

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 24 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

有用天然物の生物合成

- ◆ 推定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導入した糸状菌を用い *in vivo* 合成系および精製された発現酵素を用いた *in vitro* 合成系により化合物を生物合成する。

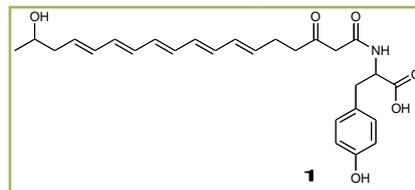
生物合成した化合物の単離・構造決定

- ◆ *in vitro* あるいは *in vitro* 合成系によって得られる化合物に関しては高分離能高速液体クロマトグラフィー付き高分解能質量分析装置（本研究設備費にて設置）によって化合物の推定分子式を得る。
- ◆ *in vitro* あるいは *in vitro* 合成系によって目的の化合物を分離精製し化学構造を決定した後、それら生合成遺伝子群を改変することで誘導体の生物合成を行う。

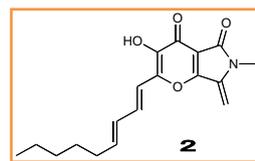
2. 研究の実施状況

本年度までの研究で得られた知見から、機能不明の休眠型生合成遺伝子群を活性化させ有用分子を生物合成させるためには、3 種類の方法が有効であることを突き止めた。それらを以下に示す。

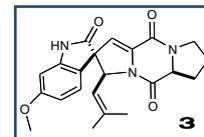
1. プロモーターを天然のものから強発現型へと変換することで、転写活性を増加させこれまでに生産の確認できなかった分子を生物合成する方法。成功例として我々は、糸状菌 *Chaetomium globosum* にコードされる CHGG_05358 (12 kb) のプロモーターを変換して化合物 **1** を得ることに成功した (右図)。



2. 転写因子を高発現させるかあるいはノックアウトすることで休眠型生合成遺伝子群を活性化させて分子を生物合成する方法。成功例として生合成遺伝子群の中に存在する推定転写因子を高発現させ、*Aspergillus niger* から化合物 **2** および多くの類縁体を得ることに成功した (右図)。



3. *Aspergillus niger* を宿主として休眠型遺伝子群を全て導入し異種発現によって分子を生物合成させる方法。成功例として *Aspergillus fumigatus* にコードされた合計 6 個の生合成遺伝子群を高発現させ、天然の生産菌からはこれまでに単離されていない分子 **3** の大量生物合成に成功した (右図)。



上に示した成功例から、休眠型生合成遺伝子群を活性化させるためには、これら 3 種類のいずれかの手法が有効であることを実験的に証明できた。

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 10 件
計 15 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. Winter, J. M., Sato, M., Sugimoto, S., Chiou, G., Garg, N. K., Tang, Y., Watanabe, K. Identification and characterization of the chaetoviridin and chaetomugilin gene cluster in <i>Chaetomium globosum</i> reveals dual functions of an iterative highly-reducing polyketide synthase. <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 134, 17900-17903, 2012. 2. 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>, 134, 7246-7249, 2012. 3. 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. 4. 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. 5. 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. 6. 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>, 65, 377-380, 2012. 7. 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. 8. Koketsu, K., Minami, A., Watanabe, K., Oguri, H., Oikawa, H. The pictet-spengler mechanism involved in the biosynthesis of tetrahydroisoquinoline antitumor antibiotics: a novel function for a nonribosomal peptide synthetase. <i>Methods in Enzymol.</i>, 516, 79-98, 2012. 9. Moriya, H., Makanae, K., Watanabe, K., Chino, A., Shimizu-Yoshida, Y. Robustness analysis of cellular systems using the genetic tug-of-war method. <i>Mol. Biosyst.</i>, 8, 2513-2522, 2012. 10. 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.
	(掲載済み一査読無し) 計 1 件
	<ol style="list-style-type: none"> 1. 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

	<p>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, 90, 289-292, 2012.</p> <p>(未掲載) 計 4 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. Ishiuchi, K., Nakazawa, T., Yagishita, T., Sugimoto, F., Mino, T., Noguchi, H., Hotta, K., Watanabe, K. Combinatorial generation of complexity by redox enzymes in the chaetoglobosin A biosynthesis. <u><i>J. Am. Chem. Soc.</i></u>, in press. 2. Tsunematsu, Y., Ishiuchi, K., Hotta, K., Watanabe, K. Yeast-based genome mining, production and mechanistic studies of biosynthesis of fungal polyketide and peptide natural products. <u><i>Nat. Prod. Rep.</i></u>, in press. 3. Sato, M., Nakazawa, T., Tsunematsu, Y., Hotta, K., Watanabe, K. Natural product engineering via mechanistic studies of echinomycin biosynthesis. <u><i>Curr. Opin. Chem. Biol.</i></u>, in press. 4. Hotta, K., Watanabe, K. Current understanding and hypotheses on the biosynthesis of microalgal polyether toxins. Toxins and biologically active compounds from microalgae, edited by Gian Paolo Rossini. <u><i>CRC Press</i></u>, in press.
<p>会議発表 計 36 件</p>	<p>専門家向け 計 35 件</p> <p><u>招待講演</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kenji Watanabe, "Targeted disruption of transcriptional regulators in <i>Chaetomium globosum</i> activates biosynthetic pathways" 日本薬学会第 133 年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日 2. 渡辺賢二「Spirotryprostatin 類の生合成研究」プロセス化学会 ウィンターシンポジウム, 静岡, 2012 年 12 月 7 日 3. Kenji Watanabe, "Functional reconstitution of the saframycin biosynthetic enzymes" RCIS International Conference, Okayama, 2012 年 11 月 20-21 日 4. 渡辺賢二「新しい薬のを見つけ方」BioJapan2012, 横浜, 2012 年 10 月 10 日 5. 渡辺賢二「天然物化学にとっての出芽酵母の重要性」第 20 回酵母合同シンポジウム, 京都, 2012 年 9 月 6-7 日 6. Kenji Watanabe, "Biologically active molecules from fungi" 第 8 回天然物生合成日米セミナー, 淡路, 2012 年 6 月 17-22 日 7. 渡辺賢二「合成生物学が拓く有用天然物の創製」東京大学 薬学部 天然物化学教室セミナー, 東京, 2012 年 5 月 17 日 8. 渡辺賢二「新しい薬のを見つけ方」BIO tech 2012, 東京, 2012 年 4 月 25 日 <p><u>口頭発表</u></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 石内勘一郎, 中沢威人, 野口博司, 渡辺賢二, Chaetoglobosin A 生合成遺伝子クラスターの同定, 日本生薬学会第 59 回年会, 千葉, 2012 年 9 月 17 日 2. 中沢威人, 石内勘一郎, 五反田康孝, 佐藤道大, 杉本覚, 野口博司, 渡辺賢二, 有用天然物の探索および生合成遺伝子クラスターの特定を目的とした糸状菌 <i>Chaetomium globosum</i> veA 遺伝子破壊株の作成, 日本生薬学会第59回年会, 千葉, 2012年9月17日 3. 恒松雄太, 石川格靖, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 抗腫瘍性生物活性物質 spirotryprostatin 類の生合成研究, 第 54 回天然有機化合物討論会, 東京, 2012 年 9 月 18-20 日 4. Noriko Tozuka and Kenji Watanabe, "Identification of fumagillin biosynthetic gene cluster-1" The 2nd JSPS-NUS Meeting on Natural Product Biosynthesis, Singapore, 2012年10月2日

5. Manami Fukutomi and Kenji Watanabe, "Identification of fumagillin biosynthetic gene cluster-2" The 2nd JSPS-NUS Meeting on Natural Product Biosynthesis, Singapore, 2012年10月2日
6. Noriyasu Ishikawa and Kenji Watanabe, "Total biosynthesis of colibactin inducing colorectal cancer and determination of chemical structure" The 2nd JSPS-NUS Meeting on Natural Product Biosynthesis, Singapore, 2012年10月2日
7. Michio Sato and Kenji Watanabe, "Biosynthetic study of azaphirones from *Chaetomium globosum*" The 2nd JSPS-NUS Meeting on Natural Product Biosynthesis, Singapore, 2012年10月2日
8. Takehito Nakazawa and Kenji Watanabe, "Insights into biological functions of secondary metabolites from *Chaetomium globosum*" The 2nd JSPS-NUS Meeting on Natural Product Biosynthesis, Singapore, 2012年10月2日
9. Yuta Tsunematsu and Kenji Watanabe, "Activation of fungal secondary metabolism through genetic engineering" The 2nd JSPS-NUS Meeting on Natural Product Biosynthesis, Singapore, 2012年10月2日
10. 中沢威人, 石内勘一郎, 杉本覚, 五反田康孝, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二, *Chaetomium globosum* における天然物生合成遺伝子研究からみえてきた特定二次代謝産物による遺伝子発現制御および有性生殖への関与, 第12回糸状菌分子生物学研究会, 名古屋, 2012年11月12日
11. 中沢威人, 石内勘一郎, 大熊貴士, 石川格靖, 五反田康孝, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 糸状菌の機能未知生合成遺伝子を活用した二次代謝産物合成システムの構築, 第6回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 2013年3月10-12日
12. 中沢威人, 五反田康孝, 石内勘一郎, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌 *Chaetomium globosum* における天然物生合成の人為的変動, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
13. 杉本覚, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌 *Chaetomium globosum* における chaetoviridin 類の生合成経路の解明, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
14. 猿渡隆佳, 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ポリケタイド系天然物合成システムの構築, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
15. 石川格靖, 恒松雄太, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 天然物生合成遺伝子の異種発現による spirotryprostatin 類の生合成研究, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
16. 恒松雄太, 福富愛実, 野口博司, 渡辺賢二, Pseurotin 類生合成におけるスピロ環骨格形成機構の解明, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
17. 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 azaphilone 系天然物 cochliodone A の生合成研究, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
18. 石内勘一郎, 中沢威人, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌 *Chaetomium globosum* 由来 Chaetoglobosin A の生合成研究, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
19. 福富愛実, 戸塚統子, 恒松雄太, 猿渡隆佳, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二, Fumagillin 生合成遺伝子クラスターの同定, 日本農芸化学会2013年度大会, 仙台市, 2013年3月24-27日
20. 中沢威人, 五反田康孝, 石内勘一郎, 野口博司, 渡辺賢二, 形態形成変異を指標とした, 糸状菌 *Chaetomium globosum* における休眠型生合成遺伝子の活性化変異株のスクリーニング, 日本薬学会第133年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013年3月27-30日
21. 猿渡隆佳, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, Dityryptophenaline 生合成経路の解明, 日本薬学会第133年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013年3月27-30日
22. 石川格靖, 中沢威人, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌 *Botrytis cinerea* における転写制御の破壊による天然物生合成, 日本薬学会第133年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013年3月27-30日
23. 恒松雄太, 野口博司, 渡辺賢二, *Aspergillus niger* 休眠型生合成遺伝子の覚醒による新規

様式19 別紙1

	<p>天然物の創製, 日本薬学会第 133 年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日</p> <p>24. 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 azaphilone 系天然物 cochliodone A の生合成研究, 日本薬学会第 133 年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日</p> <p>25. 石内勘一郎, 中沢威人, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌 <i>Chaetomium globosum</i> 由来 Chaetoglobosin A の生合成研究, 日本薬学会第 133 年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日</p> <p>26. 福富愛実, 戸塚統子, 恒松雄太, 猿渡隆佳, 佐藤道大, 野口博司, 渡辺賢二, Fumagillin 生合成遺伝子クラスターの同定, 日本薬学会第 133 年会, シンポジウム, パシフィコ横浜, 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日</p> <p><u>ポスター発表</u></p> <p>1. Takehito Nakazawa, Kan'ichiro Ishiuchi, Satoru Sugimoto, Yasutaka Gotanda, Michio Sato, Hiroshi Noguchi, Kenji Watanabe, "Molecular genetics studies on secondary metabolism in <i>Chaetomium globosum</i> reveal involvement of aureonitol and chaetoglobosins in gene regulation and sexual reproduction" 27th Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, USA, 2013年3月12-17日</p> <p>一般向け 計 1 件</p> <p>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, 2012 年 8 月 6-7 日</p>
<p>図書</p> <p>計 0 件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得状 況</p> <p>計 0 件</p>	<p>(取得済み) 計 0 件</p> <p>(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></p> <p>渡辺賢二「農芸化学という学問分野について」北海道立旭川東高等学校, 旭川市, 2012 年 8 月 27 日. 対象者: 高校生および教職員, 参加人数: 50 名</p> <p>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しての解説を行いました。</p> <p>平成 24 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>

様式19 別紙1

4. その他特記事項

日清ファルマ株式会社と共同研究開発の契約を締結しました。

研究課題：大腸菌および酵母を用いた有用天然物の生物合成による生産システムの確立

期間：2013年5月1日～2014年3月31日

日清ファルマ株式会社との研究開発が目的とする生産方法は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの研究によって構築された方法論を用いる。

実施状況報告書(平成24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	21,800,000	21,800,000	0
間接経費	40,200,000	27,120,000	6,540,000	6,540,000	0
合計	174,200,000	117,520,000	28,340,000	28,340,000	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 (未取利息を除 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	13,042,007	21,800,000	0	34,842,007	24,570,575	10,271,432	0
間接経費	0	6,540,000	0	6,540,000	6,540,000	0	0
合計	13,042,007	28,340,000	0	41,382,007	31,110,575	10,271,432	0

3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	9,660,340	質量分析装置、化合物分離装置、実験試薬等
旅費	38,320	佐藤道大(静岡県立大学・特任助教)
謝金・人件費等	9,184,748	博士研究員人件費等
その他	5,687,167	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	24,570,575	
間接経費計	6,540,000	
合計	31,110,575	

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
日立微量高速冷却 遠心機	CF15RX II<備品 >	1	728,700	728,700	2012/11/29	静岡県立大学
日立高速冷却遠心 機	CR20G III<備品 >	1	1,959,300	1,959,300	2012/12/27	静岡県立大学