

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 25 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

2. 当該年度の研究目的

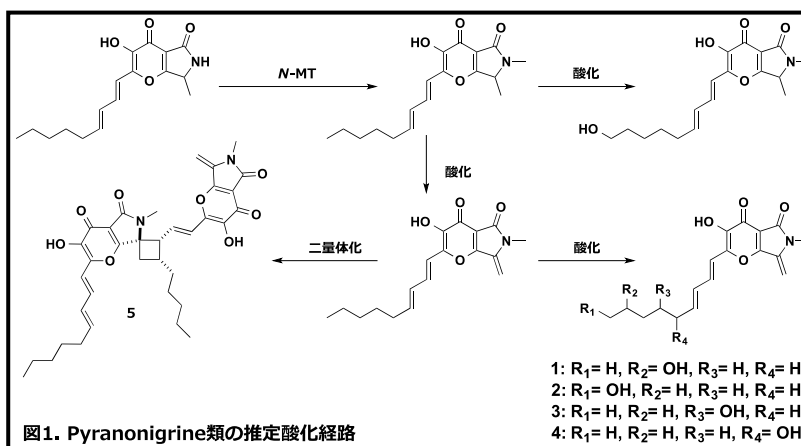
化学構造の決定および得られた天然物の実用的生物合成法の確立

- ◆ 本研究課題で開発された方法論を用い得られた化合物群に対して生物活性を試験する。
- ◆ 酵母を宿主とした *in vivo* 合成系による化合物の大量合成系の確立。
- ◆ 生物活性試験により有望な活性を持つ新規物質が見出された場合、詳細な活性評価を目的とし、1 リットルの培養液から1 mg以上の収量で目的物質を合成する。
- ◆ 医薬品として商業化を目的とした場合、一般に適正な製造コストの範囲となる、1リットルの培養液から100 mg以上の生産を可能とするシステムを構築する。

3. 研究の実施状況

本年度の研究では、休眠型遺伝子群を転写因子の高発現させることで活性化し、**約 100 種類**の化合物を得ることができた。この成果を中心に実施状況を以下に示す。

1. 一つの転写因子を強制発現させ転写活性を増加させたところ pyranonigrine および、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ことに成功した(図 1)。新たに生産の確認された分子の数は約 100 種類にもおよぶ。全てが新規化合物ではないが、多数の新規化合物を含み、現在構造解析中である。



2. 上記研究で得られた化合物に

関して現在ロート製薬株式会社の共同研究により生物活性を評価している。

3. spirotryprostain 類は、天然からでは極微量成分 (< 2.5 μg/L) としてしか単離されないことが知られている。我々は、異種宿主となる酵母あるいは糸状菌 *Aspergillus niger* を用いて、spirotryprostain 類に関しては 1 mg/L 以上の生産収量、すなわち 400 倍以上の高生産システムを構築できた。その他にも、これまでに上記の手法で得られた新規化合物に関して、100 mg/L 以上生産する化合物も存在し、実用的な生物合成法の基盤技術を構築できたと言える。

## 3. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み－査読有り) 計 10 件
計 11 件	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lin, H., Tsunematsu, Y., Dhingra, S., Xu, W., Fukutomi, M., Chooi, Y. H., Cane, D. E., Calvo, A. M., <b>Watanabe, K.</b>, Tang, Y. Generation of complexity in fungal terpene biosynthesis: discovery of a multifunctional cytochrome P450 in the fumagillin pathway. <u><i>J. Am. Chem. Soc.</i></u>, 136, 4426-4436, 2014.</li> <li>2. Saruwatari, T., Yagishita, F., Mino, T., Noguchi, H., Hotta, K., <b>Watanabe, K.*</b> Cytochrome P450 as dimerization catalyst in diketopiperazine alkaloid biosynthesis. <u><i>ChemBioChem</i></u>, 15, 656-659, 2014.</li> <li>3. Hotta, K., Keegan, R. M., Ranganathan, S., Fang, M., Bibby, J., Winn, M. D., Sato, M., Lian, M., <b>Watanabe, K.</b>, Rigden, D. J., Kim, C. Y. Conversion of a disulfide bond to a thioacetal group during echinomycin biosynthesis. <u><i>Angew. Chem. Intl. Ed.</i></u>, 53, 824-828, 2014.</li> <li>4. Tsunematsu, Y., Ishikawa, N., Wakana, D., Goda, Y., Noguchi, H., Moriya, H., Hotta, K., <b>Watanabe, K.*</b> Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk. <u><i>Nature Chemical Biology</i></u>, 9, 818-825, 2013.</li> <li>5. Hiratsuka, T., Koketsu, K., Minami, A., Kaneko, S., Yamazaki, C., <b>Watanabe, K.</b>, Oguri, H., Oikawa, H. Core scaffold assembly mechanism of quinocarcin and SF-1739: bimodular complex of nonribosomal peptide synthetases for sequential mannich-type reactions. <u><i>Chemistry &amp; Biology</i></u>, 20, 1523-1535, 2013.</li> <li>6. Nakazawa, T., Ishiuchi, K., Sato, M., Tsunematsu, Y., Sugimoto, S., Gotanda, Y., Noguchi, H., Hotta, K., <b>Watanabe, K.*</b> Targeted disruption of transcriptional regulators in <i>Chaetomium globosum</i> activates biosynthetic pathways and reveals transcriptional regulator-like behavior of aureonitol. <u><i>J. Am. Chem. Soc.</i></u>, 135, 13446-13455, 2013.</li> <li>7. Ishiuchi, K., Nakazawa, T., Yagishita, F., Mino, T., Noguchi, H., Hotta, K., <b>Watanabe, K.*</b> Combinatorial generation of complexity by redox enzymes in the chaetoglobosin A biosynthesis. <u><i>J. Am. Chem. Soc.</i></u>, 135, 7371-7377, 2013.</li> <li>8. Sato, M., Nakazawa, T., Tsunematsu, Y., Hotta, K., <b>Watanabe, K.*</b> Natural product engineering via mechanistic studies of echinomycin biosynthesis. <u><i>Curr. Opin. Chem. Biol.</i></u>, 17, 537-545, 2013.</li> <li>9. Tsunematsu, Y., Ishiuchi, K., Hotta, K., <b>Watanabe, K.*</b> Yeast-based genome mining, production and mechanistic studies of the biosynthesis of fungal polyketide and peptide natural products. <u><i>Natural Product Reports</i></u>, 30, 1139-1149, 2013.</li> <li>10. Minami, A., Oguri, H., <b>Watanabe, K.</b>, Oikawa, H. Biosynthetic machinery of ionophore polyether lasalocid: enzymatic construction of polyether skeleton. <u><i>Curr. Opin. Chem. Biol.</i></u>, 17, 555-561, 2013.</li> </ol> <p>(掲載済み－査読無し) 計 1 件</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 佐藤道大, <b>渡辺賢二*</b>, チオアセタール形成酵素－折り畳まれたエキノマイシンー, 生化学, 日本生化学会, 86, 242-248, 2014.</li> </ol>

様式19 別紙1

	(未掲載) 計0件
<p>会議発表 計41件</p>	<p>専門家向け 計41件</p> <p><u>招待講演</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 渡辺賢二, 生物のゲノム情報を活用した有用天然物生合成機構の解明および生物合成, 日本薬学会第134年会, 熊本市, 2014年3月27-30日</li> <li>2. Kenji Watanabe, Functional analysis of biosynthetic enzyme from fungus, 米国化学会第247年会, シンポジウム, Dallas convention center, Dallas, USA, 2014年3月16-20日</li> <li>3. 渡辺賢二, エピジェネティックス制御の人為的再構築によるリード化合物の網羅的獲得, BioJapan2013, 横浜, 2013年10月9-11日</li> <li>4. 渡辺賢二, 化合物の生物合成を目的とした生合成研究, 第48回天然物談話会, 大津市, 2013年7月3-5日</li> </ol> <p><u>口頭発表</u></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Kenji Watanabe, "Natural products from fungi" 3rd International Conference on Natural product Biosynthesis, University of California Los Angeles, University of Southern California, USA, 2013年5月12-17日</li> <li>2. Noriyasu Ishikawa, Kenji Watanabe, "Aspoquinolone biosynthesis" 3rd International Conference on Natural product Biosynthesis, University of California Los Angeles, University of Southern California, USA, 2013年5月12-17日</li> <li>3. Yuta Tsunematsu, Kenji Watanabe, "Spirotryprostatin biosynthesis" 3rd International Conference on Natural product Biosynthesis, University of California Los Angeles, University of Southern California, USA, 2013年5月12-17日</li> <li>4. Michio Sato, Kenji Watanabe, "Azaphilone biosynthesis" 3rd International Conference on Natural product Biosynthesis, University of California Los Angeles, University of Southern California, USA, 2013年5月12-17日</li> <li>5. 加藤広樹, 恒松雄太, 猿渡隆佳, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 糸状菌<i>Chaetomium globosum</i>休眠型生合成遺伝子の人為的覚醒に基づく新規天然物の獲得, 第48回天然物談話会, 大津市, 2013年7月3-5日</li> <li>6. 佐藤道大, 守屋央朗, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌由来 azaphilone系天然物 cochliodone Aの生合成研究, 第48回天然物談話会, 大津市, 2013年7月3-5日</li> <li>7. 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, 第48回天然物談話会, 大津市, 2013年7月3-5日</li> <li>8. 石川格靖, Clay C. C. Wang, 野口博司, 渡辺賢二, Aspoquinolone類の生合成研究, 第48回天然物談話会, 大津市, 2013年7月3-5日</li> <li>9. 恒松雄太, 石川格靖, 若菜大悟, 合田幸広, 野口博司, 守屋央朗, 堀田欣也, 渡辺賢二, 微量天然物 spirotryprostatin類生物全合成によるスピロ環形成機構の解明, 第48回天然物談話会, 大津市, 2013年7月3-5日</li> </ol>

10.	佐藤道大, 守屋央朗, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌由来 azaphilone 系天然物 cochliodone A の生合成研究, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月7日
11.	猿渡隆佳, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, Ditryptophenaline 生合成経路の解明, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月7日
12.	石川格靖, Clay C. C. Wang, 野口博司, 渡辺賢二, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月7日
13.	恒松雄太, 石川格靖, 若菜大悟, 合田幸広, 野口博司, 守屋央朗, 堀田欣也, 渡辺賢二, 微量天然物 spirotryprostatin 類生物全合成によるスピロ環形成機構の解明, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月7日
14.	杉山智啓, 佐藤道大, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, Diels-Alderase の実在性の証明, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月7日
15.	加藤広樹, 恒松雄太, 猿渡隆佳, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 糸状菌 <i>Chaetomium globosum</i> 休眠型生合成遺伝子の人為的覚醒に基づく新規天然物の獲得, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月8日
16.	江田康拓, 佐藤道大, 守屋央朗, 野口博司, 渡辺賢二: <i>Chaetomium globosum</i> 由来 chaetoviridin 類縁体の構造決定, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月8日
17.	山田陽香, 佐藤道大, 伊藤卓也, 高橋公咲, 野口博司, 渡辺賢二, 放線菌由来新規化合物の探索, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月8日
18.	中嶋小百合, 石内勘一郎, 石川格靖, 野口博司, 渡辺賢二, 恒常発現プロモーターを利用した不活性型遺伝子由来新規天然物の獲得, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月8日
19.	福富愛実, 恒松雄太, 野口博司, Yi Tang, 渡辺賢二, Fumagillin 生合成機構の解明, 日本生薬学会第60回年会, 当別町, 2013年9月8日
20.	恒松雄太, 猿渡隆佳, 杉山智啓, 加藤広樹, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 休眠型天然物生合成遺伝子の強制的覚醒に基づく新規天然物の創製, 第55回天然有機化合物討論会, 京都市, 2013年9月20日
21.	佐藤道大, 杉本覚, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 糸状菌 <i>Chaetomium globosum</i> における chaetoviridin 類生合成経路の解明, 第5回食品薬学シンポジウム, 京都大学, 京都市, 2013年11月1-2日
22.	石川格靖, Clay C. C. Wang, 野口博司, 渡辺賢二, Aspoquinolone 類の生合成研究, 第5回食品薬学シンポジウム, 京都大学, 京都市, 2013年11月1-2日
23.	猿渡隆佳, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, Ditryptophenaline 生合成経路の解明, 第5回食品薬学シンポジウム, 京都大学, 京都市, 2013年11月1-2日
24.	加藤広樹, 恒松雄太, 猿渡隆佳, 杉山智啓, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, 糸状菌 <i>Chaetomium globosum</i> 休眠型生合成遺伝子の人為的覚醒に基づく新規天然物の獲得, 第5回食品薬学シンポジウム, 京都大学, 京都市, 2013年11月1-2日
25.	江田康拓, 佐藤道大, 守屋央朗, 野口博司, 渡辺賢二, <i>Chaetomium globosum</i> 由来 chaetoviridin 類縁体の構造決定, 第5回食品薬学シンポジウム, 京都大学, 京都市, 2013年11月1-2日
26.	石川格靖, Clay C. C. Wang, 野口博司, 渡辺賢二, Aspoquinolone 類の生合成研究, 日本薬学会第134年会, 熊本市, 2014年3月28日
27.	佐藤道大, 杉山智啓, 野口博司, 渡辺賢二, Sch210972 生合成機構の解明, 日本薬学会第134年会, 熊本市, 2014年3月28日
28.	山本剛, 恒松雄太, 野口博司, 渡辺賢二, 糸状菌休眠型PKS-NRPS由来天然物における

	<p>γ-pyrone環形成機構の解明, 日本薬学会第134年会, 熊本市, 2014年3月28日</p> <p>29. 恒松雄太, 福富愛実, 野口博司, 渡辺賢二, Fumagillin-pseurotin複合型生合成遺伝子クラスターの解析, 日本薬学会第134年会, 熊本市, 2014年3月28日</p> <p>30. 猿渡隆佳, 野口博司, 守屋央朗, 渡辺賢二, Ditryptophenaline生合成経路の解明, 日本薬学会第134年会, 熊本市, 2014年3月28日</p> <p>31. 田中秀則, 石内勘一郎, 野口博司, 渡辺賢二, ケトグロボシンA生合成におけるDiels-Alderaseの実在性の証明, 日本薬学会第134年会, 熊本市, 2014年3月28日</p> <p>32. 中沢威人, 石内勘一郎, 五反田康孝, 野口博司, 渡辺賢二, <i>Chaetomium globosum</i>における二次代謝とエピジェネティック変動の関連性, 第13回糸状菌分子生物学コンファレンス, つくば市, 2013年11月20-21日</p> <p><u>ポスター発表</u></p> <p>1. Noriyasu Ishikawa, Clay C. C. Wang, Hiroshi Noguchi, Kenji Watanabe, "Biosynthetic study of aspoquinolone" 米国化学会第247年会, Dallas convention center, Dallas, USA, 2014年3月18日</p> <p>2. Hidenori Tanaka, Sayuri Nakajima, Kan'ichiro Ishiuchi, Noriyasu Ishikawa, Michio Sato, Hiroshi Noguchi, Kinya Hotta, Kenji Watanabe, "Production of a novel secondary metabolite by using a silent biosynthetic gene from <i>Chaetomium globosum</i>" 米国化学会第247年会, Dallas convention center, Dallas, USA, 2014年3月16-20日</p> <p>3. Takayoshi Saruwatari, Fumitoshi Yagishita, Takashi Mino, Hiroshi Noguchi, Kinya Hotta, Kenji Watanabe, "Cytochrome P450 as dimerization catalyst in diketopiperazine alkaloid biosynthesis" 米国化学会第247年会, Dallas convention center, Dallas, USA, 2014年3月16-20日</p> <p>4. Yuta Tsunematsu, Noriyasu Ishikawa, Daigo Wakana, Yukihiro Goda, Hiroshi Noguchi, Hisao Moriya, Kinya Hotta, Kenji Watanabe, "Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk" 米国化学会第247年会, Dallas convention center, Dallas, USA, 2014年3月16-20日</p> <p>5. Michio Sato, Satoru Sugimoto, Hiroshi Noguchi, Hisao Moriya, Kenji Watanabe, "Discovering biological Diels-Alder catalyst in fungal biosynthetic pathway" 米国化学会第247年会, Dallas convention center, Dallas, USA, 2014年3月16-20日</p> <p>一般向け 計0件</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><a href="http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/">http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/</a></p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p><u>高校生への授業および科学実験</u></p> <p>「夏休みファーマカレッジ2013」, 静岡県立大学, 2013年8月8-9日</p> <p>対象者: 静岡県内の高等学校学生, 参加人数: 71名</p>

様式19 別紙1

	内容：茶葉からカフェインの抽出、単離精製、さらに再結晶の操作を実際に体験して頂いた。 また、カフェイン以外にも、緑茶ポリフェノールやテアニンなどの成分や、カフェインの薬理作用についても講義した。
新聞・一般雑誌等掲載 計0件	
その他	<p>1. 渡辺賢二：日本学術振興会 特別研究員等審査会専門委員および国際事業委員会書面審査委員</p> <p>2. 渡辺賢二：静岡大学 遺伝子実験施設 外部評価委員</p> <p>3. 渡辺賢二：3rd International Conference on Natural product Biosynthesis 国際会議の開催, University of California Los Angeles, University of Southern California (米国), 2013年5月12 - 17日, 実施状況は現在公開中 (<a href="http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/">http://www015.upp.so-net.ne.jp/kenji55-lab/</a>)</p> <p>4. 2014年3月27日 日本薬学会 学術振興賞 受賞</p>

4. その他特記事項

1 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。

2 ロート製薬株式会社との共同研究開発の契約を締結しました。

研究課題：新規天然化合物の有用性評価

期間：2013年8月1日～2014年7月31日

ロート製薬株式会社との研究開発の目的は、最先端・次世代研究開発支援プログラムの研究によって見出された多数の天然物の生物活性を評価し医薬品リードを獲得することにある。

## 実施状況報告書(平成25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	112,200,000	21,800,000	0	0
間接経費	40,200,000	33,660,000	6,540,000	0	0
合計	174,200,000	145,860,000	28,340,000	0	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	10,271,432	21,800,000	0	32,071,432	32,071,432	0	0
間接経費	0	6,540,000	0	6,540,000	6,540,000	0	0
合計	10,271,432	28,340,000	0	38,611,432	38,611,432	0	0

## 3. 当該年度の執行額内訳

(単位:円)

	金額	備考
物品費	19,076,721	高速液体クロマトグラフィー、実験試薬等
旅費	2,687,203	渡辺賢二(静岡県立大学・准教授)ほか
謝金・人件費等	9,626,405	博士研究員人件費等
その他	681,103	コピー機賃貸借料、研究会会費等
直接経費計	32,071,432	
間接経費計	6,540,000	
合計	38,611,432	

## 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
高速液体クロマトグラフィー装置一式	Ultimate3000<備 品>	1	4,998,945	4,998,945	2013/5/31	静岡県立大学
スタックフルイン キューバターシェイ カー	I26R<備品>	2	1,769,250	3,538,500	2013/5/21	静岡県立大学
多検体精密破碎装 置	マルチピース ショッカー	1	1,918,350	1,918,350	2013/7/11	静岡県立大学
赤外分光光度計一 式	FT/IR-4100ST	1	1,991,850	1,991,850	2013/9/10	静岡県立大学
旋光計一式	P-2200ST	1	2,727,900	2,727,900	2013/9/10	静岡県立大学
純水製造装置一式	Elix Essential UV3	1	624,750	624,750	2013/10/31	静岡県立大学
超純水製造装置一 式	Milli-Q Reference	1	764,400	764,400	2013/11/11	静岡県立大学