *Handbook of Industrial Mycology*. (Ed. Z. Ann) Chapter 18, pp. 493-514, Marcel Dekker, New York (2004).
- (5) 藤井 勲: 炭素骨格を構築するポリケタイド合成酵素、生物工学会誌, **82**, 244-247 (2004).
- (6) 海老塚豊 監訳、木内文之、藤井勲、袴塚高志、阿部郁朗、梅原薫、野口博司、渋谷雅明、市瀬浩志、宮瀬敏男 訳: 医薬品天然物化学 原書第2版 (Paul M. Dewick: Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach 2nd Edition, Wiley), 南江堂 (2004).

招待講演等

- (1) 海老塚豊: 2003. 6.10. 「天然物基本骨格合成酵素の構造と機能解析」特定領域研究 (A) 「未解明生物現象を司る鍵化学物質」成果とりまとめシンポジウム (名古屋)
- (2) Yutaka Ebizuka: 2003. 6.24. "Diverse Function of Microbial Polyketide Synthases" 5th Japan-US Seminar on Bioorganic Marine Chemistry: Biological Origins, Functions and Applications (Awaji, Japan)
- (3) 渋谷雅明: 2003.11. 7. 「トリテルペンサポニンの構造多様性と分子的起源」第14回天然薬物の開発と応用シンポジウム (仙台)
- (4) 渋谷雅明: 2004. 3.27. 「高等植物におけるトリテルペン骨格の多様性とその分子的起源」第45回日本植物生理学会年会シンポジウム (東京)
- (5) 藤井 勲: 2004. 3.29. 「糸状菌ポリケタイド合成酵素の解析と機能開発」日本薬学会第124年会 (大阪) ミニシンポジウム
- (6) Yutaka Ebizuka: 2004. 6. 1. "Functional Genomics Approach to Studying Natural Products Biosynthesis" Pharmaceutical Sciences World Congress PSWC2004 (Kyoto, Japan)
- (7) 渋谷雅明: 2004. 8.10. 「機能ゲノム学的手法によるトリテルペンの生合成研究」第22回日本植物細胞分子生物学会秋田大会・シンポジウム、秋田県立大学 (秋田)
- (8) Masaaki Shibuya: 2004. 8.28. "Structural Diversity and Molecular Origin of Triterpenes in Higher Plants" Frontiers of Bioorganic and Natural Product Chemistry: A Symposium in Honor of Professor Heinz G. Floss, University of Washington (Seattle, USA)
- (9) Masaaki Shibuya: 2004. 9.21 "Molecular Origin for Biodiversity of Triterpenes" Germany-Japan Seminar on Molecular Regulation of Plant Secondary Metabolism (Kisarazu, Japan)
- (10) Masaaki Shibuya: 2004.10. 8 "Structural Diversity and Molecular Origin of Triterpenes in Higher Plants" 50th Anniversary Symposium, Current Approaches in the New Drug Development and Life Science Research. College of Pharmacy, Chousun University (Gwangju, Korea)
- (11) Isao Fujii: 2004.10.22 "Functional Analysis of Fungal Polyketide Synthases" The Fall Conference of the Korean Society of Applied Biological Chemistry on the New Waves in Microbiology: Biodegradation, Biotransformation, Biocatalysis (Daecheon, Korea)

(12) Masaaki Shibuya: 2005. 3.30 「天然有機化合物の基本骨格形成に関する生合成研究」 125th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (Tokyo, Japan)

(13) Yutaka Ebizuka: 2005. 3.31 “Genome Mining for Novel Natural Products” 125th Annual Meeting of the Pharmaceutical Society of Japan (Tokyo, Japan)

学会発表 【2003】 ■日本放線菌学会大会 (6月、東京) 小澤誠、國枝香南子、海老塚豊、市瀬浩志、「ベンゾイソクロマンキノン系抗生物質の生合成研究(20)・BIQ 生合成遺伝子クラスター構造の比較ゲノム解析」; 田口貴章、菅野拓也、Alexander Lezhava、岡本晋、海老塚豊、越智幸三、市瀬浩志:「ベンゾイソクロマンキノン系抗生物質の生合成研究(19)-遺伝子破壊体の分析と相補実験による actVI-ORFA の機能解析」; 大塚みゆき、市瀬浩志、藤井勲、海老塚豊、「*Streptomyces carzinostaticus* 由来タイプ I 型 PKS 遺伝子クラスターの機能解析」; 市瀬浩志、D. Hoffmeister、G. Draeger、J. Rohr、A. Bechthold、「天然デオキシ糖類の生合成研究(4)- Urdamycin 生合成に関与する C-配糖化酵素 UrdGT2 の糖立体配置選択性」 ■第 21 回日本植物細胞分子生物学会大会 (8月、香川) 庄村康人、虎山一郎、喜田昭子、三木邦夫、相亭、三川潮、Dae-Yeon Suh、大利徹、西岡瑞枝、渋谷雅明、海老塚豊、「マメ科植物由来スチルベン合成酵素(STS) 蛋白の三次元構造と変異導入によるカルコン合成酵素への変換の試み」 ■2003 SIM (Society for Industrial Microbiology, Annual Meeting, Minneapolis, MN, USA, 2003. 8.) Takaaki Taguchi, Yutaka Ebizuka, Koji Ichinose, "Structure-function relationship of stereospecific ketoreductases involved in the biosynthesis of benzoishochromanequinone antibiotics" ■日本生薬学会第 50 回年会 (東京、9月)、篠崎淳一、渋谷雅明、海老塚豊、増田和夫、塩島憲治、「シダ植物由来スクアレン閉環酵素の cDNA クローニング及び機能解析」; 田中理恵、六鹿元雄、合田幸広、坂野勇一、渋谷雅明、海老塚豊、永津明人、「糖脂質のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性について」; 庄村康人、虎山一郎、喜田昭子、三木邦夫、相亭、三川潮、Dae-Yeon Suh、大利徹、西岡瑞枝、渋谷雅明、海老塚豊、「マメ科植物由来スチルベン合成酵素(STS)蛋白の三次元構造」 ■第 4 5 回天然有機化合物討論会 (京都、10月) 藤井勲、安岡良訓、原田繁春、海老塚豊、Huei-Fung Tsai、K.J. Kwon-Chung、「糸状菌ポリケタイド合成酵素の機能解析-*Aspergillus fumigatus* のテトラヒドロキシナフタレン合成酵素系」 ■5th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (Kyoto, 2003.10), Nobuyuki Kashiwa, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka, "Polyketide Synthase Genes from a Topopyrone Producing Strain of *Phoma* sp"; Ken Kasahara, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka, Hideaki Oikawa "Cloning and Functional Analysis of *Alternaria solani* Reduced-complex Type PKS Genes"; Masaaki Shibuya, Pimpimon Tansakul, Tetsuo Kushiuro, Yutaka Ebizuka, "cDNA Cloning of Dammareniol II Synthase from Hairy Root Cultures of *Panax ginseng*"; Yuichi Sakano, Masaaki Shibuya, Hiroshi Tomoda, Satoshi Omura, Yutaka Ebizuka, "Novel Lanosterol Synthase Inhibitors from Microbial Origin" ■第 3 回糸状菌分子生物学コンファレンス (東京、11月) 笠原堅、藤井勲、海老塚豊、及川英秋、「*Alternaria solani* 還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析」; 下牧重樹、吉田奈央、藤井勲、海老塚豊、及川英秋、「*Alternaria solani* の還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子 PKSN の機能解析」; 柏延之、藤井勲、海老塚豊、「*Phoma* sp. の芳香族型ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析」 ■第 14 回天然薬物の開発と応用シンポジウム (仙台、11月) 坂野勇一、渋谷雅明、供田洋、大村智、海老塚豊、「ラノステロール合成酵素阻害活性を持つ菌類代謝産物の探索研究」; 河野徳昭、瀬川雄一郎、市瀬浩志、海老塚豊、「ステロイドサポニンの生合成研究-*Costus speciosus* 由来ステロイド生合成遺伝子群の酵母発現系における再構成の試み」 ■13th International Symposium on the Biology of Actinomycetes (Melbourne, Australia, 2003.12) Koji Ichinose, Takaaki Taguchi, Susumu Okamoto, Kozo Ochi, Yutaka Ebizuka, "A functional and comparative genomic approach to understand *Streptomyces* antibiotic biosynthesis: an example of the benzoishochromanequinones"; Miyuki Otsuka, Koji Ichinose, Isao Fujii, Yutaka Ebizuka, "Cloning, sequencing, and functional analysis of iterative type I polyketide synthase gene cluster for biosynthesis of antitumor chlorinated polyenone neocarzillin in *Streptomyces carzinostaticus*"; Takaaki Taguchi, Yutaka Ebizuka, Koji Ichinose, "Structure-function relationship of ketoreductases involved in the biosynthesis of benzoishochromanequinone antibiotics in *Streptomyces*" 【2004】 ■日本薬学会第 124 年会 (大阪、4月) 田中理恵、清水賢、渋谷雅明、海老塚豊、合田幸広、「ローレル(*Laurus nobilis*) のヒト由来ラノステロール合成酵素阻害活性について」; 坂野勇一、田中秀弥、袖山恵、Lou Weiwei、野口博司、渋谷雅明、海老塚豊、阿部郎朗、「活性中心探索プローブを用いた高等植物由来オキシドスクアレン閉環酵素反応機構の解析」; 田口貴章、岡本晋、小澤誠、海老塚豊、越智幸三、市瀬浩志、「ベンゾイソクロマンキノン(BIQ)系抗生物質の生合成研究 (21) BIQ クラスターに共通に存在する推定機能未知遺伝子の機能解析」; 柏延之、藤井勲、海老塚豊、「糸状菌ポリケタイド合成酵素遺伝子の研究 (22) 「トポピロン生産菌 *Phoma* sp. の芳香族 PKS 遺伝子のクローニングと機能解析」; 笠原堅、下牧重樹、藤井勲、海老塚豊、及川英秋、「糸状菌ポリケタイド合成酵素遺伝子の研究 (21) *Alternaria solani* 還元型ポリケタイド生合成遺伝子のクローニングと機能解析」; 下牧重樹、笠原堅、藤井勲、海老塚豊、及川英秋、「糸状菌ポリケタイド合成酵素遺伝子の研究(20) *Alternaria solani* 還元型ポリケタイド生合成遺伝子 PKSN の機能解析」; 「ステロイドサポニンの生合成研究(10)-*Costus speciosus* 由来ステロール糖転移酵素の cDNA クローニング」; 星野雅輝、渋谷雅明、海老塚豊、河合賢一、城始勇、「シロイヌナズナ由来トリテルペン合成酵素 LUP1 の反応機構の解析(2)」; 土開絵里子、堤武彦、山中理代、渋谷雅明、海老塚豊、「セイヨウタンポポ由来トリテルペン合成酵素のクローニング」; 伊藤崇敬、田口貴章、海老塚豊、市瀬浩志、「ベンゾイソクロマンキノン(BIQ)系抗生物質の生合成研究(22)-actVI-ORF1 遺伝子産物による合成アナログ基質の立体特異的還元」 ■日本放線菌学会 (淡路、7月) 李愛英、海老塚豊、市瀬浩志、「ベンゾイソクロマンキノン(BIQ)系抗生物質の生合成研究 (23) -立体制御に関わるメグマイシン生合成遺伝子の機能解析」 ■第 2 回日本植物細胞分子生物学会秋田大会・シンポジウム (秋田、8月) 土開絵里子、堤武彦、山中理代、渋谷雅明、海老塚豊、「セイヨウタンポポにおけるトリテルペンの生合成研究」 ■日本生薬学会第 51 回年会 (神戸 9月) 土開絵里子、堤武彦、山中理代、渋谷雅明、海老塚豊、「セイヨウタンポポにおけるトリテルペンの生合成機構」・日本生物工学会 (名古屋、9月) 勢ノ康代、藤井勲、Praveen Rao Juvvadi、北本勝ひこ、「*Aspergillus oryzae* の新規ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析」・第 46 回天然有機化合物討論会 (広島、10月) 笠原堅、吉田奈央、下牧重樹、藤井勲、海老塚豊、及川英秋、「*Alternaria solani* 還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子のクローニングと機能解析」 ■第 4 回糸状菌分子生物学コンファレンス (仙台、11月) 笠原堅、藤井勲、海老塚豊、及川英秋、「*Alternaria solani* 還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析」; 勢ノ康代、藤井勲、Praveen Rao Juvvadi、北本勝ひこ、「麹菌 *A. oryzae* の新規ポリケタイド合成酵素遺伝子 *cysA* の機能解析」; 森口智美、藤井勲、海老塚豊、「芳香族繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素の発現と機能解析」 【2005】 ■日本薬学会第 125 回年会 (東京、3月) 土開絵里子、堤武彦、山中理代、渋谷雅明、海老塚豊、「セイヨウタンポポ由来トリテルペン合成酵素のクローニング」; 笠原堅、藤井勲、海老塚豊、及川英秋、「糸状菌ポリケタイド合成酵素遺伝子の研究(23)-*Alternaria solani* 還元型ポリケタイド合成酵素遺伝子の発現と機能解析」; 李愛英、海老塚豊、市瀬浩志、「ベンゾイソクロマンキノン (BIQ) 系抗生物質の生合成研究(24)- 立体化学制御に関わるメグマイシン生合成遺伝子の機能解析」; 伊藤崇敬、田口貴章、海老塚豊、市瀬浩志、「ベンゾイソクロマンキノン (BIQ) 系抗生物質の生合成研究(25)-actVI-ORF1 遺伝子産物 RED1 の異種発現と精製」; 森口智美、藤井勲、海老塚豊、「糸状菌ポリケタイド合成酵素遺伝子の研究(24)- 芳香族繰返し型タイプ I ポリケタイド合成酵素の発現と機能解析」; 相婷、渋谷雅明、海老塚豊、「オタネニンジン由来シクローム P450 型酸化酵素のクローニング」 ■The 23rd Fungal Genetics Conference (Asilomar, USA, 2005. 3) Yasuyo Seshime, Praveen Rao Juvvadi, Isao Fujii, Katsuhiko Kitamoto, "Identification and characterization of novel type III polyketide synthases in *Aspergillus oryzae*"