

| | |
|------|-------|
| 課題番号 | LS103 |
|------|-------|

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
実施状況報告書(平成 23 年度)**

本様式の内容は一般に公表されます

| | |
|----------------|---------------------------------------|
| 研究課題名 | ゲノム DNA の革新的発現法に基づく新規医薬品リードの網羅的獲得法の確立 |
| 研究機関・ 部局・職名 | 静岡県立大学・薬学部・准教授 |
| 氏名 | 渡辺賢二 |

1. 当該年度の研究目的

生合成遺伝子再構築

- ◆ 一種類の真菌ゲノムを鋳型とし、PCRおよび酵母菌体を用いて有用天然物（主にポリケタイド系およびペプチド系天然物）生合成遺伝子を迅速にプラスミドに組込む手法を確立する。
- ◆ 上記の実験を複数種類の真菌に関してそれぞれ行い、それぞれの菌種のゲノムにコードされている多数の生合成遺伝子をプラスミドに組込む。

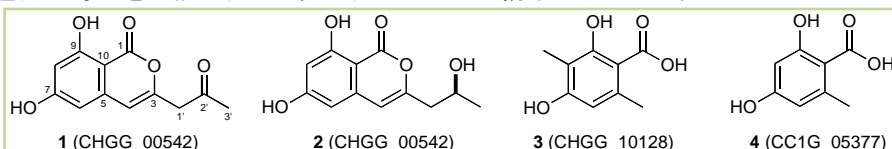
有用天然物生合成遺伝子の網羅的探索

- ◆ 本研究課題で用いる糸状菌 *C. globosum* の染色体上に望む遺伝子を容易かつ効率的に導入することができる変異株の作製による生物合成システムの構築

2. 研究の実施状況

酵母宿主合成系を用い、ポリケタイド合成酵素遺伝子をコードしていると推定された遺伝子 CHGG_00542、CHGG_10128、および CC1G_05377 を発現することとした。CHGG の系統番号を持つ遺伝子群は、糸状菌である *Chaetomium globosum* のゲノム上にコードされ、一方 CC1G の系統番号を持つ遺伝子は、担子菌である *Coprinopsis cinerea* のゲノム上にコードされている。発現ベクター pTOWug2-836 に導入された上記 PKS 遺伝子は、C 末端にペプチドタグが付加される融合タンパク質として発現され、これを用いウエスタンブロットングによって、酵母細胞内で発現することが確認された。発現ベクターで形質転換した酵母の培養液から各種クロマトグラフィーによって目的化合物を分離精製した。その結果、三角フラスコを用いた培養で 1 L の培養液から生合成産物 **1** (CHGG_00542) を 0.8 mg、**2** (CHGG_00542) を 1.8 mg、**3** (CHGG_10128) を 1.7mg、および **4** (CC1G_05377) 1.8mg の収量で単離した。これらの化合物の構造解析の結果、下図に示した化学構造をもつ化合物であることが示された。従って、目的とした生合成システムを構築することができた。

続いて、研究目的とした *C. globosum* のモデル化に取り組み、染色体へのランダムな組換えを起こす *ligD* を欠損させることに成功し、目的の遺伝子を染色体に容易に組込むことができる株を得た。さらに *pyrG* を欠損させることにも成功し、何度でも遺伝子導入を可能とする生物合成システムの構築に成功した。



3. 研究発表等

| | |
|------------------------|--|
| <p>雑誌論文 計 13 件</p> | <p>(掲載済み一査読有り) 計 3 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Torikai, K., Saruwatari, T., Kitano, T., Sano, T., Nakane, A., Noguchi, H., Watanabe, K. Practical synthesis of DOPA derivative for biosynthetic production of potent antitumor natural products, saframycins and ecteinascidin 743. <i>Letters In Organic Chemistry</i>, 8, 686-689, 2011. 2. Hirose, Y., Watanabe, K., Minami, A., Nakamura, T., Oguri H., Oikawa, H. Involvement of common intermediate L-3-hydroxyknyurenine in the chromophore biosynthesis of quinomycin family antibiotics. <i>J. Antibiot.</i>, 64, 117-122, 2011. 3. Minami, A., Migita, A., Inada, D., Hotta, K., Watanabe, K., Oguri, H., Oikawa, H. Enzymatic epoxide-opening cascades catalyzed by a pair of epoxide hydrolases in the ionophore polyether biosynthesis. <i>Org. Lett.</i>, 13, 1638-1641, 2011. <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 渡辺賢二, 大栗博毅, 及川英秋, 生合成マシナリーを用いた抗腫瘍性物質生産の試み, バイオサイエンスとインダストリー, バイオインダストリー協会, 69, 26-30, 2011. 2. Saruwatari, T., Praseuth, A. P., Sato, M., Torikai, K., Noguchi, H., Watanabe, K. A comprehensive overview on genomically directed assembly of aromatic polyketides and macrolide lactones using fungal megasynthases. <i>J. Antibiot.</i>, 64, 9-17, 2011. <p>(未掲載) 計 8 件</p> <p><u>2012年4月1日以降に掲載されることが決定された雑誌論文</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Minami, A., Shimaya, M., Suzuki, G., Migita, A., Shinde, S. S., Watanabe, K., Tamura, T., Oguri, H., Oikawa, H. Sequential enzymatic epoxidation involved in polyether lasalocid biosynthesis. <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, in press. 2. Hotta, K., Chen, X., Paton, R. S., Minami, A., Li, H., Swaminathan, K., Mathews, I. I., Watanabe, K., Oikawa, H., Houk, K. N., Kim, C. Y. Enzymatic catalysis of anti-Baldwin ring-closure in polyether biosynthesis. <i>Nature</i>, 483, 355-359, 2012. 3. Ishiuchi, K., Nakazawa, T., Ookuma, T., Sugimoto, T., Sato, M., Tsunematsu, Y., Ishikawa, N., Noguchi, H., Hotta, K., Moriya, H., Watanabe, K. Establishing a new methodology for genome mining and biosynthesis of polyketides and peptides through yeast molecular genetics. <i>ChemBioChem</i>, 13, 846-854, 2012. 4. Nakazawa, T., Ishiuchi, K., Praseuth, A., Noguchi, H., Hotta, K., Moriya, H., Watanabe, K. Overexpressing transcriptional regulator in <i>Aspergillus oryzae</i> activates a silent biosynthetic pathway to produce novel polyketide. <i>ChemBioChem</i>, 13,855-861, 2012. 5. Tsunematsu, Y., Ichinoseki, S., Nakazawa, T., Ishikawa, N., Noguchi, H., Hotta, K., Watanabe, K. Overexpressing transcriptional regulator in <i>Chaetomium globosum</i> activates a silent biosynthetic pathway: evaluation of shanorellin biosynthesis <i>J. Antibiot.</i>, in press. 6. Koketsu, K., Minami, A., Watanabe, K., Oguri, H., Oikawa, H. Pictet-Spenglerase involved in tetrahydroisoquinoline antibiotic biosynthesis. <i>Curr. Opin. Chem. Biol.</i>, 16, 142-149, 2012. 7. 中沢威人, 恒松雄太, 石川格靖, 渡辺賢二, 生合成遺伝子クラスターの高度強制発現による合成生物学が拓く有用天然物の創製, 生物工学会誌, 日本生物工学会, 印刷中. 8. 恒松雄太, 守屋央朗, 渡辺賢二, 出芽酵母発現システムを利用した天然物の生物合成, 化学と生物, 日本農芸化学会, 50, 163-174, 2012. |
|------------------------|--|

様式19 別紙1

| | |
|------------------------|---|
| <p>会議発表 計 29 件</p> | <p>専門家向け 計 28 件 <u>基調講演</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kenji Watanabe, "Yeast, a more manageable non-ribosomal peptide mill for Spirotryprostatin B assembly" International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo Convention Center, Sapporo, JAPAN, 09/06-09/10/2011. <p><u>招待講演</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 渡辺賢二「<i>lig4</i> 破壊株 <i>Chaetomium globosum</i> による天然物生合成機構の網羅的解析法の構築」日本農芸化学会 2012 年度大会, シンポジウム, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012. 2. 渡辺賢二「糸状菌ゲノムの革新的発現にもとづくシンセティックバイオロジー」バイオインダストリー協会, 鉄鋼会館, 東京, 09/16/2011. 3. Kenji Watanabe, "Yeast, a more manageable non-ribosomal peptide mill for Spirotryprostatin B assembly" Society for Industrial Microbiology, Annual meeting and exhibition 2011, Sheraton New Orleans, New Orleans, LA, USA, 07/24-07/28/20. <p><u>口頭発表</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 恒松雄太, 石川格靖, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「Spirotryprostatin 類の生合 研究」日本薬学会 132 年会, 北海道大学, 札幌市, 03/28-31/2012. 2. 鰐淵清史, 猿渡隆佳, 北野達也, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「サフラマイシン生合成酵素の機能解析」日本薬学会 132 年会, 北海道大学, 札幌市, 03/28-31/2012. 3. 猿渡隆佳, 鰐淵清史, 北野達也, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「生合成遺伝子 の異種発現による抗腫瘍性生物活性物質サフラマイシンの合成」日本薬学会132年会, 北海道大学, 札幌市, 03/28-31/2012. 4. 石川格靖, 恒松雄太, 杉本覚, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「糸状菌ゲノムの酵母を宿主とした発現によるペプチド系抗生物質の合成」日本薬学会 132 年会, 北海道大学, 札幌市, 03/28-31/2012. 5. 佐藤道大, 中沢威人, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「糸状菌由来休眠型生合成遺伝子の活性化によるペプチド系天然物合成システムの構築」日本薬学会132年会, 北海道大学, 札幌市, 03/28-31/2012. 6. 石内勘一郎, 中沢威人, 大熊貴士, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「機能未知生合成遺伝子を活用したポリケタイド系天然物の合成」日本薬学会132年会, 北海道大学, 札幌市, 03/28-31/2012. 7. 杉本覚, 石内勘一郎, 中沢威人, 恒松雄太, 石川格靖, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「生合成遺伝子群の転写因子発現によるazaphilone系天然物の合成」日本薬学会132年会, 北海道大学, 札幌市, 03/28-31/2012. 8. 恒松雄太, 石川格靖, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「Spirotryprostatin 類の生合 研究」日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012. 9. 鰐淵清史, 猿渡隆佳, 北野達也, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「サフラマイシン生合成 |
|------------------------|---|

| | |
|--|--|
| | <p>酵素の機能解析」日本農芸化学会2012年度大会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012.</p> <p>10. 猿渡隆佳, 鰐淵清史, 北野達也, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「生合成遺伝子の異種発現による抗腫瘍性生物活性物質サフラマイシンの合成」日本農芸化学会2012年度大会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012.</p> <p>11. 石川格靖, 恒松雄太, 杉本覚, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「糸状菌ゲノムの酵母を宿主とした発現によるペプチド系抗生物質の合成」日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012.</p> <p>12. 佐藤道大, 中沢威人, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「糸状菌由来休眠型生合成遺伝子の活性化によるペプチド系天然物合成システムの構築」日本農芸化学会2012年度大会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012.</p> <p>13. 石内勘一郎, 中沢威人, 大熊貴士, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「機能未知生合成遺伝子を活用したポリケタイド系天然物の合成」日本農芸化学会2012年度大会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012.</p> <p>14. 中沢威人, 杉本覚, 五反田康考, 野口博司, 渡辺賢二「二次代謝研究を指向した糸状菌 <i>Chaetomium globosum</i> の分子遺伝学実験システムの整備」日本農芸化学会2012年度会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012.</p> <p>15. 杉本覚, 石内勘一郎, 中沢威人, 恒松雄太, 石川格靖, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「生合成遺伝子群の転写因子発現によるazaphilone系天然物の合成」日本農芸化学会2012年度大会, 京都女子大学, 京都市, 03/22-26/2012.</p> <p>16. 中沢威人, 石内勘一郎, 渡辺賢二「<i>A. oryzae</i> からの不活性型二次代謝クラスター活性化と生合成産物の構造解析」第 6 回日本ゲノム微生物学会年会, 立教大学, 東京, 03/10-12/2012.</p> <p>17. 鰐淵清史「サフラマイシン生合成酵素の機能解析」生合成若手勉強会, 東京工業大学, 東京, 12/26/2011.</p> <p>18. 中沢威人, 石内勘一郎, 渡辺賢二「<i>A. oryzae</i> からの不活性型二次代謝クラスター活性化と生合成産物の構造解析」第 11 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 東京大学, 東京, 11/16-17/2011.</p> <p>19. 石内勘一郎, 中沢威人, 大熊貴士, 五反田康孝, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二「機能未知生合成遺伝子を活用したポリケタイド系天然物の合成」第 53 回天然有機化合物討論会, 大阪国際交流センター, 大阪市, 09/27-29/2011.</p> <p>20. 佐藤道大, 野口博司, 大栗博毅, 及川英秋, 渡辺賢二「SW-163 類の生合成に含まれる酵素反応の精密機能解析」新学術領域「生合成マシナリー」第 2 回公開シンポジウム, 東京大学, 東京, 06/04/2011.</p> <p>21. 佐藤道大「SW-163 類の生合成に含まれる酵素反応の精密機能解析」生合成若手勉強会, 理化学研究所, 和光市, 07/02/2011.</p> <p><u>ポスター発表</u></p> |
|--|--|

様式19 別紙1

| | |
|---|--|
| | <p>1. Takehito Nakazawa, Takashi Ookuma, Satoru Sugimoto, Satoshi Ichinoseki, Yasutaka Gotanda, Noriyasu Ishikawa, Yuta Tsunematsu, Kan'ichiro Ishiuchi, Hiroshi Noguchi, Kenji Watanabe, "Biosynthesis of Natural Products Through a Fungal Molecular Genetics" 11th European Conference on Fungal Genetics, Philipps-Universität Marburg, GERMANY, 03/30-04/02/2012.</p> <p>2. Kanichiro Ishiuchi, "Candidate huperzine A and other Lycopodium alkaloids in cultured cells of Huperzia species" Phytochemical Society of North America, 50th Anniversary Meeting, Kohala Coast, Hawaii, USA, 12/10-15/2011.</p> <p>3. Takehito Nakazawa, Kan'ichiro Ishiuchi, Kinya Hotta, Hiroshi Noguchi, Hisao Moriya, Kenji Watanabe, "Establishing a New Methodology for Genome Mining and Biosynthesis of Natural Products Through a Fungal Molecular Genomics" 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium "Frontier of Medicinal Science" KEIO PLAZA HOTEL TOKYO, Tokyo, JAPAN, 11/29-12/02/2011.</p> <p>一般向け 計 1 件 1. ファーマカレッジ「植物から有用な成分を取ろう」静岡県立大学, 08/06-07/2011.</p> |
| <p>図 書 計 0 件</p> | |
| <p>産業財産権 出願・取得状 況 計 0 件</p> | <p>(取得済み) 計 0 件 (出願中) 計 0 件</p> |
| <p>Webページ (URL)</p> | <p>http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/</p> |
| <p>国民との科 学・技術対話 の実施状況</p> | <p><u>出前授業</u> 渡辺賢二「最先端創薬研究」静岡学園高等学校, 静岡市, 11/16/2011. 対象者：高校生および教職員, 参加人数：50 名 内容：天然有機化合物を起源とする医薬品の探索方法および製造方法に関する解説を行いました。 平成 23 年度の詳細な実施状況は現在公開中 (http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/)。</p> |
| <p>新聞・一般雑 誌等掲載 計 0 件</p> | |
| <p>その他</p> | <p>特になし</p> |

4. その他特記事項

実施状況報告書(平成23年度) 助成金の執行状況

本様式の内容は一般に公表されます

1. 助成金の受領状況(累計)

(単位:円)

| | ①交付決定額 | ②既受領額 (前年度迄の 累計) | ③当該年度受 領額 | ④(=①-②- ③)未受領額 | 既返還額(前 年度迄の累 計) |
|------|-------------|------------------------|--------------|-------------------|-----------------------|
| 直接経費 | 134,000,000 | 90,400,000 | 0 | 43,600,000 | 0 |
| 間接経費 | 40,200,000 | 27,120,000 | 0 | 13,080,000 | 0 |
| 合計 | 174,200,000 | 117,520,000 | 0 | 56,680,000 | 0 |

2. 当該年度の収支状況

(単位:円)

| | ①前年度未執 行額 | ②当該年度受 領額 | ③当該年度受 取利息等額 (未収利息を除 く) | ④(=①+②+ ③)当該年度 合計収入 | ⑤当該年度執 行額 | ⑥(=④-⑤) 当該年度未執 行額 | 当該年度返還 額 |
|------|--------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|-------------------------|-------------|
| 直接経費 | 78,676,757 | 0 | 0 | 78,676,757 | 65,634,750 | 13,042,007 | 0 |
| 間接経費 | 23,760,000 | 0 | 0 | 23,760,000 | 23,760,000 | 0 | 0 |
| 合計 | 102,436,757 | 0 | 0 | 102,436,757 | 89,394,750 | 13,042,007 | 0 |

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

| | 金額 | 備考 |
|---------|------------|-----------------------|
| 物品費 | 54,995,729 | 質量分析装置、化合物分離装置、実験試薬等 |
| 旅費 | 40,900 | 研究成果発表旅費(守屋央朗) |
| 謝金・人件費等 | 4,457,383 | 博士研究員人件費等 |
| その他 | 6,140,738 | コピー機賃貸借料、化合物分析装置賃貸借料等 |
| 直接経費計 | 65,634,750 | |
| 間接経費計 | 23,760,000 | |
| 合計 | 89,394,750 | |

4. 当該年度の主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

| 物品名 | 仕様・型・性能 等 | 数量 | 単価 (単位:円) | 金額 (単位:円) | 納入 年月日 | 設置研究機関 名 |
|--------------------------|--------------------------------------|----|--------------|--------------|------------|-------------|
| Thermo Exactive | 電場型FTMSシス テム<備品> | 1 | 39,900,000 | 39,900,000 | 2011/8/4 | 静岡県立大学 |
| HITACHI HPLC | 高速液体クロマト グラフシステム一 式<備品> | 1 | 3,999,975 | 3,999,975 | 2011/7/29 | 静岡県立大学 |
| グローブボックス | 真空グローブホッ クス (角型)<備品> | 1 | 514,500 | 514,500 | 2011/8/30 | 静岡県立大学 |
| EYELA FDU-2100 | 凍結乾燥機<備 品> | 1 | 819,000 | 819,000 | 2011/8/10 | 静岡県立大学 |
| 大岳製作所5502- M | 電動フレンチプレ ス<備品> | 1 | 2,625,000 | 2,625,000 | 2011/10/31 | 静岡県立大学 |
| HITACHI HPLC software | クロマトグラフデー タ ステーションシステム <備品> | 1 | 654,150 | 654,150 | 2011/10/21 | 静岡県立大学 |
| Operonカスタムオリ ゴ | DNA・RNAパッ ケージキットII | 1 | 528,681 | 528,681 | 2011/11/8 | 静岡県立大学 |